

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ ІМ. В.П. КУХАРЯ

Тарнавський Сергій Степанович

УДК 547.748.4+547.785.51+547.743.4

**Синтез та вивчення протипухлинної активності похідних
2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону**

02.00.10 – біоорганічна хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник:

доктор хімічних наук, професор
ЯРМОЛЮК Сергій Миколайович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН
України, завідувач відділу біомедичної хімії

Офіційні опоненти:

доктор хімічних наук, доцент
МАТІЙЧУК Василь Степанович,
Львівський національний університет
ім. Івана Франка МОН України,
професор кафедри органічної хімії

доктор фармацевтичних наук, професор
ДЕМЧЕНКО Анатолій Михайлович,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології
НАМН України», завідувач відділу медичної
хімії

Захист дисертації відбудеться «31» жовтня 2019 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України за адресою: 02094, м. Київ-94, вул. Мурманська, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України.

Автореферат розіслано « 27» вересня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В. О. Євдокименко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Онкологічні захворювання займають друге місце у світі серед причин людської смертності. Щорічно реєструється близько 6 мільйонів нових випадків захворювання злоякісними пухлинами. На сьогоднішній день доступні кілька десятків препаратів для лікування раку і ще декілька знаходяться на різних фазах клінічних випробувань. Але враховуючи динаміку виникнення резистентності у різних пухлин до цих терапевтичних препаратів та гетерогенність злоякісних утворень, є суттєва потреба у розробці нових протипухлинних агентів.

Одним із основних підходів розробки сполук з протипухлинною активністю є хімічна оптимізація вже відомих лікарських засобів. У складі багатьох протипухлинних агентів (стауроспорин, ребекаміцин, біс-індолілмалеїміди та інші) наявні фрагменти дигідропіролонів. Тому синтез та вивчення нових похідних цього класу сполук з протипухлинною активністю є актуальним завданням біоорганічної хімії.

Сучасним підходом для розробки ліків є мішень-спрямований раціональний дизайн. Однією з валідованих мішеней для розробки протипухлинних препаратів є протеїнкіназа рецептору фактору росту фібробластів 1 (FGFR1). На сьогодні відомо лише кілька інгібіторів протеїнкінази FGFR1 (доватініб, понатініб, регорафеніб, пазопаніб та ленватініб), що перебувають на різних стадіях клінічних досліджень, як протипухлинні засоби.

Таким чином, розробка нових інгібіторів протеїнкінази FGFR1 є перспективним шляхом пошуку сполук з протипухлинною активністю серед похідних дигідропіролонів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетної теми відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: “Вивчення протеїнкіназ як молекулярних мішеней для розробки терапевтичних засобів методами комбінаторної хімії та комп'ютерного моделювання” (номер державної реєстрації 0107U003345, 2008–2012 рр), “Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів” (номер державної реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.) та конкурсної тематики “Оптимізація інгібіторів протеїнкіназ та дослідження їхньої біологічної активності на культурах ракових клітин” (номер державної реєстрації 0107U004939, 2007–2009 рр.).

Мета і завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи – синтез та вивчення протипухлинної активності нових похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону.

Для досягнення цієї мети поставлено та розв'язано такі завдання:

1. Розробити препаративні методики синтезу похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону.
2. Проаналізувати залежність протипухлинної активності синтезованих сполук від їхньої хімічної структури. Запропонувати напрямки подальшої хімічної оптимізації активних сполук на основі аналізу даних біологічного тестування.

3. Синтезувати спрогнозовані структури похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та дослідити їх на протипухлинну активність.
4. Розробити препаративні методики синтезу похідних 1,2-дигідропірол-3-ону, відібраних методом молекулярного докінгу, як інгібіторів протеїнкінази FGFR1.
5. Проаналізувати залежність інгібувальної активності щодо протеїнкінази FGFR1 синтезованих похідних 1,2-дигідропірол-3-ону від їхньої хімічної структури.
6. Співставити інгібувальну активність знайдених інгібіторів FGFR1 з їхньою антипроліферативною активністю відносно клітинної лінії гострої мієлоїдної лейкемії KG1.

Об'єкт дослідження – інгібувальна активність органічних сполук відносно клітинних ліній різних типів злоякісних пухлин людини.

