



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61626 (13) A

(51) 7 C07D207/444, 61K31/40

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ(54) СТРУКТУРИ АКТИВНИХ СПЛУК, ЩО МАЮТЬ ПРОТИПУХЛИННУ АКТИВНІСТЬ, В РЯДУ ПОХІДНИХ  
1-БЕНЗИЛ-3-ХЛОРО-4-АНІЛІНО-2,5-ДИГІДРО-1Н-2,5-ПІРОЛДІОНУ

1

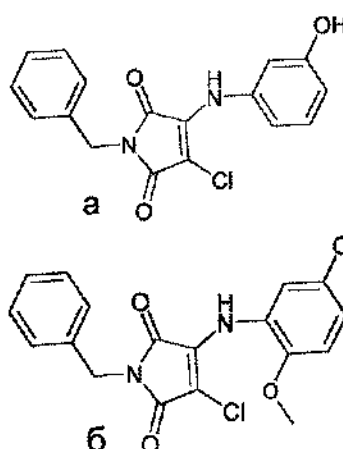
2

(21) 2003032383

(22) 19 03 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(72) Тарнавський Сергій Степанович, Головач  
Сергій Михайлович, Дубініна Галина Григорівна,  
Ярмолюк Сергій Миколайович(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕ-  
ТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) Структури активних сполук, що мають проти-  
пухлинну активність, в ряду похідних 1-бензил-3-  
хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону, а  
саме, 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксіаніліно)-2,5-  
дигідро-1Н-2,5-піролдіону (а) та 1-бензил-3-хлоро-  
4-(2-метокси-5-хлораніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-  
піролдіону (б), структурних формул

Пропонований винахід стосується гетероцик-  
лических сполук, а більш конкретно, активних спо-  
лук, що мають протипухлинну активність в ряду  
похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-  
1Н-2,5-піролдіону

У 1977р із стрептоміцетів (*Streptomyces*  
*staurosporeus*) був виділений стауроспорин, стру-  
ктура якого була пізніше доведена за допомогою  
рентгеноструктурного аналізу. Дослідження стау-  
роспорину показали, що він інгібує більшість ві-  
домих протеїн-кіназ, як серин-треонінових, так і  
тирозинових в низьких концентраціях та виявляє  
протиракову активність (*in vivo*). Саме це зумови-  
ло підвищений інтерес хіміків-синтетиків до син-  
тезу аналогів стауроспорину.

Переважає більшість робіт з хімії малеїмідів  
за останні десятиріччя була присвячена синтезу  
стауроспорину та його аналогів - 3,4-біс-  
індопілмалеїмідних похідних, що в багатьох ви-  
падах виявили вищу за стауроспорин специфіч-  
ність інгібуювання та протипухлинну активність.  
Важливим фармакофорним фрагментом цих  
сполук є N-H група малеїмідного циклу.

Синтетично одержані 7-гідроксистауроспорин  
та сполука NB-506 використовуються в клінічній

практиці як антиракові препарати, що діють як  
інгібітори відповідно цикліназалежних кіназ (CDKs)  
та топоізомери I.

Відомо, що деякі 3-заміщені N-арил- та N-  
алкіл-3-хлор-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіони мають  
антибактеріальну активність (*Staphylococcus*,  
*Escherichia Coli*) [7], але на протипухлинну актив-  
ність вони перевірені не були.

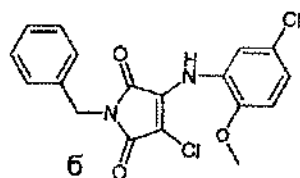
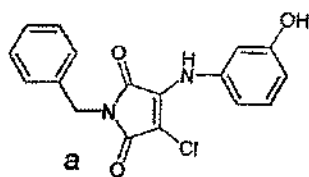
В основу пропонованого винаходу поставле-  
на задача виявлення активних структур в ряду  
похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-  
1Н-2,5-піролдіону, шляхом синтезу похідних 2,5-  
дигідропірол-2,5-діону з вар'юванням замісників в  
першому, третьому та четвертому положеннях  
пірольного циклу та визначення їх протипухлин-  
ної активності.

Поставлена задача вирішується пропонова-  
ними активними структурами в ряду похідних 1-  
бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1Н-2,5-  
піролдіону, а саме, 1-бензил-3-хлоро-4-(3-  
гідроксіаніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (а)  
та 1-бензил-3-хлоро-4-(2-метокси-5-хлораніліно)-  
2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (б), структурних  
формул (а) та (б), що мають протипухлинну акти-  
вність.

