

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-3-10-16
© Коллектив авторов, 2018

С. С. Зыкова¹, Н. М. Игидов², А. В. Захматов², М. А. Киселев²,
А. Р. Галембикова³, Р. Р. Хуснутдинов³, П. Д. Дунаев³, С. В. Бойчук³,
И. Н. Чернов⁴, И. А. Родин⁵

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 2-АМИНО-1-АРИЛ-5-(3,3-ДИМЕТИЛ-2-ОКСОБУТИЛИДЕН)- 4-ОКСО-N-(ТИАЗОЛ-5-ИЛ)-4,5-ДИГИДРО-1H-ПИРРОЛ-3-КАРБОКСАМИДОВ

¹ ФКОУ ВО "Пермский институт ФСИН России", Россия, 614012, Пермь, ул. Карпинского, 125;
e-mail: zykova.SV@rambler.ru

² ФГБОУ ВО "Пермская государственная фармацевтическая академия", Россия, 614099,
Пермь, ул. Полевая, 2.

³ ФГБОУ ВО "Казанский государственный медицинский университет", Россия, 420012,
Казань, ул. Бутлерова, 49.

⁴ НИИ химии ФГАОУ ВО "Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского",
Россия, 603950, Н. Новгород, пр. Гагарина, 23, корп. 5.

⁵ ФГБОУ ВО "Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина",
Россия, 350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

Взаимодействием 4-ариламино-2-*трет*-бутил-2,5-дигидро-5-оксофуран-2-илацетатов (Ia – з) с 2-циано-N-(тиазол-2-ил)ацетамидом в присутствии триэтиламина синтезирован ряд новых производных 2-аминопиррола – 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазолил-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамиды (IIa – з). Исследована биологическая активность полученных соединений. Обнаружено, что синтезированные соединения обладают низкой токсичностью, а 2-амино-1-(2-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (IIб) и 2-амино-1-(2,4-дихлорфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (IIж) проявляют радикальскую активность, превышающую таковую тролокса, и цитотоксическую активность, обнаруженную по отношению к опухолевым клеточным линиям желудочно-кишечного тракта стромальных опухолей (ГИСО), в том числе резистентным к таргетному препарату иматинибу (гливеку). Цитотоксическая активность данных соединений сопоставима с действием химиопрепаратов доксорубинина и существенно превышает эффект эпопозида, паклитаксела и гидроксимочевина. Одним из возможных молекулярных механизмов действия вышеуказанных соединений является их способность нарушать процессы клеточного деления, индуцировать селективное накопление клеток в М-фазе клеточного цикла и последующую гибель по механизму "митотической катастрофы".

Ключевые слова: 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамиды; острая токсичность; цитотоксичность; желудочно-кишечные стромальные опухоли (ГИСО); химиопрепараты; химиорезистентность.

Несмотря на впечатляющие результаты применения таргетных препаратов в лечении больных онкологическими заболеваниями, в том числе больных с желудочно-кишечными стромальными опухолями (ГИСО) [1], у большинства пациентов развивается вторичная резистентность к данным препаратам, что существенно снижает эффективность их дальнейшего использования и негативно влияет на прогноз заболевания. Существует достаточное количество факторов, обуславливающих развитие у больных ГИСО вторичной резистентности к иматинибу (ИМ), основным из которых принято считать развитие вторичных мутаций генов *c-KIT* и *PDFRα* [2, 3]. Поэтому поиск новых эффективных средств терапии больных с

резистентными формами злокачественных новообразований является актуальной научно-практической задачей. Для проведения сравнительного анализа цитотоксической эффективности синтезированных нами соединений и их способности индуцировать гибель как ИМ-чувствительных, так и резистентных к ИМ клеток ГИСО, в нашей лаборатории был создан и охарактеризован клон клеток линии ГИСО Т-1 [4], обладающий фенотипическими и генотипическими признаками резистентности к таргетному препарату иматинибу.

Результаты исследований последних лет показали, что помимо таргетных препаратов, некоторые химиопрепараты, а также химические соединения, относя-

