

Л.М. Мосула

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК «СТРУКТУРА – ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ» 4-ТІАЗОЛІДОНІВ З БЕНЗОТІАЗОЛЬНИМ ФРАГМЕНТОМ У МОЛЕКУЛАХ

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

Ключові слова: протипухлинна активність, 4-тіазолідони, бензотіазольний фрагмент, COMPARE аналіз.

Здійснено аналіз протипухлинної активності похідних 4-тіазолідону з бензотіазольним фрагментом у молекулах, а також встановлено взаємозв'язок «структура – протипухлинна активність» і визначено потенційний фармакофор для зазначеної групи сполук. Ідентифіковано 2 «сполуки-лідери», що характеризуються високою протипухлинною активністю на всіх лініях клітин. Проведено COMPARE аналіз до відомих протипухлинних агентів з метою встановлення можливого механізму протипухлинної активності «сполуки-лідера».

Л.М. Мосула

Взаимосвязь «структура – противоопухолевая активность» 4-тиазолидонов с бензотиазольным фрагментом в молекулах

Ключевые слова: противоопухолевая активность, 4-тиазолидоны, бензотиазольный фрагмент, COMPARE анализ.

Проведен анализ противоопухолевой активности производных 4-тиазолидона с бензотиазольным фрагментом в молекулах, а также установлена взаимосвязь «структура – противоопухолевая активность» и определен потенциальный фармакофор для указанной группы соединений. Идентифицированы 2 соединения-лидера, которые обладают высокой противоопухолевой активностью ко всем линиям клеток. Проведен COMPARE анализ к известным противоопухолевым агентам с целью установления возможного механизма противоопухолевой активности «соединения-лидера».

L.M. Mosula

Correlation «structure – anticancer activity» of 4-thiazolidone with benzothiazol fragment in the molecule

Key words: antitumor activity, 4-thiazolidones, benzothiazole fragment, COMPARE analysis.

In this article the antitumor activity of 4-thiazolidone derivatives with benzothiazole fragment in the molecules was analyzed. The «structure – antitumor activity» relationship was established. The potential pharmacophore for these compounds was identified. Two compounds-leaders were identified which show high antitumor activity against all cells lines. COMPARE analysis of known antitumor agents was fulfilled for determination of the possible mechanism of the antitumor activity of compound-leader.

Попередні дослідження дозволили встановити, що поєднання 4-тіазолідонового каркасу з бензотіазольним фрагментом в одній структурі є оправданим підходом до створення «лікоподібних» молекул з метою досягнення нового фармакологічного профілю, потенціювання дії чи зниження токсичності [1–3]. Реалізація наведеної концепції призвела до ідентифікації серії низькотоксичних сполук з протипухлинною активністю [4–7].

МЕТА РОБОТИ

Встановлення взаємозв'язку «структура – активність», а також можливого механізму протипухлинної активності «сполуки-лідера» до відомих протипухлинних агентів за допомогою COMPARE аналізу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для вивчення протипухлинної активності обрано похідні 4-тіазолідону з бензотіазольним фрагментом у положеннях 3 і 2 базового гетероциклу та їх 5-іліденопохідні, а також для конкретизації впливу бензотіазольного кільця на фармакологічний ефект, 3-незаміщені «небензотіазольні» похідні роданіну з потенційними фармакофорами в положенні 5 тіазолідинового циклу, синтезовані раніше

[5,7,8]. Протипухлинну активність синтезованих сполук вивчали методом високоефективного біологічного скринінгу згідно до міжнародної наукової програми Developmental Therapeutic Program (DTP) в Національному інституті раку (Бетезда, Меріленд, США) [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