(13) A

(11) 61626

(19) UA



5 2

Синтезовані сполуки були тестовані на протипухлинну активність

Суть винаходу пояснюється за допомогою графічних матеріалів

На фіг 1 - показана схема синтезу

На фіг 2 - Графік залежності мітотичної активності від концентрації сполуки 5 2 (активна сполука а) для різних клітинних ліній пухлин

Матеріали і методи Контроль за проходженням реакції та чистотою синтезованих сполук здійснювався хроматографічне на пластинках "Silufol UV-254", елюент хлороформ - метанол (9 1) Структуру одержаних сполук доведено за допомогою ПМР, ІЧ-спектрів та елементного аналізу ІЧ спектри записані на приладах UR-20, Specord 75-IR та Pye Unicam в області 4000-400 см<sup>-1</sup> в таблетках KBr Спектри ПМР записані в DMSO-D<sub>6</sub> на приладі "Varian" з робочою частотою 300МГц і внутрішнім стандартом - тетраметилсиланом Величини хімічних зсувів визначались з точністю до 0 001м ч

Загальна методика синтезу 1-R-3-хлоро-4-NHR<sub>1</sub>-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіонів 5 1-5 24

До розчину 0 01 Моль відповідного дихлор-малеїмиду 4 у 50мл ізопропилового спирту додають 0 021 Моль відповідного аміну і кип'ятять 2 години, охолоджують, відфільтровують, промивають невеликою кількістю ізопропилового спирту та водою Одержані продукти хроматографічно чисті, при необхідності можуть бути перекристалізовані із ізопропилового або етилового спирту Виходи сполук 5 1-5 24-70-95%

Біологічне тестування Біологічне тестування синтезованих речовин проводилось на 56 лініях ракових клітин людини при 5-ти різних концентраціях речовини (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup>М) для з'ясування найбільш ефективної концентрації

На першому етапі здійснювався прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (Breast, Non-Small Cell Lung, CNS) при одній стандартній концентрації речовини - 10<sup>-4</sup>М (Таблиця 1)

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

1) При  $\{OD_{test}\} - \{OD_0\} \geq 0$

$$PG = 100 \times (\{OD_{test}\} - \{OD_0\}) / (\{OD_{ctrl}\} - \{OD_0\})$$

2) При  $\{OD_{test}\} - \{OD_0\} < 0$ , тоді

$$PG = 100 \times (\{OD_{test}\} - \{OD_0\}) / \{OD_0\}, \text{ де}$$

$\{OD_0\}$  - середнє значення вимірів оптичної густини одразу після додавання речовини,

$\{OD_{test}\}$  - середнє значення вимірів оптичної густини після 48 годинної інкубації клітин оброблених речовиною, що тестується,

$\{OD_{ctrl}\}$  - середнє значення вимірів оптичної густини після 48 годинної інкубації клітин без додавання речовини (контроль),

PG - Percentage Growth - рівень мітотичної активності клітинної лінії після обробки речовиною порівняно з контролем

На першому етапі здійснювався прескринінг сполук на трьох лініях ракових клітин (Breast (рак грудей), Non-Small Cell Lung (карцинома легенів), CNS (рак центральної нервової системи)) при одній стандартній концентрації речовини - 10<sup>-4</sup>М (Таблиця 1)

Результати Авторами синтезовано і тестовано на протипухлинну активність 39 похідних 2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону (малеїмиду) 5 1-9 2 (Схема синтезу) Результати прескринінгу, хімічні структури (або назви) замінників R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> сполук 5 1-9 2 наведені в Таблиці 1

Сполука 5 2 (активна сполука 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксианіліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіон (а)) успішно пройшла етап прескринінгу, для неї тотальна мітотична активність для всіх трьох культур клітин склапає менше ніж 32% порівняно з контролем Дана сполука була відібрана для подальшого тестування на 56 лініях пухлинних клітин людини (Таблиці 2, 3) Сполука 5 6 1-бензил-3-хлоро-4-(2-метокси-5-хлораніліно)-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіон (б) виявила меншу активність порівняно зі сполукою а Вона пригнічує проліферативну (мітотичну) активність ракових клітин відповідно на 51% (рак грудей), 61% (карцинома легенів) та 37% (ЦНС) при концентрації 1000М

Результати тестування сполуки 5 2 (активна сполука а) на 56 лініях пухлинних клітин представлені в Таблиці 3 та на фіг 2

