

С. С. Зыкова^{1, 2*}, И. А. Кизимова², А. И. Сюткина², Ю. С. Токсарова²,
Н. М. Игидов², Д. Ф. Ибишов³, С. В. Бойчук⁴, П. Д. Дунаев⁴,
А. Р. Галембикова⁴, Р. Р. Корочкина⁵

СИНТЕЗ И ЦИТОСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ (*E*)-ЭТИЛ-2-АМИНО-5-(3,3-ДИМЕТИЛ-4-ОКСОБУТИЛИДЕН)- 4-ОКСО-1-(2-ФЕНИЛАМИНОБЕНЗАМИДО)-4,5-ДИГИДРО-1*H*- ПИРРОЛ-3-КАРБОКСИЛАТА

¹ ФГКВОУ ВО "Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации", Россия, 614112, Пермь, ул. Гремячий Лог, 1.

² ФГБОУ ВО "Пермская государственная фармацевтическая академия" Минздрава РФ, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, д. 2.

³ ФГБОУ ВО "Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д. Н. Прянишникова", Россия, 614000, Пермь, ул. Петропавловская, 123.

⁴ ФГБОУ ВО "Казанский государственный медицинский университет", Россия, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49.

⁵ ФГБОУ ВО "Российский государственный экономический университет имени Р. Э. Плеханова", Россия, Москва.

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

Взаимодействием (*Z*)-*N*-(5-*трет*-Бутил)-2-оксофуран-3(2*H*)-илиден-2-фениламинобензогидразида (**I**) с цианоуксусным эфиром в присутствии триэтиламина синтезировано новое производное (*E*)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилиден)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксилата (**II**). Изучена его острая токсичность, а также цитотоксическая активность в отношении клеточной линии Т-1 гастринтестинальной стромальной опухолевой (ГИСО). Соединение **II** продемонстрировало концентрационнозависимый и времязависимый эффект, сравнимый с противоопухолевыми средствами — иматинибом, паклитакселом, доксорубицином, этопозидом, гидроксимочевинной.

Ключевые слова: производные 2-амино-5-замещенные 4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксилата; МТТ-тест; острая токсичность; цитотоксичность; опухолевая клеточная линия ГИСО Т-1.

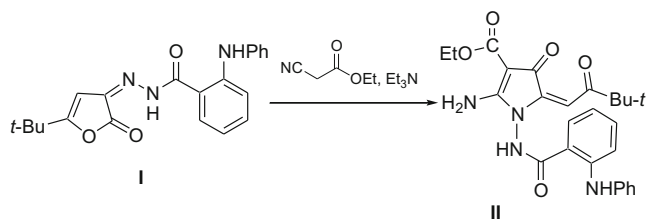
Ранее был описан синтез производных 2-аминопиррола, среди которых найдены соединения, обладающие высокой цитостатической активностью [1–8]. С целью поиска новых веществ, оказывающих выраженное цитостатическое действие, нами проведен синтез (*E*)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилиден)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксилата (**II**) взаимодействием (*Z*)-*N*-(5-*трет*-бутил)-2-оксофуран-3(2*H*)-илиден-2-фениламинобензогидразида (**I**) с цианоуксусным эфиром в присутствии триэтиламина в среде толуола.

Полученное соединение **II** — бесцветное кристаллическое вещество, растворимое в ДМСО, диметилформамиде, трудно растворимое в спирте и нерастворимое в воде.

В ИК-спектре соединения **II** присутствуют полосы поглощения NH-групп при 3155–3351 см⁻¹, полоса поглощения сложноэфирного карбонила при 1687 см⁻¹, а также валентные колебания кетонных и амидного карбониллов при 1652 см⁻¹.

В спектре ЯМР ¹H соединения **II** наблюдаются синглеты протонов NH групп амидного фрагмента при 10,84 м.д., аминогруппы при 9,36 и 9,19 м.д., вторичной аминогруппы при 8,44 м.д., сигналы ароматических протонов в виде мультиплета при 7,24 м.д., синглет винильного протона при 6,34 м.д., мультиплет 2

протонов сложноэфирной группы при 4,19 м.д., триплет 3 протонов сложноэфирной группы при 1,25 м.д. и синглет 9 протонов *трет*-бутильного заместителя при 0,95 м.д. В масс-спектре соединения **II** присутствуют пики молекулярного и фрагментных ионов, подтверждающие данную структуру.