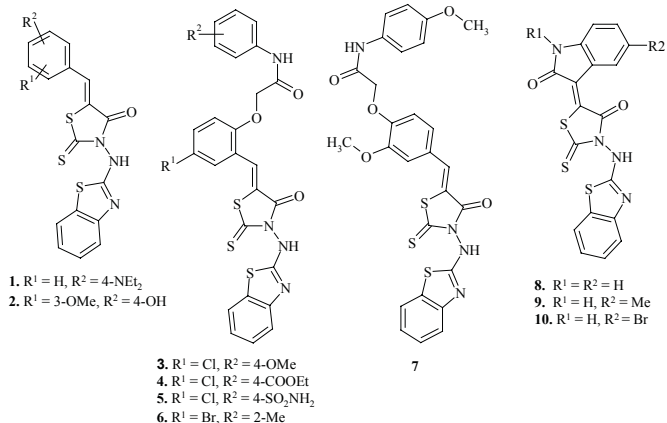
Для скринінгу на протипухлинну активність відібрано 20 похідних 4-тіазолідону з бензотіазольним фрагментом у положеннях 3 (схема 1, 2) і 2 (схема 3) базового гетероциклу, а також 2 представники 3-незаміщених «небензотіазольних» похідних роданіну (схема 4).

Протипухлинну активність синтезованих сполук *in vitro* вивчали на 60 лініях клітин (табл. 1), що охоплюють майже весь спектр ракових захворювань людини (в тому числі лейкемії, недрібноклітинного раку легень, епітеліального раку кишечника, раку ЦНС, меланоми, раку яєчників, нирок, простати та молочної залози) при дії речовини в концентрації 10^{-5} моль/л. Як кількісний параметр активності розраховували відсоток росту клітин ліній раку GP (%) порівняно з контролем [9].

Слід зазначити, що похідні 3-(бензотіазол-2-іламіно)-

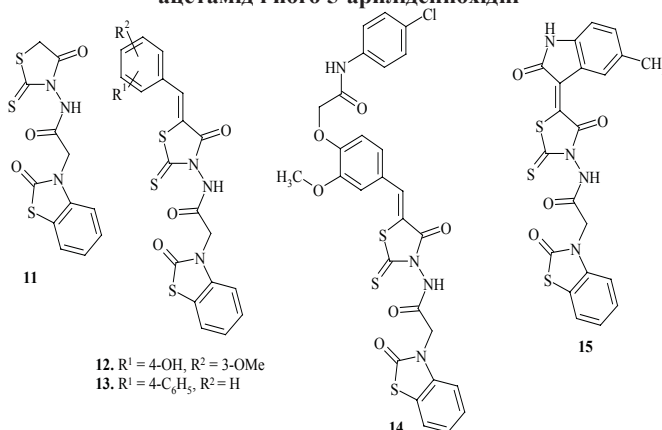
5-Ариліденопохідні 3-(бензгіазол-2-іламіно)-2-тіоксо-4-тіазолідону

Схема 1



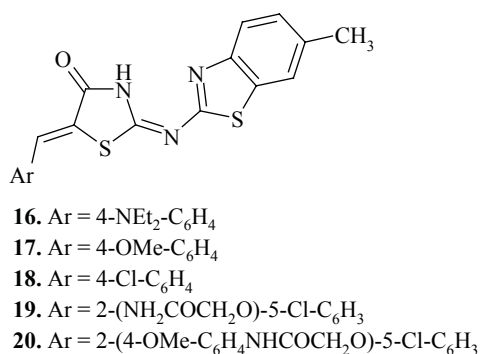
2-(2-Оксобензтіазол-3-іл)-N-(4-оксо-2-тіоксотіазолідин) ацетамід і його 5-ариліденопохідні

Схема 2



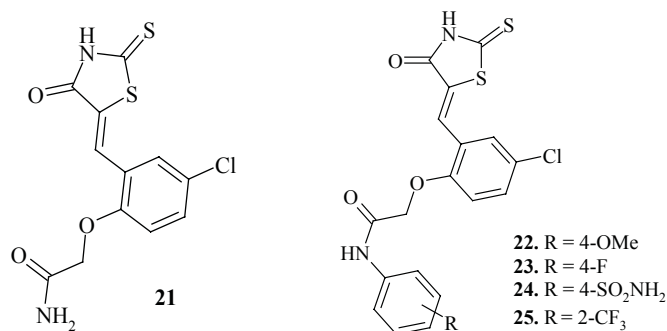
5-Ариліденопохідні 2-(6-метилбензтіазоліліміно)-4-тіазолідонів

Схема 3



3-Незаміщені «небензотіазольні» похідні 2-тіоксо-4-тіазолідону з потенційними фармакофорами в положенні 5 тіазолідинового циклу