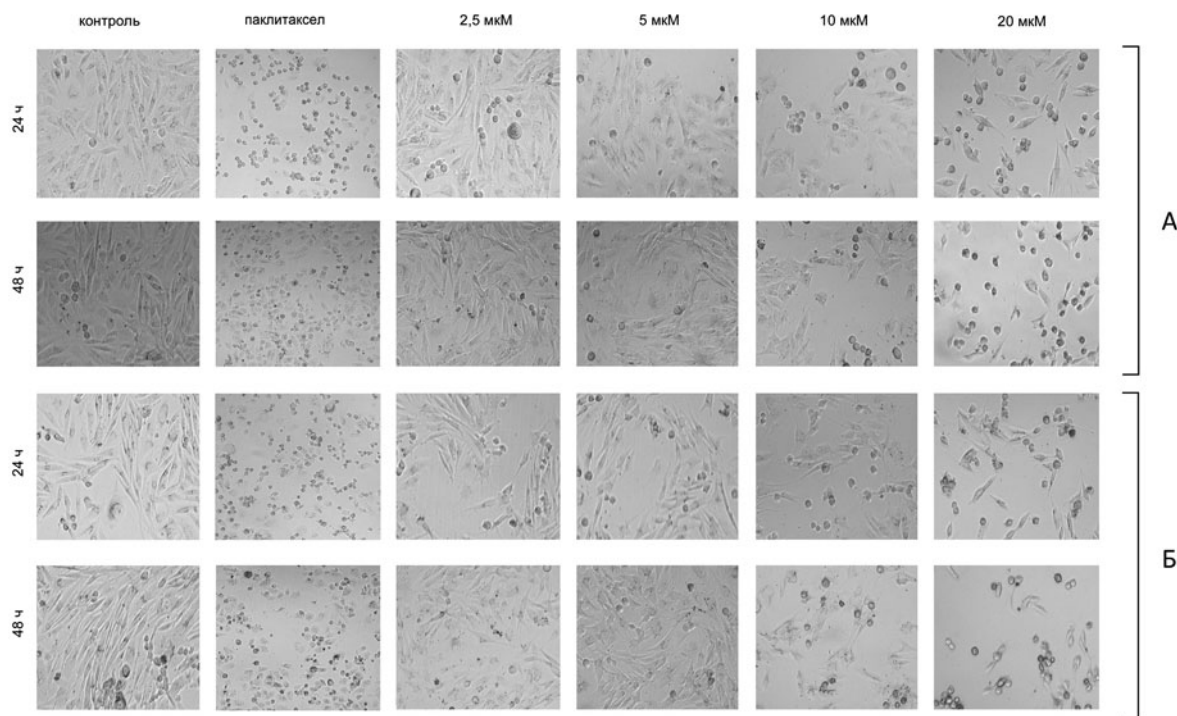


Рис. 1. Культивирование опухолевых клеток линии ГИСО Т-1 (а) и ГИСО Т-1Res (б) с паклитакселом (1 мкМ, положительный контроль) и соединением Пб (2,5 – 20 мкМ) приводит к дозо- и время-зависимой гибели опухолевых клеток. Контрольные пробы культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков (пенициллин-стрептомицин) без паклитаксела и соединения Пб.

щиеся к производным 2-аминопирролов, обладают цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток сарком мягких тканей, в том числе ГИСО [5 – 7].

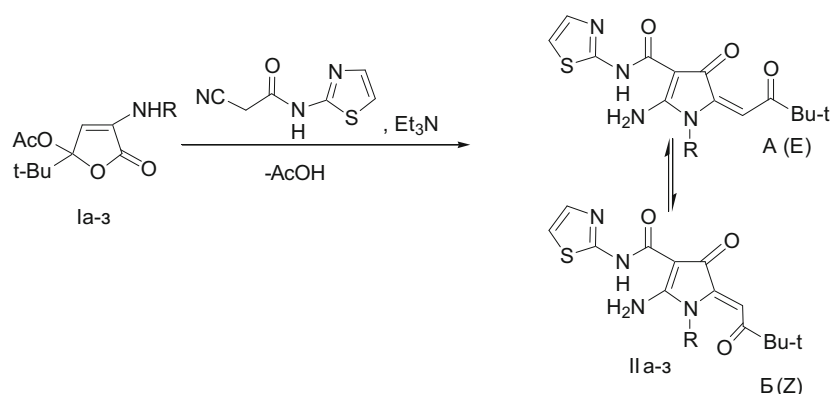
Ранее сообщалось о синтезе и цитотоксической активности производных 2-аминопиррола [8 – 11]. Синтез и фармакологические свойства производных 2-аминопиррола, имеющих гетариламидный фрагмент, в литературе не описаны. С целью продолжения поиска биологически активных соединений нами синтезирован ряд новых производных 2-аминопиррола — 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилен)-4-оксо-N-(тиазолил-5-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамиды (IIa – з) взаимодействием 4-ариламино-2-*трет*-бутил-2,5-дигидро-5-оксофуран-2-илацета-

тов (Ia – з) с 2-циано-N-(тиазол-2-ил)ацетамидом в присутствии триэтиламина в среде бензола.

Полученные соединения IIa – з — бесцветные кристаллические вещества, растворимые в ДМСО, диметилформамиде, трудно растворимые в спирте и не растворимые в воде.

В ИК-спектрах соединений II присутствуют полосы поглощения NH-групп при 3296 – 3336 см⁻¹, амидного карбонила при 1655 – 1702 см⁻¹, а также валентные колебания кетонных карбонил и двойной связи при 1617 – 1660 см⁻¹.

В спектрах ЯМР ¹H соединений II наблюдаются синглеты протонов группы NH амидного фрагмента при 11,48 – 11,13 м.д., аминогруппы при 8,87 – 8,45 и



R = 2-CH₃C₆H₄ (Ia, IIa); 2-BrC₆H₄ (Ib, IIb); 2-IC₆H₄ (Iв, IIв); 4-CH₃C₆H₄ (Iг, IIг); 4-BrC₆H₄ (Iд, IIд); 2,4-Br₂C₆H₃ (Iе, IIе); 2,4-Cl₂C₆H₃ (Iж, IIж); 2-CH₃-5-NO₂C₆H₃ (Iз, IIз).