Экспериментальная химическая часть

Контроль за ходом реакций и чистотой синтезированных соединений осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol (проявляли парами йода) в системе диэтиловый эфир — бензол — ацетон 10:9:1. ИК-спектры записаны в пасте вазелинового масла на Фурье-спектрометре ФСМ-1202. Спектры ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C записаны на приборе Bruker Avance III HD в ДМСО-d₆, рабочие частоты 400 МГц (¹H) и 100 МГц (¹³C), внутренний стандарт — остаточный сигнал от дейтерорастворителя. Элементный анализ проводили

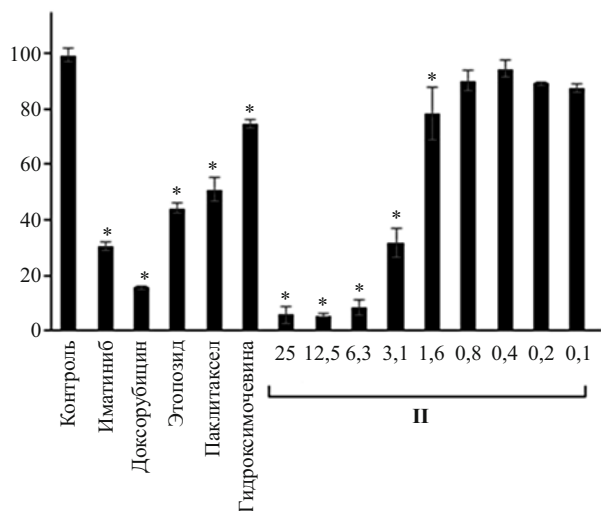


Рис. 1. Ингибирование роста опухолевых клеток ГИСО-T1 (в %) после их инкубации с ИМ, доксорубицином, этопозидом, паклитакселом, гидрокарбонилем, а также соединением II (0,1 – 25 мкМ) в течение 48 ч.

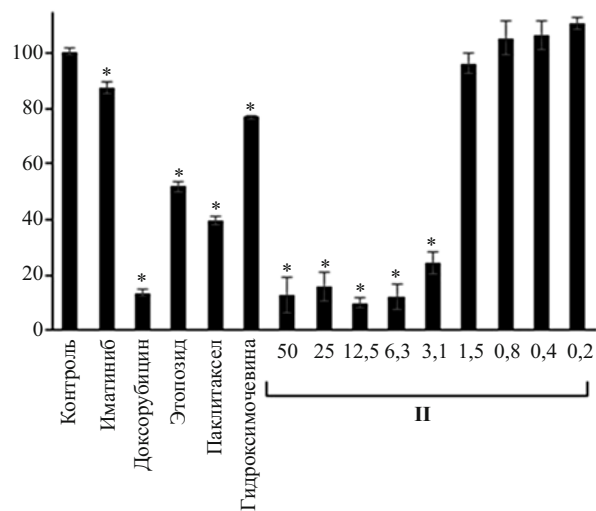


Рис. 2. Ингибирование роста опухолевых клеток ГИСО-T1Res (в %) после их инкубации с ИМ, доксорубицином, этопозидом, паклитакселом, гидрокарбонилем, а также соединением II (0,1 – 25 мкМ) в течение 48 ч.

на приборе Leco CHNS-932. Масс-спектр записан на спектрометре Kratos MS-30, ионизация ЭУ (70 эВ, температура камеры ионизации 200 °С). Температуры плавления (разложения) определяли на приборе ПТП-2. Данные элементного анализа соответствуют расчётным.

