

Інгібітори циклін-залежних кіназ. Синтез комбінаторних бібліотек 8-алкіламінометильних похідних 3-арилокси-7-гідроксихромонів та вивчення їхньої протиракової активності

В. В. Архіпов, А. О. Приходько, А. Г. Голуб, В. П. Хиля¹, С. М. Ярмолюк

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

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

Циклін-залежні кінази (CDK) відіграють важливу роль у регуляції клітинного циклу. CDK використовуються як мішені для пошуку протиракових препаратів. У даній роботі здійснено синтез похідних 3-арилокси-7-гідрокси-8-алкіламінометилхромонів, потенційних інгібіторів CDK. Біологічне тестування синтезованих речовин на протиракову активність виконано на 60 лініях ракових клітин людини. Результати тестування для чотирьох речовин показали здатність пригнічувати поділ та ріст ракових клітин.

Вступ. Наукові дослідження, пов'язані з пошуком нових антиракових препаратів, досить динамічно розвиваються у фармацевтичній хімії. Біологічна дія більшості препаратів з широким клінічним застосуванням ґрунтується: 1) на прямому пошкодженні дезоксирибонуклеїнових кислот (ДНК); 2) непрямому блокуванні синтезу ДНК через пригнічення біосинтезу попередників ДНК; 3) порушенні гормональної стимуляції та клітинного росту. На жаль, широкомасштабні спроби модифікувати і хімічно удосконалити ці підходи для підвищення їхньої ефективності закінчилися поразкою [1].

Протягом останніх років увага хіміків-фармацевтів зосередилася на білках, що керують клітинним циклом, так званих циклін-залежних кіназах (CDK, cyclin-dependent kinases). CDK активують ряд клітинних білків через фосфорилування залишків амінокислот серину і треоніну з використанням аденозинтрифосфату (АТФ) як донора фосфатного залишку. Ріст ракових пухлин тісно пов'язаний з позитивною та негативною регуляцією активності CDK у клітині. Внаслідок цього

інгібітори CDK є принципово новими антинеопластичними агентами, які дозволяють уникати загальних ефектів токсичності, що спостерігаються при використанні цитостатичних ліків.

Флавоноїди відіграють значну роль у рослинній фізіології і активно впливають на метаболізм людини, потрапляючи до організму людини через їжу. Серед відомих аналогів ізофлавонів знайдено препарати з високою гіполіпідемічною і аналептичною [2, 3], антиоксидантною [2], жовчогінною [3] та гепатозахисною [4] дією. Деякі природні флавоноїди є досить ефективними інгібіторами кіназ і, отже, потенційними протекторами проти канцерогенезу [2], зокрема, кверцетин, рохітукін, флавоноцтова кислота та флавопіридол (рис. 1). Рентгеноструктурні дослідження комплексів флавоноїдів з CDK показали, що даний клас сполук взаємодіє з кіназами через АТФ-зв'язуючий сайт [5].

Протягом останнього часу здійснюється інтенсивний пошук інгібіторів кіназ з використанням сучасних технологій створення ліків (drug design): комп'ютерного моделювання, комбінаторної хімії та високоефективного скринінгу. Відомо декілька класів хімічних сполук, що пригнічують активність

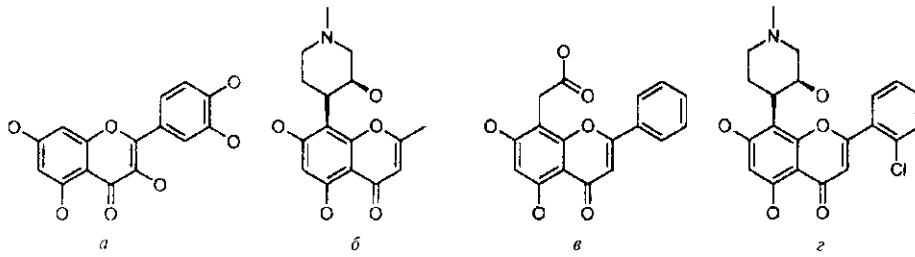


Рис. 1. Структурні формули представників інгібіторів CDK серед флавоноїдів: а — кверцетин; б — рохітукін; в — флавоноцтова кислота; г — флавопіридол

CDK: паулони, стауроспорини, індигоїди, інденопіразоли, похідні пуринів, піримідинів та ряд пептидних похідних [6—11]. Проте флавоноїди — це один з найперспективніших класів хімічних сполук для пошуку інгібіторів CDK.