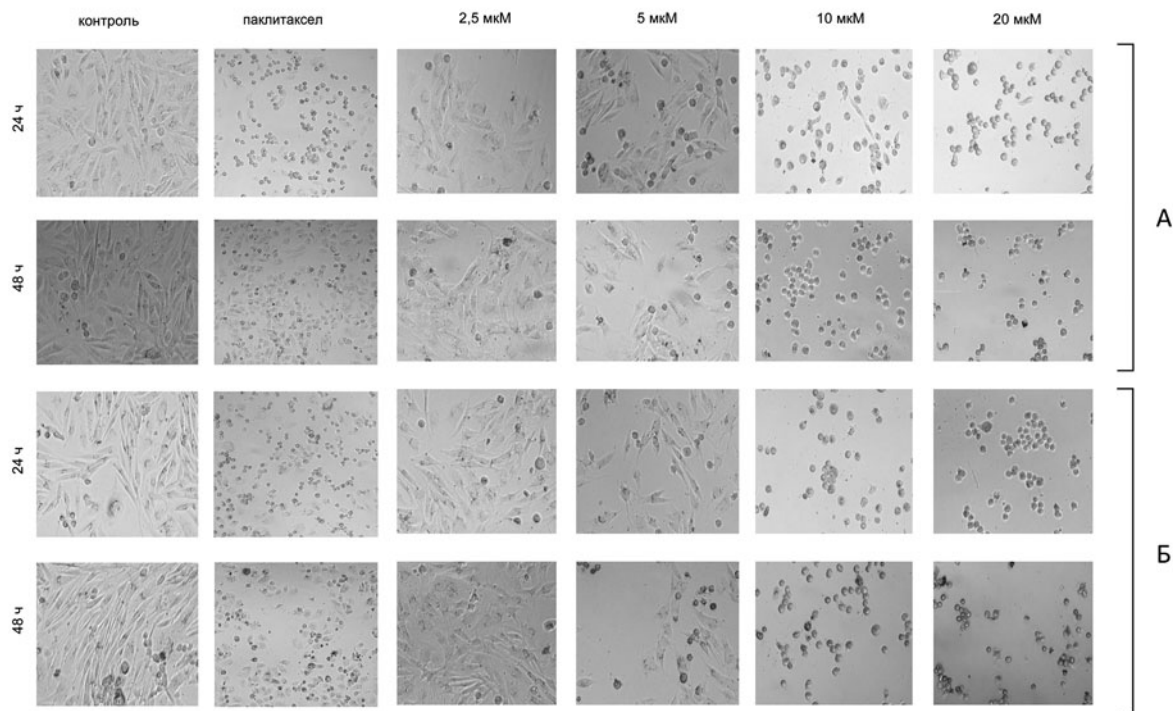


Рис. 2. Культивирование опухолевых клеток линии ГИСО Т-1 (*a*) и ГИСО Т-1Res (*б*) с паклитакселом (1 мкМ, положительный контроль) и соединением Пж (2,5 – 20 мкМ) приводит к дозо- и время-зависимой гибели опухолевых клеток. В качестве отрицательного контроля – опухолевые клетки, которые культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков (пенициллин-стрептомицин) без паклитаксела и соединения Пж.

8,54 – 8,23 м.д., сигналы ароматических протонов в виде мультиплета при 7,71 – 7,20 м.д., синглет винильного протона при 6,57 – 5,34 м.д., и синглет 9 протонов *трет*-бутильного заместителя при 1,13 – 0,90 м.д. По данным спектров ЯМР ^1H соединения (Пб, в, д, е, ж), существуют в растворах DMSO-d_6 в виде *Z*- и *E*-изомеров.

Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры записаны на приборах ФСМ-1201 в вазелиновом масле, спектры ЯМР ^1H – на приборах Bruker Avance III в DMSO-d_6 , рабочие частоты 400 МГц (^1H) и 100 МГц (^{13}C), внутренний стандарт –

остаточный сигнал от дейтерорастворителя и Tesla BS-567A (100 МГц) внутренний стандарт – ГМДС.

Масс-спектр соединения Пз снят на масс-спектрометре серии MicroTOF-Q II фирмы Bruker Daltonics (Бремен, Германия), оснащённым электроспрей источником ионизации, шестипортовым краном и устройством прямого ввода kd Scientific (скорость потока 180 мкл/ч). Химическую чистоту соединений и протекание реакций контролировали методом ТСХ на пластинках “Silufol 254 UV” в системе эфир – бензол – ацетон (10:9:1), пятна детектировали парами йода. Температуры плавления определяли на приборе SMP40.

Исходные 4-ариламино-2-*трет*-бутил-5-оксо-2,5-дигидрофуран-2-илацетаты (Ia-з) получены по методу [12].

