

Взаємозв'язок протипухлинної активності зі структурою похідних 3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону

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

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

E-mail: sergiy@yarmoluk.org.ua

Синтезовано та тестовано на протипухлинну активність (in vitro) 14 похідних 3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону з варіюванням замісників у 1 і 3 положеннях малеїмідного циклу. 10 сполук було відібрано за результатами прескрінінгу і тестовано на 52 лініях ракових клітин людини. Знайдено, що 1-(2,3-дихлорфеніл)-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіон та 1-бензил-3-(3-гідроксіаніліно)-4-фенілсульфаніл-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіон пригнічують ріст деяких клітинних ліній пухлин із $GI_{50} < 0,5 \cdot 10^{-7}$ та $< 10^{-8}$ М.

Вступ. Серед похідних 2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (малеїмиду) найдослідженішими є 3,4-біс-індолілмалеїміди: стауроспорин та його синтетичні аналоги, які використовують у клінічній практиці як антиракові препарати. Знайдено, що їхня дія полягає у пригніченні циклін-залежних кіназ (CDK), топоізомерази I [1–3].

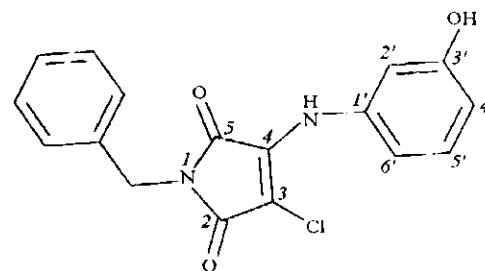
Відомо, що деякі 3-заміщені N-арил- та N-алкіл-4-хлор-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіони мають антибактеріальну активність (*Staphylococcus*, *Escherichia coli*) [4]. Нами синтезовано та тестовано на протипухлинну активність на трьох лініях ракових клітин людини 39 похідних 2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону. Для 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (рис. 1) виявлено найвищу протипухлинну активність і його було тестовано на 56 лініях ракових клітин людини [5].

Мета роботи полягала в хімічній оптимізації базової активної структури 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (2.1) шляхом синтезу похідних з варіюванням заміс-

ників у положеннях 1 і 3 малеїмідного циклу та тестуванні їх на протипухлинну активність. Це дозволило нам визначити критичність бензильного замісника в першому положенні та атома хлору відповідно в третьому положенні структури 2.1.

Матеріали і методи. Проходження реакції та чистоту синтезованих сполук контролювали хроматографічно на пластинах Silufol UV («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



1-Бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіон (2.1)