(Z)-N-(5-трет-Бутил)-2-оксофуран-3(2H)-илиден-2-фениламинобензогидразид (I) синтезировали по методу [9]. Выход 2,65 г (73 %), желтое кристаллическое вещество, $T_{пл}$ 191 – 192 °С (толуол). ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 3277 (NH), 1868 (C=O), 1668, 1628, (C=O, C=C). Спектр ЯМР 1H , δ , м.д.: 1,30 (с, 9H, *t*-bu), 6,05 (с, 1H, CH), 7,2 (м, 9H, аром.), 9,62 (с, 1H, NH), 12,82 (с, 1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 26,40, 32,90, 99,52, 113,40, 114,92, 117,34, 120,32, 121,52, 122,93, 127,20, 128,81, 133,40, 136,66, 140,21, 147,31, 160,39, 165,21, 172,05. $C_{21}H_{21}N_3O_3$.

(E)-Этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилен)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксилат (II). Растворяют при нагревании 3,63 г (0,01 моль) фуранона I и 1,13 г (0,01 моль) этилового эфира циануксусной кислоты в 80 мл безводного толуола, добавляют 1 г (0,01 моль) триэтиламина и кипятят в течение 30 мин, охлаждают. Выпавший бесцветный осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из этанола. Выход 2,86 г (61 %), $T_{пл}$ 260 – 261 °С. ИК-спектр, ν , cm^{-1} : 3351(NH), 3265 (NH), 3155 (NH), 1687 (COOC₂H₅), 1652 (C=O). Спектр

ЯМР 1H , δ , м.д.: 0,95 (с, 9H, *t*-Bu), 1,25 (т, 3H, COOCH₂CH₃), 4,19 (м, 2H, COOCH₂CH₃), 6,34 (с, 1H, CH), 7,24 (м, 9H_{аром.}), 8,44 (с, 1H, NH), 9,19 (с, 1H, NH), 9,36 (с, 1H, NH), 10,84 (с, 1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14,44, 25,92, 43,68, 58,46, 84,86, 100,91, 114,10, 114,46, 117,37, 120,10, 122,30, 129,28, 130,17, 133,10, 140,79, 141,08, 145,43, 163,59, 167,53, 174,29, 204,74.

Масс-спектр, [m/z ($I_{отн.}$, %): 476 (38) [M]⁺, 430 (5) [M-H₂O-CO]⁺, 391(24) [M-*t*-BuCO]⁺, 196 (100) [COC₆H₄NHC₆H₅]⁺, 168 (13) [C₆H₄NHC₆H₅]⁺, 57(13) [*t*-Bu]⁺. C₂₆H₂₈N₄O₅.

Экспериментальная биологическая часть

Тест острой токсичности соединения II изучали на самках белых мышей массой 16 – 18 г при однократном внутрибрюшинном введении. За животными вели наблюдение в течение 10 сут, фиксируя поведение, интенсивность двигательной активности и другие параметры. Показателем токсичности служила доза, вызывающая к концу опыта гибель 50 % животных (ЛД₅₀). Острую токсичность рассчитывали согласно [10]. Токсичность (ЛД₅₀) соединения II составляет 860 мг/кг. Данное соединение, согласно классификации К. К. Сидорова, относится к разряду малотоксичных, так как величины их ЛД₅₀ находятся в диапазоне доз от 800 до 1200 мг/кг при внутрибрюшинном введении [11].

Для определения количественных значений цитотоксичности данного соединения *in vitro* использовали общепринятый колориметрический МТТ-тест. Опухолевые клеточные линии ГИСО T-1 без и с резистентностью к иматинибу (ИМ) культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone), антибиотиков (пенициллин-стрептомицин), L-глутамин (все реагенты Gibco, Invitrogen). Клетки инкубировали с вышеуказанными

Таблица 1
Цитотоксическая активность (E)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилен)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксилата (II)

Опухолевая клеточная линия	IC ₅₀ соединения II, мкМ
ГИСО T1	2,55 ± 0,11
ГИСО-T1 Res	2,51 ± 0,08