Общая методика получения 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамидов (IIa – з). Растворяли 0,0025 моль соответствующего фуранона Ia – з и 0,42 г (0,0025 моль) 2-циано-N-(тиазол-2-ил)-ацетамида при нагревании в 60 мл бензола, добавляли 0,25 г (0,0025 моль) триэтиламина и кипятили в течение 20 – 30 минут, охлаждали. Выпавший осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из этанола или пропанола-2.

2-Амино-1-(2-метилфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (IIa). Выход 0,7 г (68 %), бесцветные кристаллы, $T_{\text{пл}}$ 134 – 135 °С. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 1,09 (с, 9H, Bu-t); 2,14 (с, 3H,

Таблица 1
Антирадикальная активность соединений IIa – з

Соединение	R	Убыль радикалов Q, %
IIa	2- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	61,44 ± 2,92*
IIб	2- BrC_6H_4	89,23 ± 2,18*
IIв	2- IC_6H_4	60,10 ± 3,74*
IIг	4- $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$	48,90 ± 1,31*
IIд	4- BrC_6H_4	55,83 ± 2,72
IIе	2,4-(Br) $_2\text{C}_6\text{H}_3$	37,26 ± 2,05
IIж	2,4-(Cl) $_2\text{C}_6\text{H}_3$	87,58 ± 3,24*
IIз	2- CH_3 – 5- $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_3$	60,31 ± 0,87
Ресвератрол	-	80,42 ± 0,73*
Тролокс	-	82,56 ± 0,20*

* Статистически значимые показатели при $p < 0,05$.

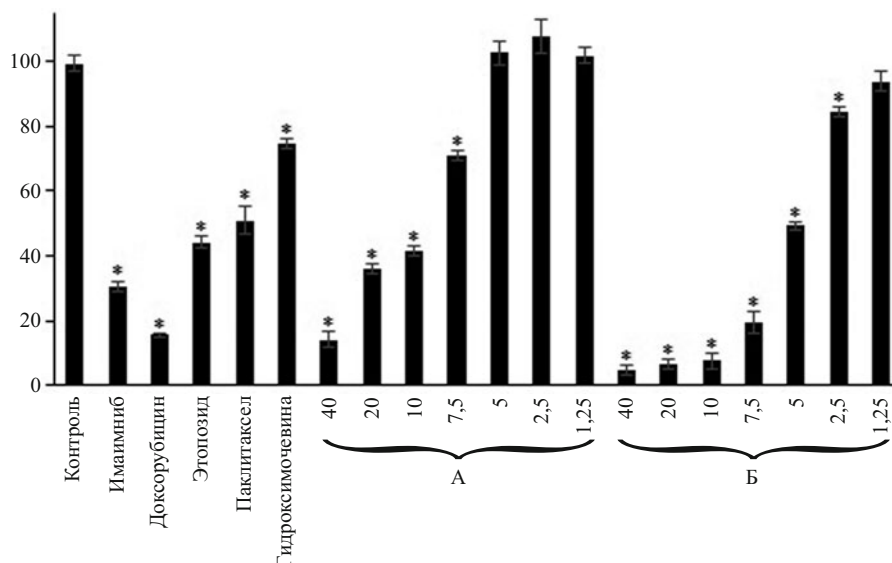


Рис. 3. Ингибирование роста опухолевых клеток ГИСО-Т1 (в %) после их инкубации с химиопрепаратами (иматиниб, доксорубин, этопозид, паклитаксел, гидроксимочевина), а также соединениями Пб (а) и Пж (б) (1,25 – 40 мкМ) в течение 48 ч. Звездочкой (*) обозначены достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (культивирование клеток ГИСО в культуральной среде RPMI-1640 без химиопрепаратов и вышеуказанных соединений).

Me); 5,34 (с, 1H, CH); 7,20 (м, 6H, C₆H₄, C₃H₂NS); 8,23 (уш. с, 1H, NH); 8,45 (уш. с, 1H, NH); 11,13 (с, 1H, NH). C₂₁H₂₂N₄O₃S.

2-Амино-1-(2-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пб). Выход 0,76 г (64 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл}$ 173 – 174 °С. ИК-спектр, ν , см⁻¹, вазелиновое масло: 3305 (NH), 1660 (C=O), 1623 (C=O, C=C). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ , м.д.: 0,91 (с, 9H, Bu-t); 1,11 (с, 9H, Bu-t); 5,54 (с, 1H, CH); 6,56 (с, 1H, CH); 7,2 (д, 1H, C₃H₂NS, J 3,4 Гц); 7,59 (м, 4H, C₆H₄); 7,91 (м, 1H, C₃H₂NS); 8,48 (с, 1H, NH); 8,67 (уш. с, 1H, NH); 8,79 (с, 1H, NH); 11,33 (с, 1H, NH). Спектр ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆), δ , м.д.: 29,98; 44,26; 88,0; 111,71; 112,81; 123,63; 129,77; 130,92; 132,11; 133,94; 137,53; 138,93; 156,95; 160,74; 163,48; 176,67; 207,16. C₂₀H₁₉BrN₄O₃S.