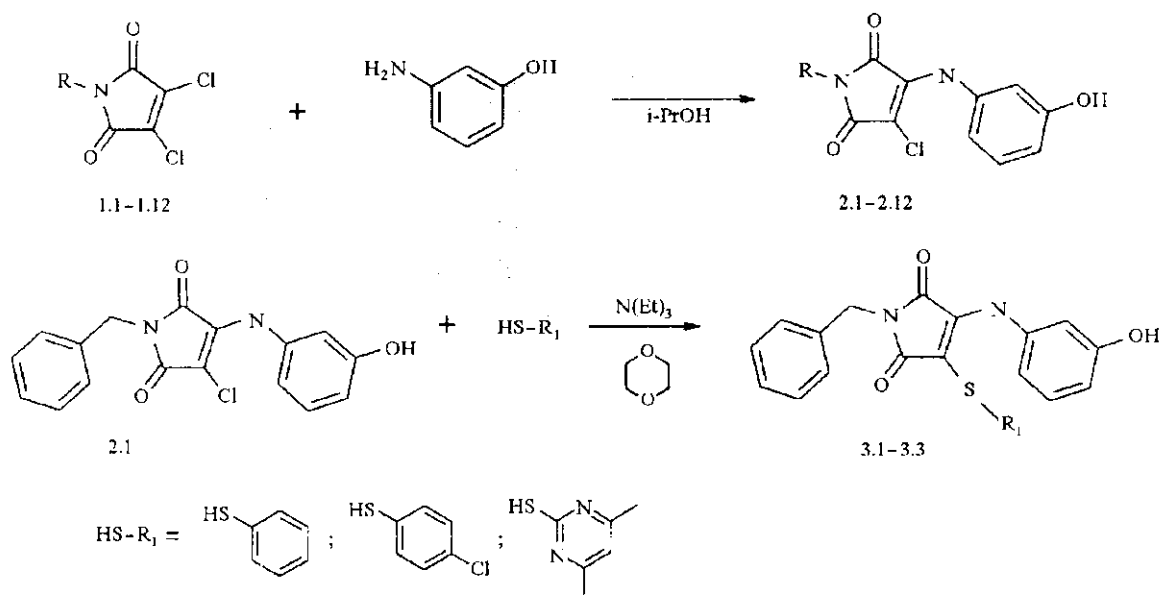


Схема синтезу

75-IR («Carl Zeiss», Німеччина) та Pye Unicam («Phillips», Нідерланди) в області 4000—400 см⁻¹ у таблетках KBr.

Спектри ПМР записано в ДМСО-D₆ на приладі «Varian» (США) з робочою частотою 300 МГц і внутрішнім стандартом тетраметилсиланом.

Величини хімічних зсувів визначали з точністю до 0,001 м. ч.

1-R-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролідіони (2.1—2.12) синтезовано за методикою [5]. Виходи склали 70—95 %.

Методика синтезу 1-бензил-3-(3-гідроксіаніліно)-4-(4-R1-фенілсульфаніл)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролідіонів 3.1—3.3. До розчину 1 г (3 ммоль) сполуки 1 у 15 мл діоксану додавали 4,5 ммоль відповідного тіофенолу або 2-меркапто-4,6-диметилпіримідину та 0,46 г (4,5 ммоль) триетиламіну. Суміш кип'ятили протягом 3 год, розчинник випаровували у вакуумі, сухий залишок перекристалізували із спирту. Виходи сполук 3.1—3.3 були відповідно 79, 82 та 75 %.

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

На першому етапі виконували прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (рак молочної залози, рак легенів, рак центральної нервової системи (ЦНС)) при одній стандартній концентрації речовини 10⁻⁴ М.

Біологічне тестування відібраних на основі прескринінгу речовин проводили на 52 лініях ракових клітин людини при п'яти різних концентраціях речовини (10⁻⁸—10⁻⁴ М) для з'ясування найоптимальнішої з них.

Ефективність дії речовини на клітинну лінію розраховували відповідно до рівнянь, які наведено в попередній статті [5].

Результати і обговорення. Нами синтезовано і тестовано на протипухлинну активність 14 похідних 3-заміщених-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролідіону 2.2—2.12, 3.1—3.3. Результати прескринінгу, хімічні структури (або назви) замісників R; R₁ сполук 2.1—2.12, 3.1—3.3 подано на на схемі та в табл. 1.

Сполуки 2.2, 2.5, 2.6, 2.8—2.12, 3.1, 3.2 успішно пройшли етап прескринінгу, для них тотальна мітотична активність хоча б для однієї з трьох культур клітин складала менше, ніж 32 %, порівняно з контролем. Ці сполуки було відібрано для подальшого тестування на 52 лініях пухлинних клітин людини (табл. 2).

Для тестованого ряду 14 похідних 3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролідіону 2.2—2.12, 3.1—3.3 можна зробити деякі висновки щодо взаємозв'язку структури речовини з її активністю. Заміна бензильного замісника у базовій активній структурі 2.1 (R = CH₂Ph) на фенетильний, тобто подовження ланцюга між ядром малейміду і фенілу на метиленову групу, зменшує

Таблиця 1

Результати прескринінгу досліджуваних сполук на протиракову активність

Номер структури	Замісник	Мітотична активність порівняно з контролем, %			Висновок
		Рак молочної залози	Рак легенів	Рак центральної нервової системи	
2.1	R = CH ₂ Ph	1	4	18	Активна
2.2	R = CH ₂ CH ₂ Ph	57	19	71	Активна
2.3	R = H	63	61	73	Неактивна
2.4	R = (4'-OCH ₃)Ph	89	46	99	Неактивна
2.5	R = (2'-Cl)Ph	89	28	76	Активна
2.6	R = (3'-Cl)Ph	15	1	20	Активна
2.7	R = (4'-Cl)Ph	68	44	64	Неактивна
2.8	R = (2', 3'-Cl ₂)Ph	1	1	11	Активна
2.9	R = (2', 4'-Cl ₂)Ph	1	1	5	Активна
2.10	R = (3', 4'-Cl ₂)Ph	1	1	1	Активна
2.11	R = (3'-Cl-4'-CH ₃)Ph	1	1	1	Активна
2.12	R = (2'-OCH ₃ -5'-Cl)Ph	27	11	24	Активна
3.1	R ₁ = Ph	2	0	3	Активна
3.2	R ₁ = (4'-Cl)Ph	1	0	0	Активна
3.3	R ₁ = -2-(4', 6'-(CH ₃) ₂)-піримідин	78	68	87	Неактивна