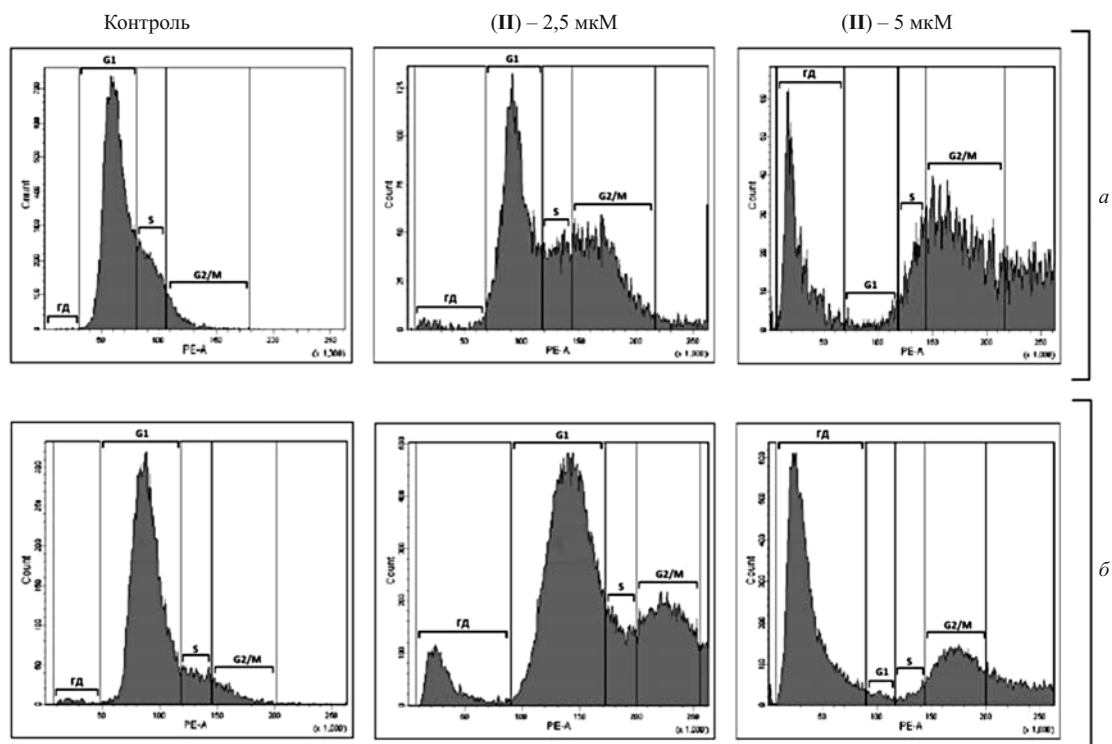


Рис. 3. Влияние соединения II на фазы клеточного цикла опухолевых клеток линии ГИСО T-1 (а) и ГИСО T-1 Res (б).

соединениями, а также препаратами сравнения (доксорубин — 0,25 мг/мл, этопозид — 40 мкМ, паклитаксел — 1 мкМ, гидроксимочевина — 1 мМ и ИМ — 1 мкМ) в течение 48 ч при 37 °С во влажной камере с содержанием 5 % CO₂.

Результаты и их обсуждение

По результатам предварительного скрининга с использованием световой микроскопии было отобрано одно наиболее активное соединение, обладавшее выраженной цитотоксичностью в отношении обеих опухолевых клеточных линий ГИСО — соединение II. Обнаружено, что инкубация клеток ГИСО с соединением II приводит к время- и концентрационно-зависимому уменьшению количества жизнеспособных клеток ГИСО, в том числе резистентных к таргетному препарату ИМ. Также установлено, что на ранних сро-

ках культивирования опухолевых клеток ГИСО с вышеуказанным соединением (24 ч) отмечены выраженные морфологические изменения, проявлявшиеся в виде накопления клеток округлой формы, что могло свидетельствовать о накоплении клеток в М-фазе клеточного цикла. Тем не менее данный факт не мог являться свидетельством усиления пролиферативной способности опухолевых клеток под действием вышеуказанного соединения, так как на поздних сроках культивирования (48 ч) опухолевых клеток ГИСО с данным соединением наблюдалось значительное снижение количества жизнеспособных клеток, что свидетельствовало об их гибели.