2-Амино-1-(2-йодфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пв). Выход 0,9 г (69 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл}$ 236 – 237 °С. ИК-спектр, ν , см⁻¹, вазелиновое масло: 3306 (NH), 1702 (C=O), 1656, 1622 (C=O, C=C). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ , м.д.: 0,91 (с, 9H, Bu-t); 1,13 (с, 9H, Bu-t); 5,47 (с, 1H, CH); 6,55 (с, 1H, CH); 7,2 (д, 1H, C₃H₂NS, J 3,4 Гц); 7,46 (м, 4H, C₆H₄); 8,09 (д, 1H, C₃H₂NS, J 7,64 Гц); 8,45 (уш. с, 1H, NH); 8,71 (с, 1H, NH); 11,35 (уш. с, 1H, NH). ЯМР

¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆), δ , м.д.: 26,1; 44,31; 88,03; 100,63; 112,82; 113,22; 130,33; 131,30; 132,00; 134,53; 137,53; 140,03; 156,95; 160,78; 163,21; 176,72; 207,08. C₂₀H₁₉IN₄O₃S.

2-Амино-1-(4-метилфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пг). Выход 0,63 г (61 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл}$ 244 – 246 °С. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ , м.д.: 1,10 (с, 9H, Bu-t); 2,41 (с, 3H, Me); 5,64 (с, 1H, CH); 7,20 (м, 6H, C₆H₄, C₃H₂NS); 8,29 (уш. с, 1H, NH); 8,51 (уш. с, 1H, NH); 11,31 (с, 1H, NH). C₂₁H₂₂N₄O₃S.

2-Амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пд). Выход 0,58 г (49 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл}$ 249 – 250 °С. ИК-спектр, ν , см⁻¹, вазелиновое масло: 3336 (NH), 1700 (C=O), 1674, 1617 (C=O, C=C). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ , м.д.: 0,90 (с, 9H, Bu-t); 1,09 (с, 9H, Bu-t); 5,68 (с, 1H, CH); 5,75 (с, 1H, CH); 7,33 (м, 6H, C₆H₄, C₃H₂NS); 8,52 (уш. с, 2H, 2NH); 10,72 (с, 1H, NH); 11,20 (уш. с, 1H, NH); 11,48 (уш. с, 1H, NH). C₂₀H₁₉BrN₄O₃S.

2-Амино-1-(2,4-дибромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пе). Выход 0,83 г (60 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл}$ 278 – 279 °С. ИК-спектр, ν , см⁻¹, вазелиновое масло: 3296 (NH), 1697 (C=O), 1660, 1617 (C=O, C=C). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-d₆), δ , м.д.: 0,95 (с, 9H, Bu-t); 1,07 (с, 9H, Bu-t); 5,72 (с, 1H, CH); 6,57 (с, 1H, CH); 7,19 (д, 1H, C₃H₂NS, J 3,4 Гц); 7,22 (д, 1H, C₃H₂NS, J 3,3 Гц); 7,62 (м, 3H, C₆H₃); 8,04 (д, 1H, C₃H₂NS, J 1,71 Гц); 8,17 (д, 1H, C₃H₂NS, J 1,71 Гц); 8,53 (с, 1H, NH); 8,80 (с, 1H, NH); 8,77 (с, 1H, NH); 8,87 (с, 1H, NH); 11,33 (с, 1H, NH). ЯМР ¹³C (101 МГц, ДМСО-d₆), δ , м.д.: 25,8; 43,57; 43,9; 87,22; 88,07; 104,12; 112,2; 112,93; 123,46; 124,45; 125,71;

Таблица 2

Цитотоксическая активность соединений Пб, ж

Опухолевая клеточная линия	IC ₅₀ , мкМ	
	Пб	Пж
ГИСО Т ₁	8,47 ± 0,68	5,05 ± 0,15
ГИСО Т-1 Res	8,31 ± 0,39	4,48 ± 0,08