Схема 4



2-тіоксо-4-тіазолідону, в основному, проявили помірну протипухлинну активність з високою селективністю дії на певні лінії ракових клітин. Так, сполука **2** проявила значний ефект щодо лінії раку нирок RXF 393 (GP = -0,71%), а сполука **6** – високоактивна до лінії HOP-92 недрібноклітинного раку легень (GP = 0,74%). Варті уваги результати прескринінгу протипухлинної активності сполуки **10** на клітинні лінії: IGROV1 (GP = 4,59%, рак яєчників), RXF 393 (GP = 25,00%, рак нирок), SK-MEL-2 (GP = 25,27%, меланома). Імовірно, що введення атому бром у ізатиніліденовий фрагмент сполуки **10** сприяє появі активності, оскільки 5-незаміщене- (**8**) та 5-метилізатиніліденопохідне (**9**) не проявили такої активності.

Тестовані похідні *N*-(2-тіоксо-4-тіазолідон-3-іл)-2-(2-оксобензотіазол-3-іл)ацетаміду не проявили протипухлинної активності *in vitro*, за винятком 5-незаміщеного *N*-(2-тіоксо-4-тіазолідон-3-іл)-2-(2-оксобензотіазол-3-іл)ацетаміду (**11**). Зазначена речовина характеризується високою специфічністю впливу на лінії ракових клітин RXF 393 (GP = -3,57%, рак нирок), UACC-257 (GP = -0,04%, меланома) і SK-MEL-2 (GP = 5,64%, меланома) (табл. 1).

При аналізі результатів у площині кореляції «структура-дія» необхідно відзначити, що введення субституентів у положення 5 роданінового циклу несподівано призвело до втрати протипухлинної активності, що не узгоджується

з попередніми даними для структурно подібних сполук і може трактуватись як виняток з правила для 4-азолідонів і споріднених гетероциклічних систем [10]. Така аномальність кореляції «структура – активність» зазначеної групи похідних роданіну частково може бути пояснена високою молекулярною масою вихідної сполуки і, відповідно, недостатніми «лікоподібними» характеристиками Ліпінського (Мм, logP, тощо) 5-заміщених похідних. Отже, ускладнення структури *N*-(2-тіоксо-4-тіазолідон-3-іл)-2-(2-оксобензотіазол-3-іл)ацетамідів не сприяє прояву їх протипухлинної дії, проте конкретизація висновків стосовно наведених сполук потребує більшого експериментального матеріалу.

Для 3-незаміщених похідних роданіну **21**, **22** відзначено невисоку протипухлинну активність порівняно з 3-бензотіазолзаміщеними аналогами, серед яких ідентифіковано високоактивну «сполуку-лідер» **3** (табл. 1), що дозволяє зробити висновок про критичний вплив бензотіазольного фрагменту в положенні 3 тіазолідинового циклу на протираковий ефект.

Серед 5-ариліденопохідних 2-(6-метилбензотіазоліліміно)-4-тіазолідону (сполуки **16**–**20**) виділено «сполуку-лідер» **20**, що виявила високу протипухлинну активність на всі лінії ракових клітин (середнє значення GI = -36,88%) і відібрана для наступного етапу досліджень. Решта тестованих похідних

Цитотоксичність синтезованих сполук у концентрації 10^{-5} М на 60 лініях ракових клітин