Для тестованого ряду 39 похідних 2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону (малеїмиду) можна зробити деякі висновки стосовно залежності протипухлинної активності від структури сполуки Якщо в третьому положенні maleimide циклу сполуки 5 2 (Рис 3) замість m-гідрокси-анілінового фрагменту знаходиться залишок первинного або вторинного аліфатичного аміну (сполуки 5 1, 5 10-5 14, 5 18), то активність - відсутня Заміна -ОН (гідроксильної) групи в структурі 5 2 на -OCH<sub>3</sub> (метокси групу) (сполука 5 4) приводить до втрати активності Наявність -OCH<sub>3</sub> в 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'-диметокси похідне (сполука 5 8) - теж не активні Для сполуки 5 6 (N-CH<sub>2</sub>Ph, 2'-OCH<sub>3</sub>-5'-Cl) мітотична активність на клітинах раку легенів - 39%, тобто мітотична активність порівняно з контролем пригнічується на 61% Сполука 6 1, в якій відсутній бензильний замінник в положенні 1 maleimide циклу, а в положенні 3, як і в структурі 5 2, знаходиться залишок m-гідроксианіліну, виявляє лише невелике пригнічення мітотичної активності, тому є підстави вважати, що N-бензильний замінник maleimide циклу - критичний

Продукти аелювання 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 (малеїмїду) показало, що 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксианіліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіон 5 2 виявляє протипухлинну активність у низько мікромолярній концентрації. Для сполуки 5 2 (активна сполука а) знайдено  $GI_{50}$  2 68  $\mu$ M,  $LC_{50}$  31 7  $\mu$ M (клтинна лінія MDA-MB-435 (Breast Cancer)),  $GI_{50}$  3 35  $\mu$ M,  $LC_{50}$  37 6  $\mu$ M (клтинна лінія

OVCAR-3 (Ovarian Cancer)),  $GI_{50}$  6 75  $\mu$ M, 44 5  $\mu$ M (клтинна лінія NCI-H23 (Non-small Cell Lung Cancer))

Таким чином, в ряду 3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідропірол-2,5-діону знайдено протипухлинну активність. Протипухлинна активність виявлена у 1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксианіліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (1) та у 1-бензил-3-хлоро-4-(2-метокси-5-хлораніліно)-2,5-дигідро-1Н-2,5-піролдіону (2), що може бути використано для подальшої оптимізації активних структур і створенню на їх основі протипухлинних ліків.

Таблиця 1

Результати прескрінінгу сполук 5 1-9 2 на протиракову активність

Номер структури	Замісники	Мпотична активність порівняно з контролем, %			Висновок
		Breast (рак грудей)	Non-Small Cell Lung (карцинома легенів)	CNS (рак центральної нервової системи)	
5 1	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =циклогексил	125	119	113	Не активна
5 2 (а)	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(3'-OH) <sub>3</sub> Ph	1	4	18	Активна(а)
5 3	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(2'-OCH <sub>3</sub> )Ph	114	119	115	Не активна
5 4	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(3'-OCH <sub>3</sub> )Ph	130	114	118	Не активна
5 5	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(4'-OCH <sub>3</sub> )Ph	137	114	126	Не активна
5 6 (б)	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(2'-OCH <sub>3</sub> -5'-Cl)Ph	49	39	63	Активна(б)
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	Не активна
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	Не активна
5 9	R=CH <sub>2</sub> Ph, NHR <sub>1</sub> =N-(CH <sub>3</sub> )Ph	131	119	122	Не активна
5 10	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =тетрагідрофурфурил	116	111	114	Не активна
5 11	R=CH <sub>2</sub> Ph, NHR <sub>1</sub> =піперидин	94	97	106	Не активна
5 12	R=CH <sub>2</sub> Ph, NHR <sub>1</sub> =(4'-N-CH <sub>3</sub> )-піперазин	93	101	102	Не активна
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	Не активна
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	Не активна
5,15	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(2'-COOH)Ph	131	114	114	Не активна
5 16	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(3'-COOEt)Ph	126	111	117	Не активна
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-1Н-4'-піразоліл	125	115	120	Не активна
5 18	R=CH <sub>2</sub> Ph, NHR <sub>1</sub> =(4'-N-CH <sub>2</sub> Ph)-піперазин	115	109	132	Не активна
5 19	R=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(2'-OH)Ph	85	111	140	Не активна
5 20	R=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =(3'-C1-4'-CH <sub>3</sub> )Ph	94	109	140	Не активна
5 21	R=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =3'-морфолінопропіл	105	110	140	Не активна
5 22	R=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =тетрагідрофурфурил	107	104	126	Не активна
5 23	R=CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>1</sub> =піридилметил	103	98	113	Не активна
5 24	R=Ph, R <sub>1</sub> =4'-(N-(4'-OCH <sub>3</sub> Ph))бензамід	123	117	115	Не активна
6 1	R=H, R <sub>1</sub> =(3'-OH)Ph	63	61	73	Не активна
6 2	R=H, R <sub>1</sub> =(4'-OPh)Ph	64	67	76	Не активна
6 3	R=H, NHR <sub>1</sub> =тетрагідроізохінолін	127	100	129	Не активна
6 4	R=H, R <sub>1</sub> =4'-бензенсульфонамід	109	103	138	Не активна
6 5	R=H, NHR <sub>1</sub> =(4'-N-CH <sub>2</sub> Ph)-піперазин	123	100	144	Не активна
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	Не активна
8 1	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>3</sub> =2'-іофен	77	99	92	Не активна
8 2	R=Ph, R <sub>3</sub> =H	89	105	103	Не активна
8 3	R=(3'-C1-4'-CH <sub>3</sub> )Ph, R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>	111	99	131	Не активна
8 4	R=Ph, R <sub>3</sub> =PH	118	107	118	Не активна
8 5	R=Ph, R <sub>3</sub> =2'-іофен	106	109	138	Не активна
8 6	R=4'-OCH <sub>3</sub> Ph	121	111	142	Не активна
8 7	R=H	62	88	44	Не активна
9 1	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>4</sub> =H	100	105	106	Не активна
9 2	R=CH <sub>2</sub> Ph, R <sub>4</sub> =CH <sub>3</sub>	124	117	115	Не активна