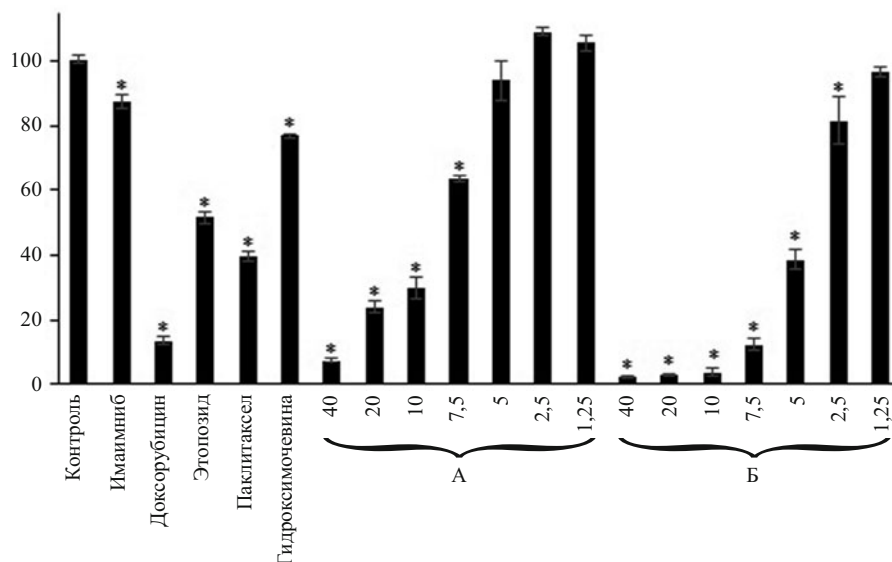


Рис. 4. Ингибирование роста опухолевых клеток ГИСО-T1Res (в %) после их инкубации с цитотоксическими препаратами (иматиниб, доксорубин, этопозид, таксол паклитаксел, гидроксимочевина), а также соединениями Пб (а) и Пж (б) (1,25 – 40 мкМ) в течение 48 ч. Звездочкой (*) обозначены достоверные различия ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (культивирование клеток ГИСО в культуральной среде RPMI-1640 без химиопрепаратов и вышеуказанных соединений).

130,60; 131,76; 132,84; 133,70; 135,15; 136,01; 137,52; 138,49; 140,67; 156,94; 160,68; 163,35; 165,46; 176,68; 178,01; 203,98; 207,38. $C_{20}H_{18}Br_2N_4O_3S$.

2-Амино-1-(2,4-дихлорфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилен)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пж). Выход 0,87 г (75 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 270 – 271 °С. ИК-спектр, ν , cm^{-1} , вазелиновое масло: 3319 (NH), 1655 (C=O), 1621 (C=O, C=C). Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 0,94 (с, 9H, Bu-t); 1,11 (с, 9H, Bu-t); 5,74 (с, 1H, CH); 6,55 (с, 1H, CH); 7,19 (д, 1H, C_3H_2NS , J 3,4 Гц); 7,68 (м, 3H, C_6H_3); 7,96 (д, 1H, C_3H_2NS , J 2,2 Гц); 8,54 (с, 1H, NH); 8,82 (с, 1H, NH); 11,32 (с, 1H, NH). ЯМР ^{13}C (101 МГц, ДМСО- d_6), δ , м.д.: 25,95; 44,2; 88,1; 112,16; 113,22; 128,55; 129,42; 130,52; 133,43; 134,61; 135,85; 137,52; 138,59; 156,93; 160,65; 163,57; 176,69; 207,42. $C_{20}H_{18}Cl_2N_4O_3S$.

2-Амино-1-(2-метил-5-нитрофенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилен)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (Пз). Выход 0,71 г (62 %), бесцветные кристаллы, $T_{пл.}$ 227 – 228 °С. Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 1,09 (с, 9H, Bu-t); 2,24 (с, 3H, Me); 5,69 (с, 1H, CH); 7,71 (м, 5H, C_6H_3 , C_3H_2NS); 8,46 (с, 1H, NH); 8,63 (с, 1H, NH); 11,21 (с, 1H, NH). Масс-спектр: m/z 456,13 $[M+1]^+$. $C_{21}H_{21}N_5O_5S$.

Экспериментальная биологическая часть

Для оценки антиоксидантной активности использовали метод спектрофотометрического определения образовавшихся радикалов 2,2-дифенил-2-пикрил-1-гидразила (ДФПГ) (Sigma-Aldrich, США), который является одним из наиболее часто используемых методов. Концентрация ДФПГ в 95 % этаноле составила $6,5 \times 10^{-5}$ М. В качестве эталона сравнения использовали тролокс (6-окси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-кар-

боновая кислота, производство Sigma-Aldrich, США) и ресвератрол (ООО “Фитопанacea”, Россия). Эталонные сравнения и исследуемые соединения вводили в реакционную смесь в эквимольных концентрациях — $2 \cdot 10^{-5}$ М [14]. Антирадикальная активность гетероциклических соединений вносит значительный вклад в общую антиоксидантную активность соединений и осуществляются за счет соединений — “ловушек” радикалов, скэвенджеров. Данный метод может использоваться для скрининга соединений, обладающих антирадикальной активностью, и позволяет количественно оценить степень значимости антирадикального механизма в формировании общей антиоксидантной активности.

Ингибирующий эффект представляет собой убыль радикалов ДФПГ (Q), которую рассчитывают по формуле:

$$Q = 100(D_0 - D_x)/D_0,$$

где D_0 — оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ; D_x — оптическая плотность раствора ДФПГ в присутствии исследуемого вещества либо раствора эталона сравнения.

Полученные измерения обрабатывали по стандартной методике с использованием t -критерия Стьюдента (доверительная вероятность составляла 0,95) [15]. Результаты представлены в табл. 1.

С целью дальнейшего изучения биологической активности синтезированных соединений Па – ж исследована их острая токсичность. Тест острой токсичности проводили на беспородных белых мышах массой 18 – 20 г при однократном пероральном введении исследуемых соединений. Каждую дозу соединений испытывали одновременно на 8 животных. Соединения вводили в растворе натрия хлорида изотоническом из

расчета 0,1 мл на 10 г массы с интервалом концентрации исследуемых соединений в 200 мг/кг. Все животные находились в стандартных условиях вивария под наблюдением в течение 10 сут. В течение этого времени регистрировали внешний вид, поведение и гибель животных. В течение 10 дней все животные остались живы, физиологическое состояние — без видимых изменений. Статистическую обработку данных проводили по методу Литчфилда — Уилкоксона при $p = 0,05$. Исследование острой токсичности показало, что синтезированные соединения являются малотоксичными (4 класс) [16], LD_{50} составляет более 1800 мг/кг.