Сполука	Середня мітотична активність 60 ліній, %	Діапазон мітотичної активності 60 ліній, %	Найчутливіші лінії клітин і мітотична активність, GP%
1	98,52	77,27 ÷ 121,76	UO-31 (рак нирок) *: 77,27%
2	97,65	-0,71 ÷ 134,33	RXF 393 (рак нирок) *: -0,71%
3	50,36	-71,48 ÷ 117,53	NCI-H226 (недрібноклітинний рак легень): -8,13% HCT-15 (епітеліальний рак кишечника): -42,43% HL-60 (лейкемія): -7,40% MOLT-4 (лейкемія): -9,34% RPMI-8226 (лейкемія): 3,41% SR (лейкемія): -71,48% LOX-IMVI (меланома): -9,07% M-14 (меланома): -16,81%
4	74,74	20,02 ÷ 114,82	RPMI-8226 (лейкемія): 20,02% MOLT-4 (лейкемія): 36,83% SR (лейкемія): 38,52%
5	107,21	63,83 ÷ 156,53	SR (лейкемія) *: 63,83%
6	100,36	0,74 ÷ 192,37	HOP-92 (недрібноклітинний рак легень) *: 0,74%
7	107,49	78,63 ÷ 166,18	UO-31 (рак нирок) *: 78,63%
8	96,68	58,38 ÷ 139,01	CAKI-1 (рак нирок) *: 58,38%
9	102,60	79,10 ÷ 146,41	IGROV1 (рак яєчників) *: 79,10%
10	96,42	4,59 ÷ 129,06	IGROV1 (рак яєчників): 4,59% RXF 393 (рак нирок): 25,00% SK-MEL-2 (меланома): 25,27%
11	108,47	-3,57 ÷ 210,28	RXF 393 (рак нирок): -3,57% SK-MEL-2 (меланома): 5,64% UACC-257 (меланома): -0,04%
12	105,28	85,48 ÷ 150,15	UO-31 (рак нирок) *: 85,48%
13	103,22	78,99 ÷ 129,85	MALME-3M (меланома) *: 78,99%
14	105,93	69,93 ÷ 318,51	RPMI-8226 (лейкемія) *: 69,93%
15	106,91	91,91 ÷ 134,05	ACHN (рак нирок) *: 91,91%
16	69,02	22,52 ÷ 111,91	SF-295 (рак ЦНС): 22,52% NCI-H460 (недрібноклітинний рак легень): 31,60%
17	89,38	15,71 ÷ 186,16	NCI-H522 (недрібноклітинний рак легень): 15,71% NCI/ADR-RES (рак яєчників): 20,65%
18	56,54	4,01 ÷ 116,20	SF-295 (рак ЦНС): 4,01% NCI-H460 (недрібноклітинний рак легень): 25,42% HCT-116 (епітеліальний рак кишечника): 27,38%
19	91,85	51,40 ÷ 141,04	HOP-92 (недрібноклітинний рак легень) *: 51,40%
20	-36,88	-86,51 ÷ 77,08	SNB-75 (рак ЦНС): -86,51% SF-539 (рак ЦНС): -81,91% SNB-19 (рак ЦНС): -74,74% SK-OV-3 (рак яєчників): -85,42% OVCAR-3 (рак яєчників): -65,73% 786-0 (рак нирок): -84,07% TK-10 (рак нирок): -62,56% ACHN (рак нирок): -60,36% HOP-62 (недрібноклітинний рак легень): -79,21% HOP-92 (недрібноклітинний рак легень): -76,32% NCI-H23 (недрібноклітинний рак легень): -71,78% HCT-116 (епітеліальний рак кишечника): -8,78% MCF7 (рак молочної залози): -64,23% M-14 (меланома): -63,43%
21	105,63	80,36 ÷ 136,73	UO-31 (рак нирок) *: 80,36%
22	104,03	64,02 ÷ 150,17	HL-60 (лейкемія) *: 64,02%

Примітка: у зв'язку з незначною протираковою активністю сполук наведено результат мітотичної активності однієї найчутливішої лінії.

характеризуються помірною протипухлинною активністю *in vitro* (16, 18) чи її відсутністю (17, 19). Середня мітотична активність для 60 ліній на фоні зазначених сполук становила 69,02% (16), 56,54% (18), 89,38% (17), 91,85% (19) (табл. 1).

Можна зробити висновок, що на прояви протипухлинної активності має вплив будова ариліденового фрагменту в положенні 5 тіазолідинового циклу. За результатами формального аналізу взаємозв'язку «структура –