цитотоксичну активність (R = CH₂CH₂Ph, сполука 2.2) майже на всіх досліджуваних клітинних лініях пухлин. Відсутність замісника в положенні 1 малеїмїду призводить до втрати активності (R = H, сполука 2.3). Серед 1-фенілзаміщених похідних наявність замісника в *para*-положенні фенілу як донорського (R = (4'-OCH₃)-Ph, сполука 2.4), так і акцепторного (R = (4'-Cl)-Ph, сполука 2.7), спричинює втрату активності. Сполуки 2.5, 2.6, що мають атом хлору в *ortho*- або *meta*-положенні фенілу, мають меншу цитотоксичну активність, ніж дихлорзаміщені похідні. Для клітинної лінії CCRF-CEM (лейкемія) із всіх тестованих сполук найбільший ефект продемонструвала сполука 2.5 (GI₅₀ = 1,48 мкМ, TGI = 19,6 мкМ). Серед дихлорзаміщених похідних найвищу активність на декількох клітинних лініях виявлено у 2,3-дихлорфенілпохідного (сполука 2.8): GI₅₀ = 0,57 мкМ, TGI = 10,3 мкМ, LC₅₀ = 48,3 мкМ (SR, лейкемія); GI₅₀ = 0,26 мкМ, TGI = 5,91 мкМ, LC₅₀ = 100 мкМ (НОР-92, рак легенів); TGI = 0,75 мкМ, LC₅₀ = 28,2 мкМ (OVCAR-3, рак яєчників). 2,4-Дихлорта 3,4-дихлорфенілпохідні (сполуки 2.9, 2.10) мають значно менший цитотоксичний вплив на клітини пухлин.

Для клітинної лінії RXF 393 (рак нирок) найкращий результат показала сполука 2.11 — 3-хлор-4-метилфеніл-похідне: GI₅₀ для неї становить 0,55 мкМ, TGI — 22,2 мкМ, LC₅₀ — 62,9 мкМ, тобто наявність в *para*-положенні фенілу метильної групи значно підсилила цитотоксичний ефект порівняно з 3-хлорфенілпохідним.

Заміна атома хлору у третьому положенні малеїмїдного циклу базової активної структури 2.1 на 2-тіо-4,6-диметилпіримідин (сполука 3.3) спричинює втрату протипухлинної активності. Заміна атома хлору на тіофеноли (сполуки 3.1, 3.2) підвищує цитотоксичну дію на клітини пухлин. Особливо зростає протипухлинна активність при введенні незаміщеного тіофенолу на відміну від 4-хлорзаміщеного. Сполука 3.1 показала найкращу активність серед тестованих сполук на декількох клітинних лініях пухлин: GI₅₀ < 0,01 мкМ, TGI = 16,8 мкМ, LC₅₀ = 63,0 мкМ (TK-10, рак нирок); GI₅₀ = 1,36 мкМ, TGI = 4,07 мкМ, LC₅₀ = 15,5 мкМ (RPMI-8226, лейкемія); GI₅₀ = 1,84 мкМ, TGI = 19,9 мкМ, LC₅₀ = 100 мкМ (T-47D, рак молочної залози).