Таблиця 2

Перелік ракових клітин, що були використані в біологічних тестах для сполуки 6 2 (активна сполука а)

Leukemia	Non-Small Cell Lung	Colon Cancer	CNS Cancer	Melanoma	Ovarian Cancer	Renal Cancer	Prostate Cancer	Breast Cancer
CCRF-CEM	A549/ATCC	COLO205	SF-268	MALME-3M	IGROV1	786-0	PC-3	MCF7
1-1L-60 (TB)	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	CAKJ-1		MDA-MB-231/ATCC
MOLT-4	HOP-92	HT29	SNB-19	SK-MEL-28	OVCAR-5	RXr 393		HS 578T
RPMI-8226	NCI-H226	KM 12	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			LOX IMVI		UO-31		
	NCI-H460			UACC-62				
	NCI-H522							

Таблиця 3

Результати тестування сполуки 5 2 (активна сполука а) на 56 ліній пухлинних клітин людини

(наведені результати досліджень з  $LC_{50} < 60 \mu M$ )

Клітинна лінія пухлини	$GI_{50}$ * ( $\mu M$ )	TGI ( $\mu M$ )	$LC_{50}$ ( $\mu M$ )
KM 12 (Colon Cancer)	10.8	25.3	59.3
LOX IMVI (Melanoma)	11.2	25.7	59.0
OVCAR-5 (Ovarian Cancer)	17.4	32.0	58.9
SNB-19 (CNS Cancer)	11.8	26.3	58.6
SN12C (Renal Cancer)	13.2	27.5	57.2
MALME-3M (Melanoma)	18.3	32.6	58.1
HCT-116 (Colon Cancer)	6.54	21.8	55.6
DU-145 (Prostate Cancer)	14.9	28.1	53.0
UACC-62 (Melanoma)	11.3	24.3	52.4
HOP-62 (Non-Small Cell Lung Cancer)	12.6	25.7	52.1
SF-539 (CNS Cancer)	12.6	25.4	51.3
SK-MEL-5 (Melanoma)	8.67	21.4	47.5
NCI-H23 (Non-Small Cell Lung Cancer)	6.75	19.8	44.5
OVCAR-3 (Ovarian Cancer)	3.35	12.1	37.6
MDA-MB-435 (Breast Cancer)	2.68	8.37	31.7

\* $GI_{50}$  - концентрація досліджуваної речовини ( $\mu M$ ), при якій ріст ракових клітин зменшується вдвічі порівняно з контролем, TGI - концентрація, при якій ріст ракових клітин не спостерігається,  $LC_{50}$  - концентрація, при якій половина ракових клітин гине

#### Перелік літератури

- Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakayawa A, Awaya J, Tsuchiya T, Takahashi Y, Masuma R. A new Alkaloid AM-2282 of streptomyces 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 Streptomyces Strain / J Chem Soc, Chem Commun - 1978 -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 Streptomyces Strain / Bull Chem Soc Jpn - 1982 - 55 - P 3681-3685

4 Fisher P. M, Lane D. P. Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases as Anti-Cancer Therapeutics // Cur Med Chem - 2000 - 7 - P 1213-1245