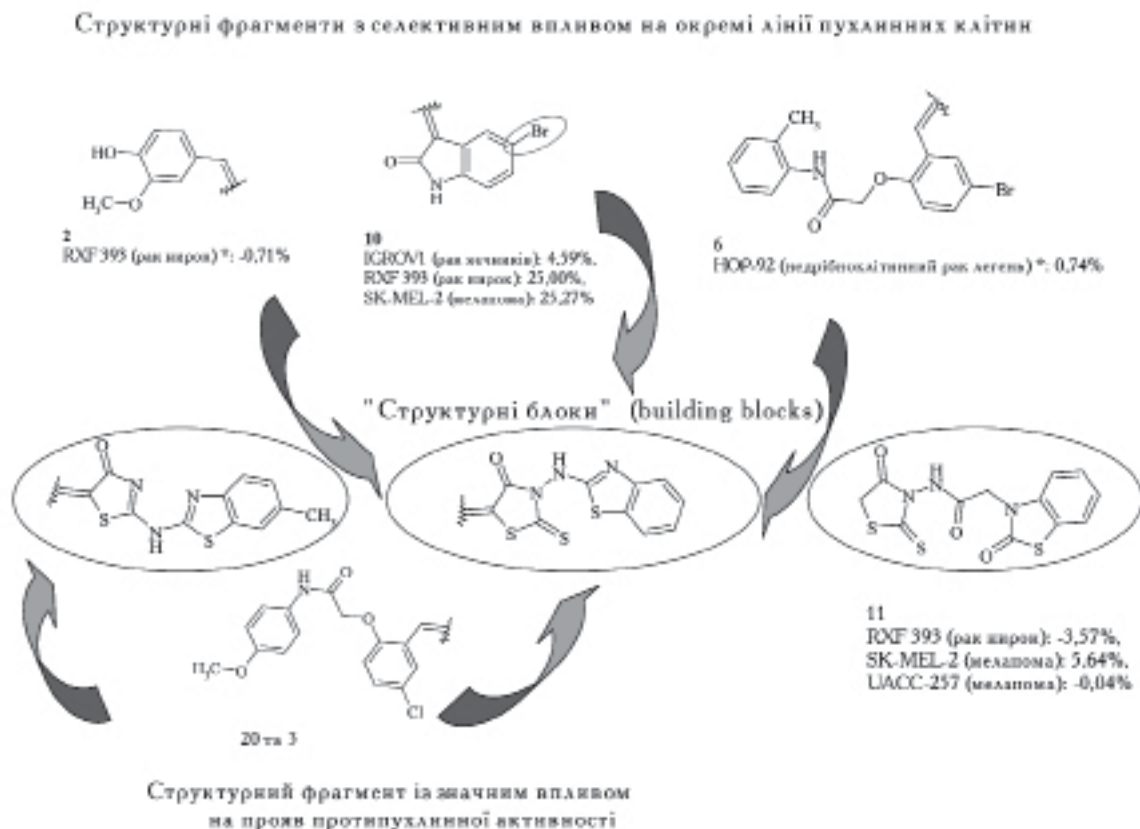


Рис. 1. Особливості кореляції «структура – протипухлинна активність» для 4-тіазолідонів з бензотіазольним фрагментом.

протипухлинна активність» можна трактувати 5-хлор-2-[(4-метоксифенілкарбамоїл)-метокси]-фенілметиліденовий залишок (сполуки 3, 20) як потенційний «фармакофорний фрагмент» для бензотіазолзаміщених 4-тіазолідонів. Необхідно зауважити, що саме введення зазначеного фрагменту зумовлює високий протираковий ефект похідних бензотіазолзаміщених тіазолідонів з різних рядів – 3 (похідне 3-(бензотіазол-2-іламіно)-2-тіоксо-4-тіазолідону) та 20 (похідне 2-(6-метилбензотіазоліліміно)-4-тіазолідону) (рис. 1).

За результатами прескринінгу ідентифіковані «сполуки-лідери» 3 і 20 відібрано для другого етапу досліджень, що полягав у тестуванні на 60 лініях пухлинних клітин у градієнті концентрацій (п'ять концентрацій при 10-кратному розведенні – 100µM, 10µM, 1µM, 0,1µM та 0,01µM).

За експериментальними результатами ґрунтового *in vitro* скринінгу сполук 3 і 20 розраховано три дозозалежні параметри: GI_{50} – концентрація, що викликає пригнічення росту 50% клітин лінії, TGI – концентрація сполуки, що зумовлює повне пригнічення росту, LC_{50} – концентрація речовини, що призводить до 50% загибелі клітин. Варто зауважити, що GI_{50} інтерпретують як ефективний рівень інгібування, TGI – як цитостатичний ефект, а LC_{50} є летальною концентрацією, що характеризує цитотоксичну дію. Якщо логарифмічні значення досліджуваних параметрів ($\log GI_{50}$, $\log TGI$ та $\log LC_{50}$) менше ніж -4,00, сполуки розглядають як активні.