У своїй переважній більшості флавоноїди є досить слабкими інгібіторами CD-кіназ ($IC_{50} > 100$ мкМ). У той же час протиракова активність природних флавоноїдів мирецетину ($IC_{50} > 10$ мкМ) та рохітукіну (рис. 1), очевидно, значною мірою зумовлена пригніченням CDK [12]. Флавопіридол — найкращий інгібітор CDK ($IC_{50} = 0,4$ мкМ, CDK2/cyclin A), є найбільш наближеним до клінічної практики флавоноїдом (фаза II клінічних досліджень) для лікування рефракторної мієломи та прогресуючої карциноми шлунку [13].

Метою нашого дослідження був пошук «провідної сполуки» (lead compound) для пригнічення CDK з використанням хромонового каркасу (template). Комбінаторні бібліотеки синтезували на основі структурних аналогів ізофлавоноїдів — похідних 3-арилокси-7-гідрокси-8-алкіламінометилхромонів.

Матеріали і методи. Температуру топлення сполук визначали на приладі Тіле. Спектри ЯМР H^1 записано на спектрометрі «Varian» (США) (300 МГц) у ДМСО- D_6 та дейтерохлороформі.

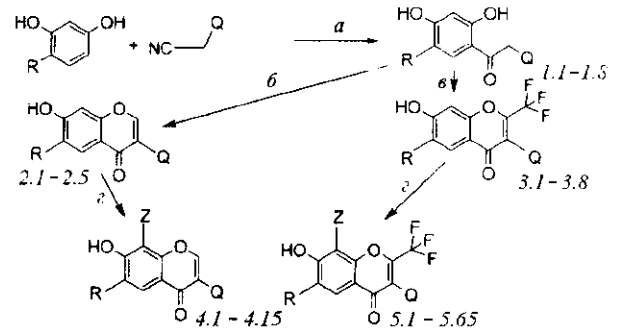
Чистоту отриманих сполук та перебіг реакцій контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках «Merck» (Німеччина) у системі розчинників хлороформ:метанол (9:1).

Для синтезу використовували реагенти фірм «Fluka» (Швейцарія), «Aldrich» (США) та розчинники фірми «Сінбіас» (Україна) з вмістом основної речовини 97—99 %.

Біологічні дослідження синтезованих сполук проводили у співпраці з Національним інститутом раку, США (National Cancer Institute, USA).

Точки топлення, виходи сполук та спектральні характеристики наведено на сайті: <http://www.yarmoluk.org.ua/publications>.

Результати і обговорення. Хімічний синтез. Синтез проводили за загальною схемою:



Реакційні умови:

а - $ZnCl_2$, діетиловий етер, $0^\circ C$, HCl ;

б - DMFA, етерат трифтористого бору, $70-75^\circ C$, $POCl_3$;

в - сухий піридин, $0^\circ C$, $(CF_3CO)_2O$;

г - сухий діоксан, Z_2CH_2 , нагрівання.

З таблицею, що містить перелік та нумерацію отриманих сполук, можна ознайомитися на сайті: <http://www.yarmoluk.org.ua/publications>.

Вихідні сполуки для синтезу 3-арилоксільних похідних хронону — 2,4-дигідрокси- α -арилоксіацетофенони (1.1—1.8) — синтезовано в умовах реакції Губена—Геша за загальною методикою [14] з резорцину та відповідних арилоксіацетонітрилів.

Реакції 2,4-дигідрокси- α -арилоксіацетофенонів з реагентом Вільсмаера в диметилформаміді за присутності етерата трифтористого бору (за [14]) та трифтороцтовим ангідридом у піридині (за методикою [2]) проходили з утворенням 3-арилокси-7-гідроксіхромонів 2.1—2.5 та 2-трифторметил-3-арилокси-7-гідроксіхромонів 3.1—3.8 відповідно.