Предмет дослідження – органічні сполуки як інгібітори росту ракових клітин на основі похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону.

Методи дослідження – хімічний синтез, фізико-хімічні методи аналізу органічних речовин (ЯМР-спектроскопія, хромато-мас-спектрометрія, тонкошарова хроматографія), гнучкий молекулярний докінг, біохімічне тестування на пухлинних клітинних лініях, біохімічне тестування активності протеїнкіназ із використанням радіоактивно міченого ^{32}P -АТФ.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті виконання дисертаційної роботи синтезовано й досліджено фізико-хімічні властивості нових похідних 4-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону та 5-аміно-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1-арил-1,2-дигідропірол-3-ону.

Уперше запропоновано ефективний та зручний одностадійний («одноколбовий») метод синтезу нових похідних 3-арилсульфаніл-4-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону.

Уперше запропоновано метод синтезу сполук класу 3-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону шляхом відновлення похідних 3-арилсульфаніл-4-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону під дією надлишку тіофенолів.

Уперше знайдено нові інгібітори росту пухлинних клітинних ліній людини серед похідних 4-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону з GI_{50} в інтервалі від 0,01 до 2 мкМ (рак нирок, легенів, яєчників, грудей, лейкемія) та нові інгібітори росту пухлинної клітинної лінії KG1 серед похідних 5-аміно-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1-арил-1,2-дигідропірол-3-ону з IC_{50} в інтервалі від 2 до 9,3 мкМ.

Уперше знайдено селективні інгібітори протеїнкінази FGFR1 серед похідних 5-аміно-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1-арил-1,2-дигідропірол-3-ону зі значеннями IC_{50} 0,32 і 0,63 мкМ.

Практичне значення одержаних результатів. Одностадійний («одноколбовий») препаративний метод синтезу похідних 3-арилсульфаніл-4-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону може бути використано для широкого спектру комбінаторного синтезу цього класу сполук.

Знайдені серед нових похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону сполуки з антипроліферативною активністю – **2.8** ($\text{GI}_{50} = 0,26$ мкМ), **2.11** ($\text{GI}_{50} = 0,55$ мкМ), **3.1** ($\text{GI}_{50} = 0,01$ мкМ), **5.8** ($\text{IC}_{50} = 2$ мкМ), **5.7** ($\text{IC}_{50} = 9$ мкМ), **5.14** ($\text{IC}_{50} =$

5,6 мкМ), **5.15** ($IC_{50} = 9,3$ мкМ) є перспективними для розробки на основі них нових протипухлинних препаратів.

Розроблені інгібітори протеїнкінази FGFR1, зокрема сполуки **5.14** ($IC_{50} = 0,63$ мкМ) та **5.15** ($IC_{50} = 0,32$ мкМ) пропонуються для використання у наукових дослідженнях з метою вивчення структури й особливостей функціонування протеїнкінази FGFR1.

Особистий внесок здобувача. Автором проведено аналіз наукової літератури, обрані загальні методики синтезу та основні методи дослідження. У процесі виконання дисертаційної роботи автором власноруч проведено синтез більше 150 органічних сполук. Особисто проведено аналіз спектральних досліджень і встановлено структури синтезованих сполук. Розроблено ефективний одностадійний (one-pot) метод синтезу нових похідних 3-арилсульфаніл-4-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону та новий метод синтезу 4-незаміщених похідних 3-ариламіно-2,5-дигідропірол-2,5-діону. Проаналізовано залежність протипухлинної активності сполук від їхньої хімічної структури та запропоновано напрямки хімічної оптимізації структур найактивніших сполук.