Следующим этапом исследований явилось изучение цитотоксической активности описанных выше соединений по отношению к некоторым опухолевым клеточным линиям ГИСО. Изучение цитотоксических свойств *in vitro* соединений проводили колориметрическим методом с использованием общепринятого МТТ-теста, основанного на способности клеточных трансфераз восстанавливать бесцветный водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан. В качестве объекта для исследования цитотоксических свойств соединений были выбраны клеточные линии ИМ-чувствительных и резистентных опухолевых клеток ГИСТ Т-1. Клеточные линии культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в соответствующих культуральных средах DMEM/RPMI-1640 с добавлением антибиотиков (пенициллин-стрептомицин), L-глутамина (все реагенты Gibco, Invitrogen) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Клетки инкубировали с соединениями в течение 48 ч при 37 °С во влажной камере с содержанием 5 % CO_2 . В качестве положительного контроля для оценки цитотоксичности исследуемых соединений использовали таргетный препарат иматиниб (1 мкМ) и противоопухолевые препараты доксорубин (0,25 мг/мл), паклитаксел (1 мкМ) (Sigma), этопозид (40 мкМ) и гидроксимочевину (1 мМ) (CalbioChem). Подсчет количества жизнеспособных клеток после инкубации с описанными выше химиопрепаратами, а также синтезированными нами соединениями проводили методом исключения красителя трипанового синего с помощью автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad).

По результатам предварительного скрининга с использованием световой микроскопии было отобрано 2 наиболее активных соединения, проявивших свою активность в отношении опухолевых клеток ГИСО. Например, было показано, что инкубация опухолевых клеток Т-1 (рис. 1, а) и Т-1Res (рис. 1, б) с соединением Пб приводит к время- и дозо-зависимому уменьшению количества жизнеспособных клеток.

Аналогичным образом инкубация клеток ГИСО с соединением Пж приводила к время- и дозо-зависимому уменьшению количества клеток ГИСО, в том числе резистентных к таргетному препарату иматинибу (рис. 2).

Примечательно, что на ранних сроках культивирования опухолевых клеток с вышеуказанными соедине-

ниями было отмечено накопление клеток округлой формы, что могло свидетельствовать о накоплении клеток в М-фазе клеточного цикла и последующей их гибели за счет запуска процессов апоптоза вследствие так называемой “митотической катастрофы”.

Результаты проведенного колориметрического МТТ-теста для определения цитотоксичности данных соединений показали, что большей цитотоксичностью в отношении опухолевых клеточных линий ГИСО обладает соединение Пж (рис. 3). Примечательно, что эффект данного соединения в концентрации 5–7,5 мкМ по отношению к клеткам Т-1 был сопоставим с эффектом большинства химиопрепаратов.

Как и предполагалось, ИМ был неэффективен в отношении полученной в нашей лаборатории клеточной линии Т-1Res, в то время как 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамиды Пб и Пж оказывали выраженный дозо-зависимый цитотоксический эффект в отношении полученного опухолевого клона клеток ГИСО Т-1Res (рис. 4).

Таким образом, установлено, что некоторые соединения, являющиеся производными 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамидов, проявляют выраженные цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток ГИСО *in vitro*. Полученные результаты цитотоксичности вышеуказанных соединений были рассчитаны в виде значений 50 % ингибирования (IC_{50}) для каждого из соединений и представлены в табл. 2.

Принимая во внимание достаточно широкий спектр современных химиопрепаратов, обнаруженная нами способность соединений, относящихся к арил-2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамидам (Пб, ж), проявлять цитотоксические свойства по отношению к клеточным линиям ГИСО представляет безусловный интерес как с научной, так и с практической точки зрения и требует более углубленного изучения.

Обнаружено, что высокая антирадикальная активность соединений Пб, ж превышает таковую эталонов сравнения — тролокса и ресвератрола, а также коррелирует с их цитотоксической активностью.