5 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

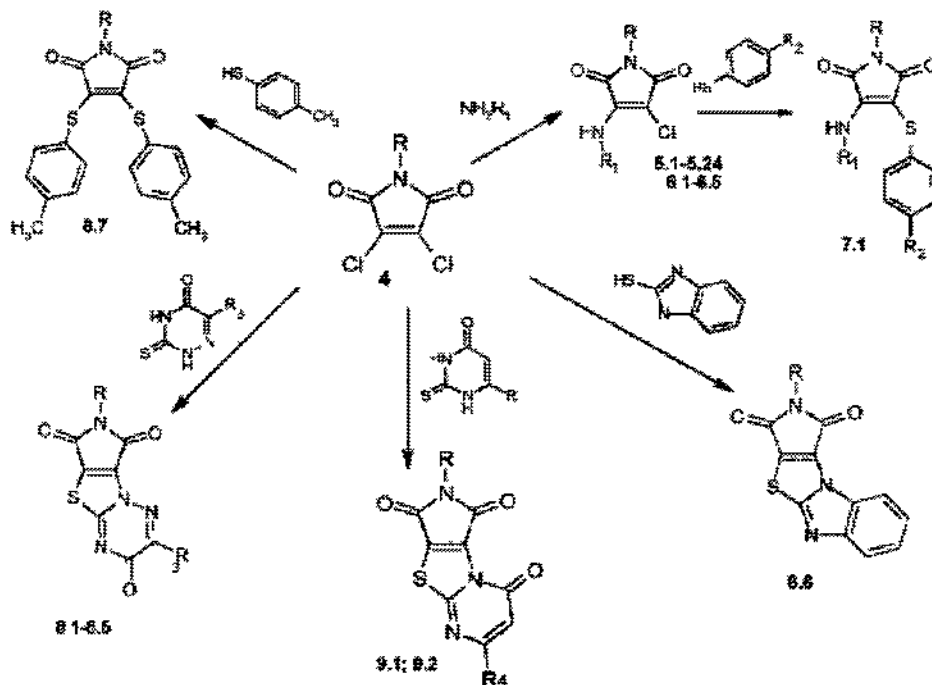
6 Bailly C, Qu X, Chaires J. B, Co/son P, Houssier C, Ohkubo M, Nishimura S, Yoshinori T. Substitution at the F-Ring N-Imide of the Indolocarbazole Antitumor Drug NB-506 Increases the Cytotoxicity, DNA Binding, and Topoisomerase I Inhibition Activities // J Med Chem - 1999 -42 - P 2927-2935

7 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

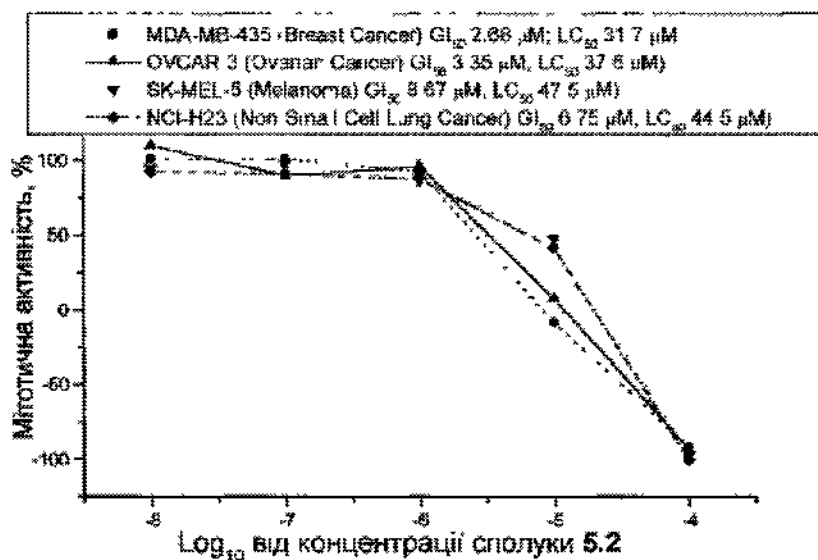
3,4-dichloromaleimides and 4-substituted 3-chloromaleimides // Quim Nova - 1998 -21, №5 -P 573-577

8 Дубініна Г. Г., Тарнавський С. С., Головач С. М., Ярмолюк С. М. Взаємодія 3,4-дихлормалеїмідів з N- та S-нуклеофілами // Укр

хим журн у друці Dubinina G. G., Volovenko Yu. M., Shishkina S. V., Shishkin O. V., Yarmoluk S. M. Reaction of N-substituted 3,4-dichloromaleimides with D-mercaptoazaheterocycles // Heterocycles - 2001 - Vol 55, № 11 - P 2189-2198



Фіг.1



Фіг.2