Подальша взаємодія синтезованих 3-арилокси-7-гідроксіхромонів з похідними біс-амінодіалкілметану та його циклічними аналогами у середовищі діоксану спричинила високі виходи відповідних похідних основ Маніха по 8-му положенню хромонового циклу (4.1—4.15 та 5.1—5.65).

Загальна методика синтезу 8-алкіламінометильних похідних хрононів 4.1—4.15 та 5.1—5.65. Суміш 10 ммоль відповідного 3-арилокси-7-гідроксіхромону та 11 ммоль відповідного біс-амінодіалкілметану кип'ятили в 20 мл сухого діоксану, контролюючи реакцію методом ТШХ. По закін-

Таблиця 1
Результати прескринінгу сполук 4.1–4.15 та 5.1–5.65 на протиракову активність

Номер структури	Мітотична активність порівняно з контролем, %			Показник	Номер структури	Мітотична активність порівняно з контролем, %			Показник
	Рак молочної залози	Рак легенів	Рак ЦНС			Рак молочної залози	Рак легенів	Рак ЦНС	
4.1	70	86	84	Неактивне	5.34	83	101	80	Неактивне
4.2	74	94	101	Неактивне	5.35	80	68	89	Неактивне
4.4	90	98	83	Неактивне	5.36	93	91	103	Неактивне
4.5	73	86	101	Неактивне	5.37	86	81	82	Неактивне
4.6	98	98	88	Неактивне	5.38	85	89	87	Неактивне
4.7	106	101	109	Неактивне	5.39	80	84	85	Неактивне
4.9	24	55	59	Активне	5.40	74	80	92	Неактивне
4.10	58	57	75	Неактивне	5.41	60	74	80	Неактивне
4.11	87	101	107	Неактивне	5.42	96	89	105	Неактивне
4.12	97	98	103	Неактивне	5.44	98	98	108	Неактивне
4.13	91	89	105	Неактивне	5.45	86	92	84	Неактивне
4.15	99	81	83	Неактивне	5.46	59	61	101	Неактивне
5.1	92	94	112	Неактивне	5.47	86	92	95	Неактивне
5.2	57	64	70	Неактивне	5.48	89	94	62	Неактивне
5.5	112	95	72	Неактивне	5.49	94	91	73	Неактивне
5.6	104	87	116	Неактивне	5.50	57	84	76	Неактивне
5.7	65	79	93	Неактивне	5.51	9	18	49	Активне
5.8	86	90	103	Неактивне	5.52	45	59	59	Неактивне
5.18	94	92	112	Неактивне	5.53	98	86	91	Неактивне
5.19	105	100	117	Неактивне	5.55	70	86	96	Неактивне
5.20	107	101	114	Неактивне	5.56	105	97	115	Неактивне
5.21	76	95	80	Неактивне	5.57	62	93	109	Неактивне
5.22	94	100	104	Неактивне	5.58	108	99	100	Неактивне
5.23	98	95	99	Неактивне	5.59	12	83	88	Активне
5.24	101	98	87	Неактивне	5.60	66	84	83	Неактивне
5.25	63	85	51	Неактивне	5.61	102	101	115	Неактивне
5.28	0	0	0	Активне	5.62	97	88	106	Неактивне
5.29	56	64	89	Неактивне	5.63	106	85	89	Неактивне
5.31	100	96	122	Неактивне	5.64	113	83	77	Неактивне
5.32	57	92	126	Неактивне	5.65	107	100	108	Неактивне
5.33	60	64	104	Неактивне					