Тестування на пухлинних клітинних лініях людини проведено у співробітництві з Національним Інститутом Раку (National Cancer Institute), США та у компанії Унібіоскрин (Unibioscreen S.A.), Бельгія. Тестування на клітинній лінії KG1 гострої мієлоїдної лейкемії проведено к.б.н. Т.О. Рубан у відділі генетики людини ІМБіГ НАН України. Молекулярний докінг, аналіз молекулярних комплексів інгібіторів із протеїнкіназою FGFR1 та біологічне тестування на ферменті проведено спільно з м.н.с. А.А. Грищенком. Постановку наукових завдань дослідження і подальшу інтерпретацію отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником д.х.н., професором С. М. Ярмолюком та к.х.н. В.Г. Бджолою.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на: Міжнародних конференціях з хімії азотовмісних гетероциклів «СNH-2000» і «СNCH-2003» (Харків, 2000, 2003), ХХ Українській конференції з органічної хімії (Одеса, 2004), ХХХІ Науковій конференції з біоорганічної хімії та нафтохімії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України (Київ, 2016), ХІV Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії (Дніпропетровськ, 2016).

Публікації. За матеріалами роботи опубліковано 15 праць, з них 8 статей у провідних фахових журналах, 1 патент на винахід і 6 тез наукових доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у трьох розділах, аналізу й узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел, який нараховує 132 найменування.

Дисертаційна робота налічує 134 сторінки друкованого тексту, містить 17 таблиць, 8 схем, 18 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету та завдання дослідження, відображено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

Перший розділ присвячено аналізу наукової літератури за темою дисертаційної роботи, узагальненню даних щодо сполук з протипухлинною активністю, які мають у своїй структурі фрагменти 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону.

Другий розділ присвячено матеріалам та методам дослідження. Температури плавлення вимірювали на приладі Кофлера. Спектри ЯМР ^1H та ^{13}C записували на спектрометрі «Varian VXR 400» при 400 та 100 МГц відповідно. Внутрішній стандарт – ТМС. Хромато-мас-спектрометрію (HPLC-MS) виконано за допомогою Agilent 1100 LC/MSD SL розділювального модуля та MassQuad G1956B мас-детектора з протонною іонізацією. HPLC проведено з використанням Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HT Cartridge 4.6×30 mm 1.8-Micron. Сполуки детектували при $\lambda = 215 \text{ nm}$, використовуючи Diode Array G1315B детектор.

Для підготовки бази даних віртуальних органічних сполук використано програмний пакет «Instant JChem 5.11.5». Молекулярний докінг проводили в АТФ-акцепторний сайт кристалічної структури протеїнкінази FGFR1 людини. Для докінгу та скорингу лігандів застосовували програмний пакет «Autodock 4.2». Візуальний аналіз взаємодії сполук з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувальної кишені протеїнкінази FGFR1 проводили в програмі «Viewer Lite 4.2».

Тестування ефективності інгібіторів проводили *in vitro* методом з радіоактивно міченим ^{32}P -АТФ. Використовували протеїнкіназу FGFR1 (#14-582, Millipore, США). Субстратом для протеїнкінази слугував пептид KKKSPGEYVNIIEFG, (GenScript). Рівень радіоактивного сигналу вимірювали за допомогою сцинтиляційного лічильника Perkin Elmer (модель «Tri-Carb 2800-TR»). Для визначення IC_{50} використано низку концентрацій інгібітора й отримано титрувальні криві. Селективність інгібіторів по відношенню до протеїнкінази FGFR1 було перевірено на чотирьох серин-треонінових (CK2, ASK1, JNK3, Aurora A) та двох тирозинових протеїнкіназах (cMet і Tie2).

Тестування на клітинних лініях виконували у співробітництві з Американським Національним Інститутом Раку. На першому етапі проводили прескринінг сполук на трьох пухлинних лініях клітин (рак молочної залози, рак легенів, ЦНС) при одній стандартній концентрації 10^{-4} M . Найактивніші сполуки тестували на панелі з 56 клітинних ліній. Тестування деяких синтезованих сполук виконували у співробітництві з лабораторією Унібіоскрін, з використанням МТТ-тесту на 6 пухлинних клітинних лініях людини, які належать до різних видів тканин, у концентраціях сполук від 10^{-5} M до 10^{-9} M .

Антипроліферативну активність похідних 5-аміно-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1-арил-1,2-дигідропірол-3-ону досліджували у відділі генетики людини ІМБІГ НАНУ

на клітинних лініях KG1 за допомогою МТТ-тесту. Токсичність сполук перевіряли на умовно-нормальній клітинній лінії НЕК293. Життєздатність клітин виражали у відсотках по відношенню до необроблених контрольних клітин.