Отже, шляхом хімічної оптимізації активної структури 2.1 — 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіані-

Таблиця 2
Результати тестування досліджуваних сполук на деяких лініях ракових клітин людини

Клітинна лінія пухлин	Активність	Концентрація сполук, мкМ										
		2.1	2.2	2.5	2.6	2.8	2.9	2.10	2.11	2.12	3.1	3.2
CCRF-CEM (лейкемія)	GI ₅₀	8,98	12,6	1,48	10,7	8,38	17,5	25,2	18,5	14,15	1,88	4,08
	TGI	49,1	69,4	19,6	31,8	50,04	46,9	74,6	46,7	43,8	10,1	34,8
	LC ₅₀	> 100	> 100	> 100	94,9	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	33,5	> 100
K-562 (лейкемія)	GI ₅₀	5,45	16,8	25,0	29,8	13,5	22,0	25,5	18,9	18,5	3,71	3,81
	TGI	> 100	63,9	63,2	79,0	29,6	58,1	> 100	52,8	46,2	17,1	29,6
	LC ₅₀	> 100	> 100	> 100	> 100	64,6	> 100	> 100	> 100	> 100	47,8	> 100
MOLT-4 (лейкемія)	GI ₅₀	5,61	9,4	15,8	23,0	2,31	7,32	15,1	3,13	15,4	2,78	3,05
	TGI	72,7	59,0	38,1	71,4	11,8	33,0	> 100	21,2	49,4	12,3	28,3
	LC ₅₀	> 100	> 100	91,4	> 100	53,1	> 100	> 100	> 100	> 100	40,1	> 100
RPMI-8226 (лейкемія)	GI ₅₀	6,08	5,03	10,4	12,8	1,56	7,32	15,9	3,95	7,01	1,36	2,23
	TGI	29,8	37,6	35,1	34,3	16,2	33,0	57,7	28,6	32,3	4,07	7,42
	LC ₅₀	> 100	> 100	> 100	92,0	57,4	> 100	> 100	> 100	> 100	15,5	> 100
SR (лейкемія)	GI ₅₀	3,37	4,61	7,00	27,0	0,57	2,76	14,2	8,07	13,8	4,74	3,41
	TGI	22,3	64,3	40,2	> 100	10,3	26,9	67,0	30,4	54,5	21,2	14,1
	LC ₅₀	> 100	> 100	> 100	> 100	48,3	> 100	> 100	> 100	> 100	71,2	> 100
HOP-92 (рак лег- генів)	GI ₅₀	12,9	15,9	—	—	0,26	—	21,8	15,7	—	—	4,73
	TGI	30,0	36,4	—	—	5,91	—	70,5	37,6	—	—	30,7
	LC ₅₀	69,8	83,5	—	—	> 100	—	> 100	89,8	—	—	> 100
RXF 393 (рак нирок)	GI ₅₀	6,11	25,9	7,87	25,5	18,4	17,0	14,5	0,55	7,36	5,07	3,90
	TGI	23,4	71,4	41,2	> 100	42,4	67,3	42,2	22,2	29,0	25,6	21,2
	LC ₅₀	66,3	> 100	> 100	> 100	97,5	> 100	> 100	62,9	94,6	> 100	> 100
TK-10 (рак нирок)	GI ₅₀	17,6	23,1	> 100	> 100	20,2	> 100	25,7	18,5	11,3	< 0,01	16,7
	TGI	34,1	48,4	> 100	> 100	80,0	> 100	63,8	33,4	31,9	16,8	31,8
	LC ₅₀	66,2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	60,0	89,8	63,0	60,7
MCF7 (рак молочної залози)	GI ₅₀	16,4	14,4	29,8	36,0	13,7	19,8	25,1	6,16	19,2	6,87	5,86
	TGI	38,5	33,6	> 100	> 100	42,7	63,3	85,1	32,0	41,5	22,8	> 100
	LC ₅₀	89,9	78,2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	89,5	64,1	> 100
T-47D (рак молочної залози)	GI ₅₀	12,7	40,5	32,3	67,2	16,8	43,6	41,0	49,6	22,6	1,84	29,1
	TGI	38,9	> 100	> 100	> 100	86,3	> 100	> 100	> 100	> 100	19,9	> 100
	LC ₅₀	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
SAKI-1 (рак нирок)	GI ₅₀	11,9	22,5	40,3	49,9	3,14	12,9	22,8	17,0	19,2	21,6	18,6
	TGI	26,9	56,3	> 100	> 100	20,2	45,0	59,1	34,6	55,2	55,2	38,9
	LC ₅₀	60,8	> 100	> 100	> 100	62,3	> 100	> 100	70,3	> 100	> 100	81,1
OVCAR-3 (рак яєчників)	GI ₅₀	3,35	15,4	21,5	22,3	—	—	17,9	15,3	11,5	4,83	10,6
	TGI	12,1	34,3	48,5	64,1	0,75	32,3	36,4	28,9	36,5	19,9	28,2
	LC ₅₀	37,6	76,1	> 100	> 100	28,2	75,3	74,1	54,7	> 100	60,1	75,2
MDA-MB- 231/ATCC (рак молоч- ної залози)	GI ₅₀	10,4	23,3	5,68	35,8	12,3	23,3	—	—	—	—	—
	TGI	31,4	44,4	42,4	> 100	34,2	77,5	—	—	29,2	—	—
	LC ₅₀	94,3	84,5	> 100	> 100	95,2	95,2	—	—	81,6	—	—
HS 578T (рак молоч- ної залози)	GI ₅₀	15,3	17,5	21,0	29,3	1,71	—	20,5	17,4	15,8	11,5	13,3
	TGI	46,8	40,5	77,7	> 100	14,4	—	54,3	42,1	46,2	43,8	58,1
	LC ₅₀	> 100	93,9	> 100	> 100	55,9	—	95,2	> 100	> 100	> 100	> 100