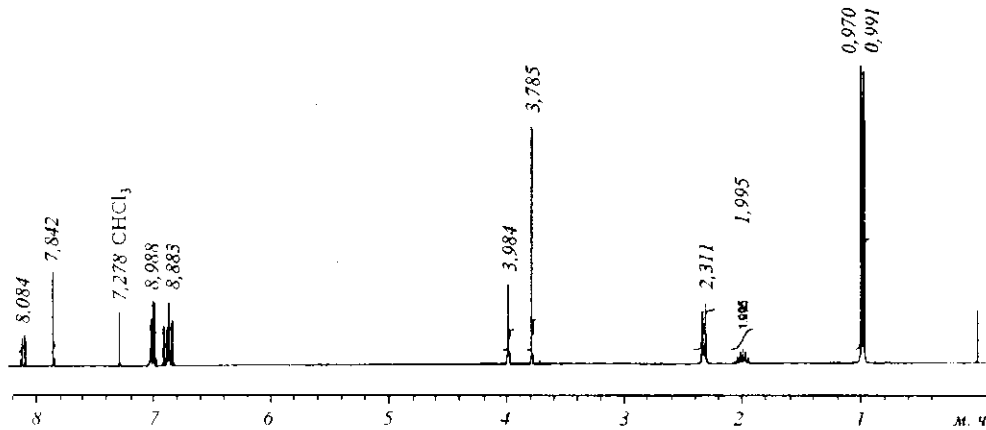
ченні реакції розчинник випаровували при пониженому тиску, залишок кристалізували з діетилового етеру.

Чистоту синтезованих сполук визначали за допомогою спектрів ЯМР Н¹ (рис. 2).

Біологічне тестування. Біологічне тестування синтезованих речовин здійснювали на 60 лініях ракових клітин людини. На першому етапі про-

дили прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (Breast, Non-Small Cell Lung, CNS) при одній стандартній концентрації речовини (табл. 1).

Чотири сполуки (4.9, 5.28, 5.51, 5.59) успішно пройшли етап прескринінгу, для них тотальна мітотична активність для, як мінімум, однієї культури клітин склала менше ніж 32 % порівняно з контролем. Дані сполуки було відібрано для по-

Рис. 2. ЯМР ^1H спектр сполуки 4.5 (300 МГц, CDCl_3)

Таблиця 2

Перелік ракових клітин, що були використані в біологічних тестах для сполук 4.9, 5.28, 5.51, 5.59

Клітини								
Лейкемія	Рак легенів	Рак товстої кишки	Рак ЦНС	Меланома	Рак яєчників	Рак шийки	Рак передміхурової залози	Рак молочної залози
HL-60 (ТВ	A549/ATCC	COLO205	SF-268	MALME-3M	IGROV-1	786-0	PC-3	MCF7
K-562	EKVX	HCC-2998	SF-295	MI4	OVCAR-3	A498	DU-145	NCI/ADR-RES
MOLT-4	HOP-62	HCT-116	SF-539	SK-MEL-2	OVCAR-4	CAKI-1	—	MDA-MB-231/ATCC
RPMI-8226	HOP-92	HT29	SNB-19	SK-MEL-28	OVCAR-5	RXF393	—	HS578T
—	NCI-H226	KM12	SNB-75	SK-MEL-5	SK-OV-3	SN12C	—	MDA-MB-435
—	NCI-H23	SW-620	U251	UACC-257	—	TK-10	—	MDA-N
—	NCI-H460	—	—	UACC-62	—	UO-31	—	T-47D
—	NCI-H522	—	—	—	—	—	—	—

дальшого тестування на 60 ліній пухлинних клітин людини (табл. 2). Структура активних сполук характеризується наявністю замісників з підвищеною гідрофобністю в положенні 3 хромонового циклу.

Окрім чотирьох активних сполук (4.9, 5.28, 5.51, 5.59), близький ефект показали структури 5.52, 5.50, 4.10, 5.29, 5.32: мітотична активність порівняно з контролем для хоча б однієї з трьох клітинних ліній не вища за 58 % (табл. 1).

Тестування проводили при п'яти різних концентраціях речовини (10^{-8} — 10^{-4} М) для з'ясування найефективнішої концентрації. Ефективність дії 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 тестується; $\{OD_{\text{ctrl}}\}$ — 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.

Найбільший цитостатичний ефект спостерігався при концентрації близько 10^{-5} М для кожної активної структури (рис. 1). Мітотична активність порівняно з контролем (%) для кожної з клітинних ліній після додавання вказаних речовин наведена на сайті <http://www.yarmoluk.org.ua/publications>.