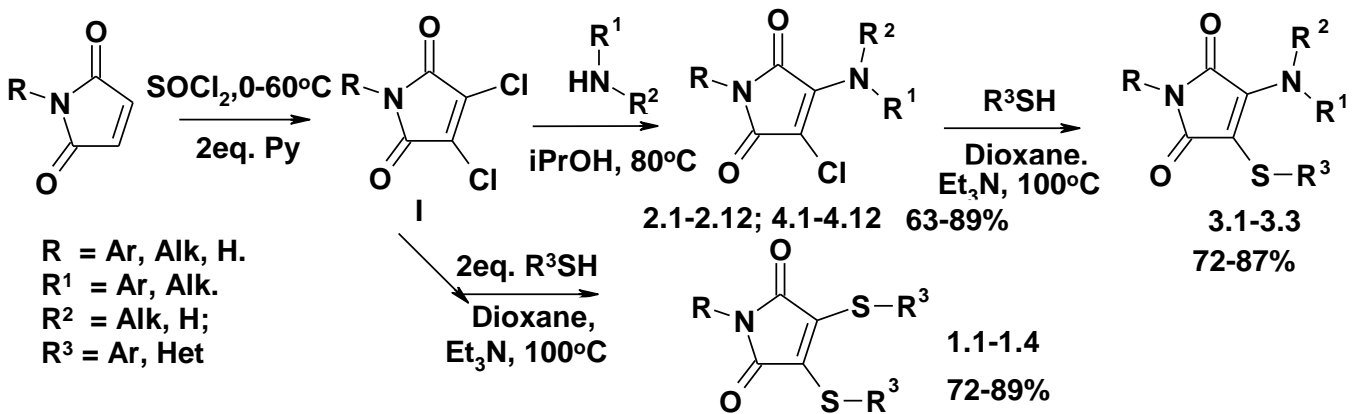
ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ

Синтез та вивчення протипухлинної активності похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону (розділ 3).

Для пошуку сполук з протипухлинною активністю використано методики [R. Oda et al. – Tetrahedron. – 1968] для синтезу 70 похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону з різними замісниками у положеннях N-1, C-3 та C-4 (схема 1). Виходи склали 53-89%. З них 39 сполук відібрано та протестовано на протипухлинну активність на 56 пухлинних клітинних лініях у Національному Інституті Раку (США).

Схема 1

Загальна схема синтезу похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону



За результатами тестування було вперше знайдено сполуку **2.1** (1-бензил-3-хлоро-4-(3-гідроксифеніламіно)-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіон) (рис.1), яка мала протипухлинну активність у мікромолярних концентраціях на трьох клітинних лініях людини: OVCAR-3 (рак яєчників): $GI_{50} = 3,35$ мкМ, $TGI = 12,1$ мкМ, $LC_{50} = 37,6$ мкМ; NCI-H23 (рак легенів): $GI_{50} = 6,75$ мкМ, $TGI = 19,8$ мкМ, $LC_{50} = 44,5$ мкМ; MDA-MB-435 (рак грудей): $GI_{50} = 2,68$ мкМ, $TGI = 8,37$ мкМ, $LC_{50} = 31,7$ мкМ.

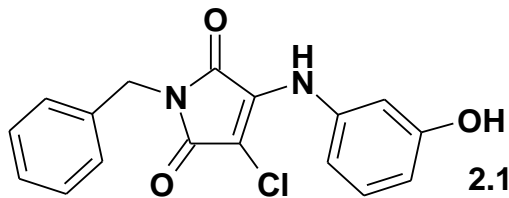


Рис. 1. Хімічна структура сполуки **2.1**

Примітки: GI_{50} - концентрація інгібітора, при якій пригнічується ріст клітин на 50%,
 TGI - концентрація інгібітора, при якій призупиняється ріст клітин,
 LC_{50} - концентрація інгібітора, при якій гинуть 50% клітин.