При аналізі результатів ґрунтового *in vitro* скринінгу

тестовані сполуки 3 та 20 підтвердили високу протипухлинну активність на всіх лініях, про що свідчать показники середніх значень $\log GI_{50}$ та $\log TGI$, що становлять відповідно -5,34 та -4,50 (3); -4,97 і -4,20 (20).

У контексті специфічності дії високоактивних сполук необхідно зазначити, що похідне 3 проявляє яскраво виражений ефективний рівень інгібування клітин усіх досліджуваних ліній лейкемії, про що свідчить діапазон параметру $\log GI_{50}$ в межах -5,27 – -5,81. Водночас, цитостатична та цитотоксична дія на лінії лейкемії для сполуки 3 не характерна. Для сполуки 20 спостережено аналогічну до попереднього похідного картину специфічності впливу на лінії лейкемії (діапазон $\log GI_{50}$ = -4,80 – -5,26), а для клітин раку ЦНС рівень ефективного інгібування навіть дещо вищий (діапазон $\log GI_{50}$ = -4,93 – -5,75). Крім того, сполука 20 проявила значну цитостатичну (діапазон $\log TGI$ = -4,56 – -5,44) та цитотоксичну дію (діапазон $\log LC_{50}$ = -4,03 – -5,12) на тестовані лінії раку ЦНС. Заслуговує на увагу вплив похідного 3 на клітинні лінії меланоми, причому для зазначеного типу онкологічних захворювань спостережено як високий ефективний рівень інгібування (діапазон $\log GI_{50}$ = -5,21 – -5,87), так і достатній цитостатичний (діапазон $\log TGI$ = -4,33 – -5,52) та цитотоксичний (діапазон $\log LC_{50}$ = -4,20 – -5,20) ефекти.

Стосовно окремих пухлинних клітин необхідно відзначити інгібування сполукою 20 у субмікромольній концентрації клітинної лінії недрібноклітинного раку легень HOP-92



($\log GI_{50} = -6,34$). Для сполуки **3** в плані специфічності ефекту можна відзначити наступні лінії: SNB-75 ($\log GI_{50} = -5,80$, рак ЦНС), LOX IMVI ($\log GI_{50} = -5,78$, меланома), RPMI-8226 ($\log GI_{50} = -5,75$, лейкемія), OVCAR-3 ($\log GI_{50} = -5,70$, рак яєчників), MDA-MB-435 ($\log GI_{50} = -5,71$, рак молочної залози) та BT-549 ($\log GI_{50} = -5,72$, рак молочної залози).

За результатами II етапу досліджень сполука **3** відібрана Біологічним Комітетом NCI для рекомендації та затвердження стосовно проведення поглиблених доклінічних досліджень *in vivo*. Слід зазначити, що при вивченні токсичності *in vivo* ця сполука виявилась нетоксичною, про що свідчить протокол Nontumored Animal Toxicity Assays досліджень у NCI.

З метою встановлення можливого механізму протипухлинної активності «сполуки-лідера» **3** здійснено COMPARE аналіз до відомих протипухлинних агентів [11]. COMPARE аналіз полягав у порівнянні експериментальних значень параметрів GI_{50} і TGI досліджуваних сполук і відомих протипухлинних агентів. Отримані результати коефіцієнту кореляції Пірсона (r) не дозволяють однозначно передбачити механізм цитотоксичності тестованих сполук. Найвищі показники кореляції знайдено до Rifamycin SV (інгібітор РНК полімерази, $r = 0,531$) та Thallicarpine (інгібітор *p*-глікопротеїну, $r = 0,516$).

ВИСНОВКИ

За результатами вивчення протипухлинної активності ідентифіковано «сполуки-лідери» 2-{2-[3-(бензотіазол-2-іламіно)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил]-4-хлорфенокси}-*N*-(4-метоксифеніл)-ацетамід (**3**) та 2-{4-хлор-2-[2-(6-метилбензотіазол-2-іламіно)-4-оксо-4*H*-тіазол-5-іліденметил]-фенокси}-*N*-(4-метоксифеніл)-ацетамід (**20**) з високими показниками інгібування пухлинного росту без вираженої селективності дії, при чому сполуку **3** обрано для поглибленого дослідження *in vivo*.