Висновки. Вперше реалізовано комбінаторну

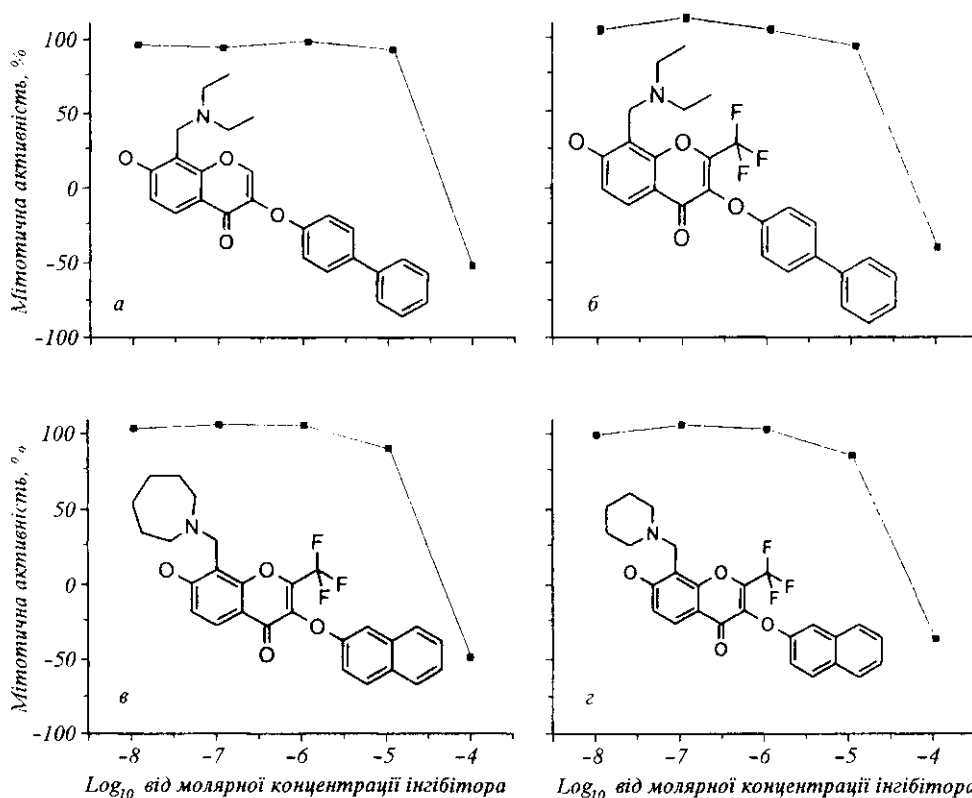


Рис. 3. Графіки залежності середніх значень мітотичної активності (%) від \log_{10} молярної концентрації речовин 4.9 (а), 5.28 (б), 5.51 (в), 5.59 (г)

схему синтезу основ Маніха на базі похідних 3-арилокси-7-гідроксихромону. Синтез алкіламінометильних похідних використано для створення комбінаторних бібліотек 3-арилоксихромонів завдяки високим виходам продуктів та їхній чистоті. Результати біологічних тестів на протиракову активність синтезованих основ Маніха свідчать про наявність чотирьох сполук, для яких спільною є наявність замісників з підвищеною гідрофобністю в положенні 3 хромонového циклу.

V. V. Arkhipov, A. O. Prikhod'ko, A. G. Golub, V. P. Khilya, S. M. Yarmoluk

Inhibitors of cyclin-dependent kinases. Synthesis of combinatorial libraries of 3-aryloxy-7-hydroxy-8-alkylaminomethylchromone derivatives and study on their anticancer activity

Summary

Cyclin-dependent kinases (CDK) play an important role in the cell cycle regulation. CDK are used as targets in a search for anticancer drugs. This study was aimed at the synthesis of 3-aryloxy-7-hydroxy-8-alkylaminomethylchromone derivatives, potential inhibitors of CDK. The antitumor activity of the compounds synthesized has been tested using 60 human tumor cell lines. 4 of the compounds tested have been revealed to inhibit the tumor cells proliferation.