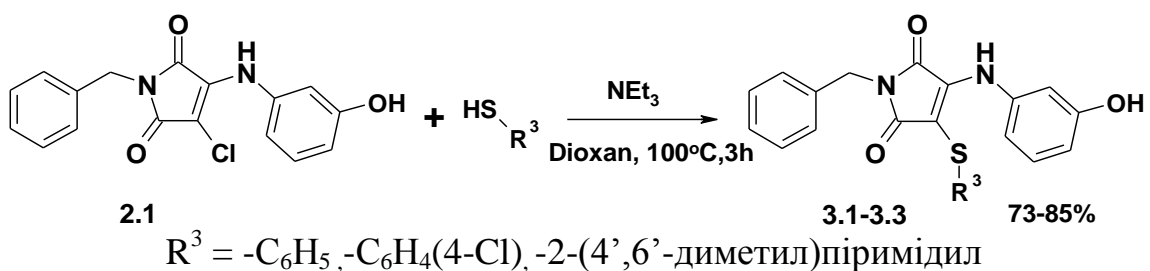
Результати прескринінгу сполук **2.1-2.12** на протираковинну активність в концентрації 10^{-4} М

Сполуки	R	Протираковинна активність порівняно з контролем, %			Висновок
		Рак молочної залози	Рак легенів	Рак ЦНС	
2.1	-CH ₂ C ₆ H ₅	1	4	18	Активна
2.2	-CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	57	19	71	Неактивна
2.3	-C ₆ H ₅	63	61	73	Неактивна
2.4	-(4-OCH ₃)-C ₆ H ₄	89	46	99	Неактивна
2.5	-(2-Cl)-C ₆ H ₄	89	28	76	Неактивна
2.6	-(3-Cl)-C ₆ H ₄	15	1	20	Активна
2.7	-(4-Cl)-C ₆ H ₄	68	44	64	Неактивна
2.8	-(2,3-Cl ₂)-C ₆ H ₃	1	1	11	Активна
2.9	-(2,4-Cl ₂)-C ₆ H ₃	1	1	5	Активна
2.10	-(3,4-Cl ₂)-C ₆ H ₃	1	1	1	Активна
2.11	-(3-Cl,4-CH ₃)-C ₆ H ₃	1	1	1	Активна
2.12	-(2-OCH ₃ ,5-Cl)-C ₆ H ₃	27	11	24	Неактивна

Оптимізація сполуки **2.1** по фрагменту С. Похідні 1-бензил-3-(3-гідроксифеніл)аміно-4-сульфаніл-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону (**3.1-3.3**) (схема 3) синтезували згідно методики: до розчину 1 еквіваленту сполуки **2.1** у діоксані додавали 1,1 еквіваленту відповідного тіофенолу або 2-меркапто-4,6-диметилпіримідину та 1,1 еквіваленту триетиламіну. Суміш кип'ятили впродовж 3 годин, розчинник випаровували та залишок перекристалізували із спирту. Виходи сполук **3.1-3.3** становили 79, 82 та 75 % відповідно.

Схема 3

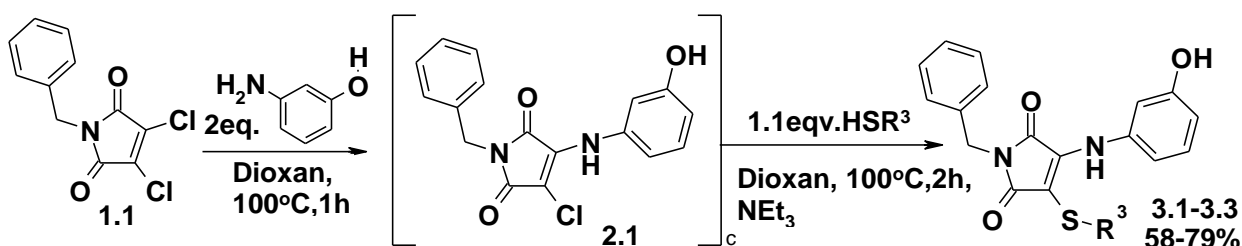
Загальна схема синтезу похідних 1-бензил-3-(3-гідроксифеніламіно)-4-сульфаніл-2,5-дигідро-1H-2,5-піролдіону



Запропоновано ефективний та зручний одностадійний («одноколбовий») метод синтезу похідних 1-бензил-3-(3-гідроксифеніл)аміно-4-(сульфаніл)-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону шляхом послідовного додавання відповідних компонентів анілінів та тіолів (схема 4). Цим методом прибирається одна стадія, збільшується загальний вихід продуктів реакції та скорочується час одержання кінцевого продукту, порівняно зі стандартним двостадійним методом.