Результаты колориметрического МТТ-теста показали, что соединение II обладает выраженной цитотоксичностью в отношении опухолевой клеточной линии ГИСО T-1 (рис. 1). Примечательно, что эффект данно-

Таблица 2

Влияние соединения II на фазы клеточного цикла опухолевых клеток линии ГИСО T-1 и ГИСО T-1 Res

Опухолевые клетки	Соединение	Фазы клеточного цикла			Гиподиплоидные клетки, %
		G1, %	S, %	G2/M, %	
ГИСОТ-1	Контроль	71,5 ± 1,0	0,3 ± 0,5	6,4 ± 1,2	8,2 ± 1,8
	II, 2,5 мкмоль	44,4 ± 1,1*	2,3 ± 1,0*	32,6 ± 2,3*	14,5 ± 0,7*
	II, 5 мкмоль	2,2 ± 0,5*	16,3 ± 2,5*	30,9 ± 2,1*	21,6 ± 1,2*
ГИСОТ-1 Res	Контроль	81,4 ± 1,9	10,0 ± 1,9	6,4 ± 1,5	1,5 ± 2,5
	II, 2,5 мкмоль	50,7 ± 1,5*	9,3 ± 1,8	21,5 ± 1,9*	6,4 ± 0,9*
	II, 5 мкмоль	2,1 ± 0,4*	2,3 ± 1,1*	18,4 ± 0,8*	48,8 ± 2,8*

Примечание: Инкубация 48 ч. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение.

* Различия относительно контроля статистически значимы при $p < 0,05$.

го соединения в концентрации 6,3 мкМ превышал эффект всех исследованных химиопрепаратов.

Было также обнаружено, что соединение **II** также обладало цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам ГИСО Т-1с резистентностью к таргетному препарату ИМ (рис. 2).

Таким образом, проведенные исследования показали, что соединение **II** проявляет выраженные цитотоксические свойства в отношении обеих опухолевых клеточных линий ГИСО *in vitro*. Полученные результаты по изучению сравнительной цитотоксичности данного соединения были рассчитаны в виде значений 50 % ингибирования (IC₅₀) (табл. 1).

Учитывая обнаруженные нами морфологические изменения в опухолевых клетках ГИСО, инкубированных с соединением **II**, был проведен анализ фаз клеточного цикла с одновременным подсчетом гиподиплоидных (т.е. апоптотных) клеток. На ГИСОграммах, представленных на рис. 3, *a* и *b*, показано, что инкубация клеток ГИСО с соединением **II** приводит к значительному увеличению количеств клеток в фазе G2/M клеточного цикла. Более того, было отмечено значительное увеличение количеств гиподиплоидных клеток, что свидетельствовало об их гибели по механизму апоптоза.

Примечательно, что эффект соединения был концентрационно-зависимым и проявлялся как в отношении ИМ-чувствительных, так и резистентных к ИМ опухолевых клеток ГИСО (табл. 2).

Механизм цитотоксического действия соединений в отношении опухолевых клеток связан с индукцией их гибели по механизму апоптоза вследствие нарушений регуляции клеточного цикла, а именно массивной задержке опухолевых клеток в фазе G2/M. Учитывая морфологические изменения в опухолевых клетках под действием вышеуказанного соединения, наиболее вероятным механизмом являются задержка в М-фазе клеточного цикла и последующая гибель по механизму “катастрофы в митозе”.

Принимая во внимание общепризнанный факт достаточно быстрого развития у больных с ГИСО вторичной резистентности к таргетным препаратам, обнару-

женная нами способность соединения **II** проявлять выраженные концентрационно-зависимые цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток ГИСО, в том числе обладающих резистентностью к ИМ, представляет научно-практический интерес при разработке эффективных лекарственных средств для терапии больных с неоперабельными, рецидивирующими и метастатическими формами ГИСО.