V. V. Arkhipov, A. A. Prikhod'ko, A. G. Golub, V. P. Khilya, S. M. Yarmoluk

Inhibitors of cyclin-dependent kinases. Synthesis of combinatorial libraries of 8-alkylaminomethylchromone derivatives and study on their anticancer activity

Резюме

Циклін-зависимые киназы (CDK) играют важную роль в регуляции клеточного цикла. Их используют как мишени для поиска противораковых препаратов. В данной работе осуществлен синтез производных 3-арилокси-7-гидрокси-8-алкиламинометилхромонів, потенциальных ингибиторов CDK. Биологическое тестирование синтезированных веществ на противораковую активность выполнено на 60 линиях раковых клеток человека. Результаты тестирования для четырех веществ показали способность угнетать деление и рост раковых клеток.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Szelecki T. M., Boylan J. F., Benfield P. A., Trainor G. L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation // J. Med. Chem.—2000.—N 43.—P. 1—18.
2. Васильев С. А., Лукьянчиков М. С., Молчанов Г. И., Турубаров В. Д., Хилья В. П. Синтез и биологические свойства 3-феноксихромонів и 3-фенокси-4-гидрокси-7-метоксикумарина // Хим.-фарм. журн.—1991.—№ 7.—С. 34—38.
3. Огородничук А. С., Васильев С. А., Лехан И. Н., Хилья В.

- П., Шилин В. В. Синтез и свойства 3-фтор-фенокси-7-О-аминоацил хромонов // Биоорг. химия.—1991.—№ 7.—С. 1005—1007.
4. Горбуленко Н. В., Гайдук О. Н., Хиля В. П., Огородничук А. С., Шилин В. В. Аминокислотные производные бензимидазольных аналогов изофлавонов // ДАН УССР. Сер. Б.—1991.—№ 9.—С. 144—148.
 5. Graziani Y., Erikson E., Erikson R. The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product *in vitro* and *in vivo* // Eur. J. Biochem.—1983.—N 135.—P. 583—589.
 6. Fischer P. M., Lane D. P. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-cancer therapeutics // Curr. Med. Chem.—2000.—N 7.—P. 1213—1245.
 7. Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T. C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D., Schultz P. G. Exploiting chemical libraries structure, and genomics in the search for kinase inhibitors // Science.—1998.—N 281.—P. 533—538.
 8. Zaharevitz D. W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A. M., Lahusen T., Kunick K., Meijer L., Sausville E. A. Discovery and initial characterisation of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases // Cancer Res.—1999.—N 59.—P. 2566—2569.
 9. Lawrie A. M., Noble M. E., Tannah P., Brown N. R., Johnson N. Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK 2 // Nature Struct. Biol.—1997.—N 4.—P. 796—801.
 10. Hoessel R., Leclerc S., Endicott J. A., Nobel M. E., Lawrie A., Tannah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberger E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases // Nat. Cell Biol.—1999.—N 1.—P. 60—67.
 11. Nugiel D. A., Etzkorn A. M., Vidwans A., Benfield P. A., Boisclair M., Burton C. R., Cox S., Czerniak P. M., Doleniak D., Seitz S. P. Indenopyrazoles as novel cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors // J. Med. Chem.—2001.—N 44.—P. 1334—1336.
 12. Walker D. H. Small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinase: molecular tools and potential therapeutics // Microbiol. Immunol.—1998.—N 227.—P. 149—165.
 13. Senderowicz A. M., Headlee D., Stinson S. F., Lush R. M., Katil N., Villalba L., Hill K., Steinberg S. M., Figg W. D., Tompkins A., Arbuck S. G., Sausville E. A. Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms // J. Clin. Oncol.—1998.—N 16.—P. 2986—2999.
 14. Архунов В. В., Смирнов М. Н., Хиля В. П. Химия модифицированных флавоноидов. 19. Синтез феноксильных аналогов изофлавона // Химия гетероцикл. соединений.—1997.—№ 5.—С. 598—603.
 15. Гаразд М. М., Архунов В. В., Проскурка Н. К., Хиля В. П. Химия гетероаналогов изофлавонов. 23. Синтез аминокислотных производных 3-феноксихромона // Химия гетероцикл. соединений.—1999.—№ 6.—С. 744—748.

УДК 577.1

Надійшла до редакції 27.12.01