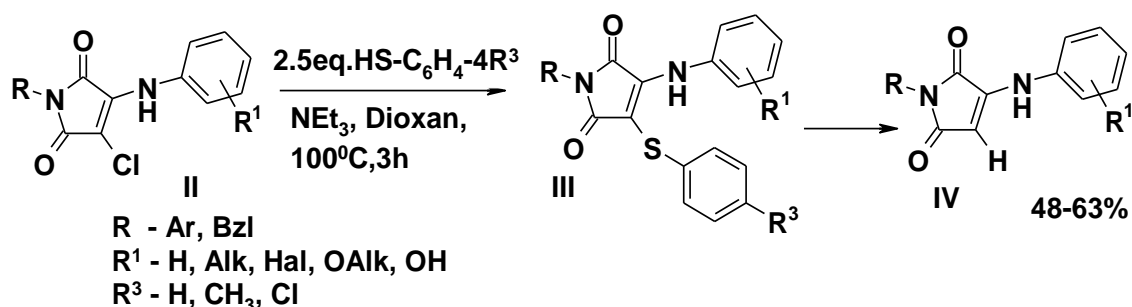
Схема 4

Одностадійний метод синтезу похідних 1-бензил-3-(3-гідроксифеніл)аміно-4-сульфаніл-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону



У випадку додавання надлишку 2-3 еквівалентів відповідного тіофенолу до сполук загальної структури II спочатку спостерігалось утворення сполук структури III, а потім - структури IV, що підтверджуються даними ЯМР та хромато-мас спектроскопії. Таким чином знайдено новий метод синтезу 4-незаміщених похідних 3-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону загальної структури IV з відновленням атому Хлору в 3-положенні малеїмідного циклу (схема 5).

Схема 5



Сполуки класу IV (3-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону) не були відібрані та не тестувалися на протипухлинну активність.

Результати попереднього скринінгу на протипухлинну активність сполук 3.1-3.3 на трьох клітинних лінях в концентрації 10^{-4} М наведено в таблиці 2.

Результати скринінгу сполук **3.1-3.3** на протипухлинну активність

Сполуки	R ₃	Протипухлинна активність порівняно з контролем, %			Висновок
		Рак молочної залози	Рак легенів	Рак ЦНС	
3.1	-C ₆ H ₅	2	0	3	Активна
3.2	-C ₆ H ₄ (4-Cl)	1	0	0	Активна
3.3	-2-(4',6'-диметил)піримідил	78	68	87	Неактивна

Заміщення атома Хлору в положенні С-3 малеїмідного циклу вихідної сполуки **2.1** на 2-тіо-4,6-диметилпіримідин (сполука **3.3**) спричинює втрату протипухлинної активності, а таке ж заміщення на тіофеноли (сполуки **3.1**, **3.2**) підвищує цитотоксичну дію на пухлинні клітинні лінії. Особливо зростає протипухлинна активність при введенні в положення С-3 малеїмідного циклу незаміщеного тіофенолу. Сполука **3.1** (рис. 5) показала найкращу активність серед тестованих сполук на трьох пухлинних клітинних лініях: GI₅₀ = 0,01 мкМ, TGI = 16,8 мкМ, LC₅₀ = 63 мкМ (TK-10, рак нирок); GI₅₀ = 1,36 мкМ, TGI = 4,07 мкМ, LC₅₀ = 15,5 мкМ (RPMI-8226, лейкемія); GI₅₀ = 1,84 мкМ, TGI = 19,9 мкМ, LC₅₀ = 100 мкМ (T-47D, рак молочної залози).