*GI₅₀ — концентрація досліджуваної речовини (мкМ), за якої ріст ракових клітин зменшується вдвічі порівняно з контролем; TGI — концентрація, за якої росту ракових клітин не спостерігається; LC₅₀ — концентрація, при якій половина ракових клітин гине.

ліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону, а саме — варіюванням замісників у положеннях 1 і 3 малеїмідного циклу синтезовано і тестовано 14 сполук. Дві з цих сполук виявилися найперспективнішими: 1-(2,3-дихлорфеніл)-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)

-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіон (2.8) та 1-бензил-3-(3-гідроксіаніліно)-4-фенілсульфаніл-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіон (3.1) — вони пригнічують ріст деяких клітинних ліній пухлин із GI₅₀ < 0,5 · 10⁻⁷ та < 10⁻⁸ М.

S. S. Tarnavsky, G. G. Dubinina, S. M. Golovach, S. M. Yarmoluk
Antitumor activity among derivatives of the 3-chloro-4-(3-hydroxyanilino)-2,5-dihydropyrrole-2,5-dione

Summary

Fourteen derivatives of the 3-chloro-4-(3-hydroxyanilino)-2,5-dihydropyrrole-2,5-dione with various substituents at 1 and 3 positions of maleimide cycle have been synthesized and tested for antitumor activity in vitro. Ten compounds have been selected after pre-screening and tested on 52 human tumor cell lines. It has been revealed that 1-(2,3-dichlorophenyl)-3-chloro-4-(3-hydroxyanilino)-2,5-dihydro-1H-2,5-pyrroledione and 1-benzyl-3-(3-hydroxyanilino)-4-phenylsulfanyl-2,5-dihydro-1H-2,5-pyrroledione suppress growth of some cancer cell lines with $GI_{50} < 0.5 \cdot 10^{-7}$ M and 10^{-8} M.

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

Взаимосвязь противоопухолевой активности со структурой производных 3-хлоро-4-(3-гидроксианилино)-2,5-дигидро-1H-2,5-пирролдиона

Резюме

Синтезированы и тестированы на противоопухолевую активность (in vitro) 14 производных 3-хлоро-4-(3-гидроксианилино)-2,5-дигидро-1H-2,5-пирролдиона с варьированием заместителей в 1 и 3 положениях малеимидного цикла. 10 соединений отобраны по результатам прескрининга и тестированы на 52

линиях раковых клеток человека. Выявлено, что 1-(2,3-дихлорфенил)-3-хлоро-4-(3-гидроксианилино)-2,5-дигидро-1H-2,5-пирролдион и 1-бензил-3-(3-гидроксианилино)-4-фенилсульфанил-2,5-дигидро-1H-2,5-пирролдион угнетают рост некоторых клеточных линий опухолей с $GI_{50} < 0,5 \cdot 10^{-7}$ и $< 10^{-8}$ М.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fisher P. M., Lane D. P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics // *Cur. Med. Chem.*—2000.—7.—P. 1213—1245.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
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.—19, N 3.—С. 287—291.

УДК 547.745:576.385.5
Надійшла до редакції 03.09.03