Исследования по изучению цитотоксических свойств представленных в работе соединений были выполнены при финансовой поддержке гранта Российского Научного фонда (РНФ) № 14-15-00342.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. С. Харитонов, Н. М. Игидов, А. В. Захматов, А. Е. Рубцов, *Ж. орган. химии*, **49**(2), 252 – 261 (2013); S. S. Kharitonova, N. M. Igidov, A. V. Zakhmatov, A. E. Rubtsov, *Rus. J. Org. Chem.*, **49**(2), 252 – 261 (2013).
2. С. С. Зыкова, А. Р. Галембикова, Б. Р. Рамазанов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(12), 19 – 23 (2015); S. S. Zyкова, A. R. Galembikova, B. R. Ramazanov, et al., *Pharm. Chem. J.*, **49**(12), 817 – 820 (2016).
3. С. С. Зыкова, А. А. Даровских, Т. Ф. Одегова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(10), 15 – 18 (2015); S. S. Zyкова, A. A. Darovskikh, T. F. Odegova, et al., *Pharm. Chem. J.*, **49**(10), 833 – 837 (2016).
4. Н. М. Игидов, А. В. Захматов, А. Е. Рубцов, *Ж. орган. химии*, **52**(7), 981 – 984 (2016); N. M. Igidov, A. V. Zahmatov, A. E. Rubtsov, *Russ. J. Org. Chem.*, **52**(7), 981 – 984 (2016).
5. С. С. Зыкова, Н. М. Игидов, М. А. Киселев и др., *Здоровье и образцов. в XXI веке*, **18**(7), 121 – 127 (2016); S. Zyкова, N. Igidov, M. Kiselev, et al., *Health and education Millenium*, **18**(7), 121 – 127 (2016).
6. S. Boichuk, A. Galembikova, S. Zyкова, et al., *Anti-Cancer Drugs*, **27**(7), 620 – 634 (2016).
7. Патент РФ 2605091; *Бюл. изобрет.*, № 35 (2016).
8. Патент РФ 2607920; *Бюл. изобрет.*, № 2 (2017).
9. Н. М. Игидов, М. А. Киселев, А. Е. Рубцов, *Ж. орган. химии*, **52**(4), 540 – 546 (2016); N. M. Igidov, M. A. Kiselev, A. E. Rubtsov, *Rus. J. Org. Chem.*, **52**(4), 540 – 546 (2016).
10. А. Н. Миронов и др. (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, М. Гриф и К, Москва (2012).
11. Н. Ф. Измеров, И. В. Саноцкий, К. К. Сидоров, *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном введении*, Медицина, Москва (1997), сс. 196 – 197.

Поступила 27.11.17

SYNTHESIS AND CYTOSTATIC ACTIVITY OF (*E*)-ETHYL-2-AMINO-5-(3,3-DIMETHYL-4-OXO-BUTYLIDEN)-4-OXO-1-(2-PHENYLAMINOBENZAMIDO)-4,5-DIHYDRO-1H-PYRROLE-3-CARBOXYLATE

S. S. Zyкова^{1,2*}, I. A. Kizimova², A. I. Syutkina², Yu. S. Toksarova², N. M. Igidov², D. F. Ibishov³, S. V. Boichuk⁴, P. D. Dunaev⁴, A. R. Galembikova⁴, and R. R. Korochkina⁵

¹ Perm Military National Guard Institute, Perm, 614112 Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, 614990 Russia

³ Perm State Agricultural Technology University, Perm, 614000 Russia

⁴ Kazan State Medical University, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

⁵ Kazan Institute of the R. E. Plekhanov Russian State Economic University, Kazan, Tatarstan, 420111 Russia

* e-mail: zyкова.sv@rambler.ru

Reaction of (*Z*)-*N*-(5-*tert*-butyl)-2-oxofuran-3(2H)-ylidene-2-phenylaminobenzohydrazide (**I**) with cyanoacetic ester in the presence of triethylamine yielded (*E*)-ethyl-2-amino-5-(3,3-dimethyl-4-oxo-butyliden)-4-oxo-1-(2-phenylaminobenzamido)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxylate (**II**). Acute toxicity of compound **II** was studied and its cytotoxic activity with respect to T-1 cell line of gastrointestinal stromal tumor (GIST) was evaluated. Compound **II** showed time- and concentration-dependent effect comparable with that of well-known antitumor drugs imatinib, paclitaxel, doxorubicin, etoposide, and hydroxyurea.

Keywords: 2-amino-5-substituted 4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxylate derivatives; MTT test; acute toxicity; cytotoxicity; GIST; T-1 cell line.