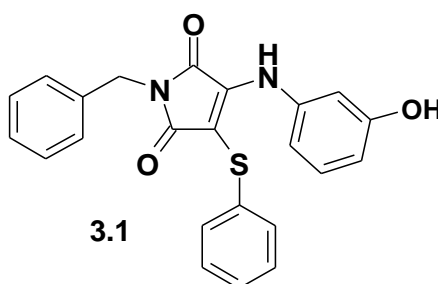
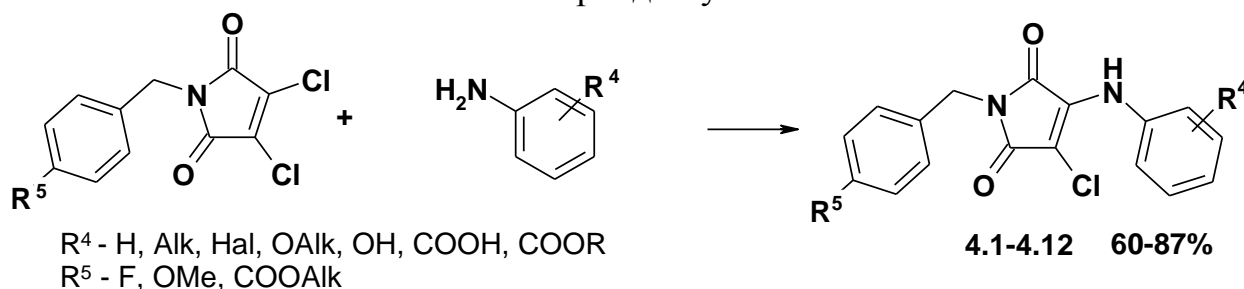


Рис. 5. Хімічна структура сполуки **3.1**, яка показала найкращий результат

Оптимізація сполуки **2.1** по фрагментам А та В. Хімічну оптимізацію структури сполуки **2.1** здійснено шляхом варіювання R⁵-замісниками у бензильному (А) та R⁴-замісниками в аніліновому (В) фрагментах. Синтез 20 похідних проведено за загальною схемою 6.

Загальна схема синтезу похідних 1-бензил-3-хлоро-4-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону



Біологічне тестування сполук **4.1-4.12** здійснювалося у компанії Унібіоскрин (Бельгія) на 6 пухлинних лініях клітин людини (табл.3) у діапазоні концентрацій від 10 мкМ до 0,001 мкМ. У таблиці подано усереднені значення експерименту.

Таблиця 3

Протипухлинна активність сполук **4.1-4.12** у концентраціях 0,001-10 мкМ

Сполука	R^5	R^4	Концентрація (мкМ) та протипухлинна активність (% виживання пухлинних клітин)									IC ₅₀ мкМ
			10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	
4.1	F	3-Br	33,8	54,7	93,2	90,4	98,2	90,9	96,1	91,5	64,8	5
4.2	F	3-OH	51,2	71,3	86,0	80,7	81,0	75,5	73,1	72,1	57,1	10
4.3	F	3-Cl	38,6	67,7	100	102	98,6	99,7	109	97,0	92,8	5
4.4	F	3-OH, 4-CH ₃	81,0	87,8	96,0	95,5	92,6	83,6	83,8	84,0	67,9	>10
4.5	F	3-F	31,2	55,4	94,1	94,9	83,5	97,2	96,6	90,5	83,6	5
4.6	F	3-OEt	94,6	95,2	103	101	104	114	118	116	102	>10
4.7	F	3-I	52,7	84,6	112	122	122	117	114	103	104	>10
4.8	F	4-OEt	115	121	135	133	120	119	119	95,9	98,7	>10
4.9	COOMe	3-OH	53,4	71,6	138	125	130	124	124	105	91,3	>10
4.10	COOMe	2-CH ₃ 5-Cl	50,8	76,8	123	118	124	115	118	114	108	>10
4.11	OMe	3-I	58,4	89,9	113	113	108	106	115	112	111	>10
4.12	COOPr	3-OH	46,9	57,6	83,2	101	112	110	110	113	113	5

Серед сполук з вираженою цитотоксичною дією, найактивнішими виявилися сполуки **4.1**, **4.2**, **4.3**, **4.5** та **4.12**, що мають атоми галогену та гідроксильну групу у *мета*-положенні анілінового залишку та *n*-фторобензильний замісник у *N1* положенні 2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролідіону (рис. 6).