Встановлено, що на прояв протипухлинної активності бензотіазолзаміщених похідних 4-тіазолідону критичний вплив має будова замісника в 5 положенні тіазолідинового циклу, при чому найсприятливішою є наявність 5-хлор-2-[(4-метоксифенілкарбамоїл)-метокси]-фенілметиліденового залишку, який можна вважати потенційним «фармакоформним» фрагментом для зазначеної групи сполук.

Показано, що найсуттєвіший вплив на протипухлинну

активність 3-бензотіазолзаміщених похідних роданіну має розмір молекули та її розгалуженість.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мосула Л.М. Синтез та дослідження протитуберкульозної активності 5-ариліден-3-(бензотіазол-2-іламіно)-2-тіоксо-4-тіазолідонів / Л.М. Мосула, Р.Б. Лесик // Фармацевтичний журнал. – 2008. – №1. – С. 56–61.
2. Синтез та попередня оцінка фармакологічного потенціалу похідних роданіну з бензотіазольним фрагментом у молекулах / Л.М. Мосула, Д.Я. Гаврилюк, Г.В. Казьмірчук [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2009. – №1. – С. 54–60.
3. Мосула Л.М. Противірусна активність 3-бензотіазолзаміщених похідних 4-тіазолідину / Л.М. Мосула // Фармацевтичний часопис. – 2012. – №3. – С. 22–26.
4. Пат. 32670 Україна, МПК С 07 D277/00. 2-{2-[3-(Бензотіазол-2-іламіно)-4-оксо-2-тіоксотіазолідин-5-іліденметил]-4-хлорфенокси}-*N*-(4-метоксифеніл)-ацетамід, що виявляє протипухлинну активність / Мосула Л.М., Зіменковський Б.С., Лесик Р.Б., Гаврилюк Д.Я.; заявник і патентовласник ЛНМУ ім. Данила Галицького. – № u200800401; заявл. 11.01.2008; опубл. 26.05.08, Бюл. №10.
5. Synthesis and antitumor activity of novel 2-thioxo-4-thiazolidinones with benzothiazole moieties / L. Mosula, B. Zimenkovsky, D. Havrylyuk [et al.] // Farmacia. – 2009. – Vol. 57, № 3. – P. 321–330.
6. Протипухлинна активність та QSAR-аналіз похідних роданіну з бензотіазольним фрагментом у молекулах / Л.М. Мосула, Б.С. Зіменковський, В.В. Огурцов [та ін.] // Фармацевтичний журнал. – 2010. – №2. – С. 77–83.
7. Synthesis and anticancer activity evaluation of 4-thiazolidinones containing benzothiazole moiety / D. Havrylyuk, L. Mosula, B. Zimenkovsky [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 45, №11. – P. 5012–5021.
8. Мосула Л.М. Синтез нових 5-ариліден-2-(6-метилбензотіазоліліміно)-4-тіазолідонів / Л.М. Мосула, Д.Я. Гаврилюк, Р.Б. Лесик // Фармацевтичний часопис. – 2009. – №1. – С. 6–9.
9. Boyd M. R. The NCI Human Tumor Cell Line (60-Cell) Screen: Concept, Implementation, and Applications / Boyd M. R. B.A. Teicher, P.A. Andrews // Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. – Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. – P. 41–62.
10. Anticancer potencial of 4-azolidones and related heterocycles / R. Lesyk, B. Zimenkovsky, D. Kaminsky [et al.] // Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. – 2006. – Vol. 19, №1 (19). – P. 107–110.
11. COMPARE: a web accessible tool for investigating mechanisms of cell growth inhibition / D.W. Zaharevitz, S.L. Holbeck, C. Bowerman [et al.] // Journal of Molecular Graphics and Modeling. – 2002. – Vol. 20, №4. – P. 297–303.

Відомості про автора:

Мосула Л.М., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського.

Поступила в редакцію 27.11.2012 г.