Таким образом, ряд исследованных соединений, относящихся к арил-2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамидам, обладают цитотоксичностью в отношении некоторых опухолевых клеточных линий ГИСО, в том числе резистентных к таргетным препаратам. Поэтому поиск противоопухолевых средств в ряду данных соединений следует считать перспективным.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 14-15-00342.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. D. Demetri, Mehren von M., C. D. Blanke, et al., *N. Engl. J. Med.*, **347**, 472 – 480 (2002).
2. J. Verweij, P. G. Casali, J. Zalcberg, et al., *Lancet*, **364**, 1127 – 1133 (2004).
3. A. W. Gramza, C. L. Corless, M. C. Heinrich, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 7510 – 7518 (2009).
4. T. Taguchi, H. Sonobe, S. Toyonaga, I. Yamasaki, et al., *Lab. Invest.*, **82**, 663 – 665 (2002).
5. S. Boichuk, D. J. Lee, K. R. Mehalek, et al., *Cancer Res.*, **74**(4), 1200 – 1213 (2014).
6. С. С. Зыкова, А. Р. Галембикова, Б. Р. Рамазанов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(12), 19 – 23 (2015); S. Zyкова, A. Galembikova, B. Ramazanov, et al., *Pharm. Chem. J.*, **49**(12), 817 – 820 (2016).
7. S. Boichuk, A. Galembikova, S. Zyкова, B. Ramazanov, et al., *Anti-Cancer Drugs*, **27**(7), 620 – 634 (2016).
8. С. С. Харитонов, Н. М. Игидов, А. В. Захматов, А. Е. Рубцов, *Ж. орган. химии*, **49**(2), 252 (2013); S. S. Kharitonova, N. M. Igidov, A. V. Zakhmatov, A. E. Rubtsov, *Rus. J. Org. Chem.*, **49**, 243 (2013).
9. С. С. Зыкова, А. А. Даровских, Т. Ф. Одегова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(10), 15 – 18 (2015); S. Zyкова, A. Darovskikh, T. Odegova, M. Kiselev, et al., *Pharm. Chem. J.*, **49**(10), 833 – 837 (2016).
10. С. С. Зыкова, С. В. Бойчук, А. Р. Галембикова и др., *Цитология*, **56**(6), 439 – 442 (2014).
11. С. С. Зыкова, С. В. Бойчук, *Материалы XVIII Междунар. научн. конф.: "Онкология — XXI век"*, Брюссель, Бельгия (2013), сс. 75 – 78.
12. Н. М. Игидов, А. В. Захматов, А. Е. Рубцов, *Ж. орган. химии*, **52**(7), 981 (2016).
13. А. В. Тюнева, Н. М. Игидов, Н. Н. Корягина, *Ж. орган. химии*, **47**, 266 (2011); A. V. Tyuneva, N. M. Igidov, N. N. Koryagina, *Rus. J. Org. Chem.*, **47**, 258 (2011).
14. P. Molyneux, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **26**(2), 211 – 219 (2004).
15. С. С. Зыкова, С. В. Бойчук, А. Р. Галембикова и др., *2-Амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксо-бутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамиды, проявляющие противоопухолевую и антирадикальную активность, способ их получения и фармацевтическая композиция на их основе*, Патент РФ № 2605091 (2015).
16. И. В. Березовская, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(3), 32 – 34 (2003).

Поступила 26.11.16

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 2-AMINO-1-ARYL-5-(3,3-DIMETHYL-2-OXO-BUTYLIDEN)-4-OXO-N-(THIAZOL-5-YL)-4,5-DIHYDRO-1H-PYRROLE-3-CARBOXAMIDES

S. S. Zyкова¹, N. M. Igidov², N. M. Zakhmatov², M. A. Kiselev², A. R. Galembikova³, R. R. Khusnutdinov³, P. D. Dunaev³, S. V. Boichuk³, I. N. Chernov⁴, and I. A. Rodin⁵

¹ Perm Federal Penitentiary Service Institute, Perm, 614012 Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614099 Russia

³ Kazan State Medical University, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

⁴ N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

⁵ I. T. Trubilin Kuban State Agrarian University, Krasnodar, 350044 Russia

* e-mail: zykova.sv@rambler.ru

A series of 2-aminopyrrole derivatives – ethyl-2-amino-1-benzamido-4-oxo-5-(2-oxo-2-arylethylidene)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxylates (IIa – IIg) were synthesized via interaction of 4-arylamino-2-tert-butyl-2,5-dihydro-5-oxifuran-2-yl acetates (Ia – Ig) with 2-cyano-N-thiazol-2-yl)acetamide in the presence of triethylamine. The synthesized compounds were subjected to biological screening. All compounds showed low acute toxicity *in vivo*. It was found that 2-amino-1-(2-bromophenyl)-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-N-(thiazol-5-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (IIb) exhibited high antiradical activity exceeding that of trolox, while 2-amino-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-N-(thiazol-5-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide (IIg) exhibited cytotoxic activity *in vitro* with respect to gastrointestinal stromal tumor (GIST) cells, including those resistant to targeted-therapy drug imatinib (gleevec). The cytotoxic properties of the synthesized compounds used at concentrations within 5 – 10 mM were comparable to the cytotoxic effect of standard chemotherapeutic drug doxorubicin and much more profound in comparison to the cytotoxic effects of drugs etoposide, paclitaxel and hydroxiurea. One possible molecular mechanism of action of the obtained compounds might be due to their ability to violate the cell cycle, induce selective accumulation of tumor cells in M-phase, and trigger the death of tumor cells via “mitotic catastrophe” pathway.

Keywords: 2-amino-1-aryl-5-(3,3-dimethyl-2-oxo-butylidene)-4-oxo-N-(thiazol-5-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamides; acute toxicity; antiradical activity; cytotoxicity; gastrointestinal stromal tumors; GIST cells; chemotherapeutic drugs; chemoresistance.