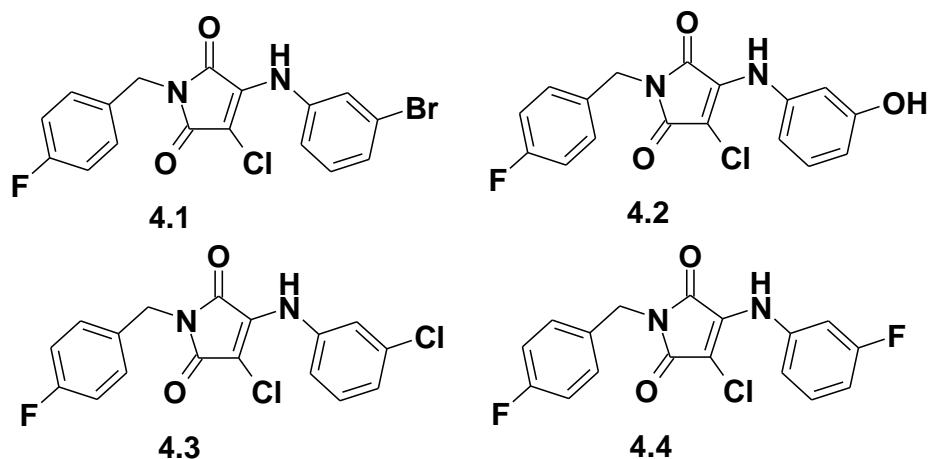


Рис. 6. Хімічні структури сполук, які показали найкращу активність

Таким чином ці сполуки знижували загальну життєздатність клітин на 50% (IC_{50}) у діапазоні концентрацій від 5 до 10 мкМ (табл. 3). Це говорить про те, що вони можуть бути перспективними для розробки на основі них протипухлинних препаратів.

Синтез та пошук сполук із протипухлинною активністю серед похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону (розділ 4).

Рецептор фактору росту фібробластів 1 (FGFR1) відіграє важливу роль у процесі канцерогенезу та є привабливою молекулярною мішенню для розробки нових протипухлинних препаратів. Експериментально було продемонстровано, що інгібування FGFR1 специфічним кіназним інгібітором призводить до значного зниження рівня проліферації клітин та зупинки клітинного циклу на стадії G1 у деяких клітинних лініях.

У результаті молекулярного докінгу бібліотеки, що налічувала близько ста тисяч сполук, в АТФ-акцепторний сайт протеїнкінази FGFR1 та після тестування *in vitro* відібраних сполук, нами знайдено сполуку **5.1**, що належала до похідних 5-аміно-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1-арил-1,2-дигідропірол-3-ону, зі значенням $IC_{50} = 3,5$ мкМ (рис. 7). Вона має певну хімічну подібність (коефіцієнт Танімото = 0,4 по фінгерпринтах FCFP4) до мультитаргетного інгібітора тирозинових протеїнкіназ TKI258 (довітініб) (рис. 7). TKI258 – це АТФ-конкурентний інгібітор протеїнкіназ VEGFR2, FGFR1, PDGFR, який знаходиться на третій стадії клінічних досліджень як засіб для лікування ренальної карциноми та на другій стадії – як засіб для лікування пацієнтів із прогресивним раком молочної залози. Тому було вирішено провести хімічну оптимізацію структури сполуки **5.1**.

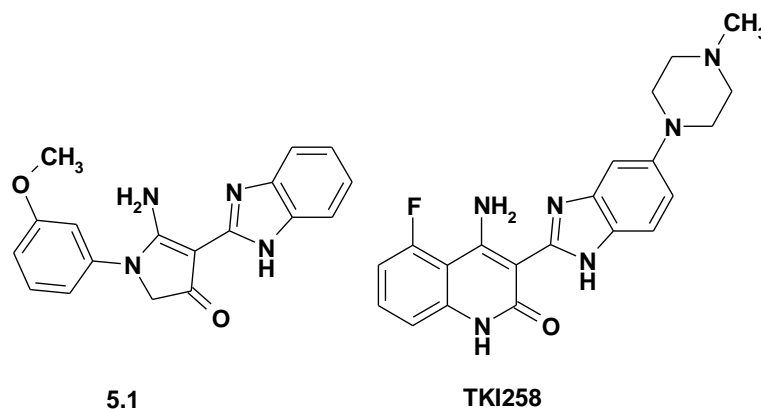
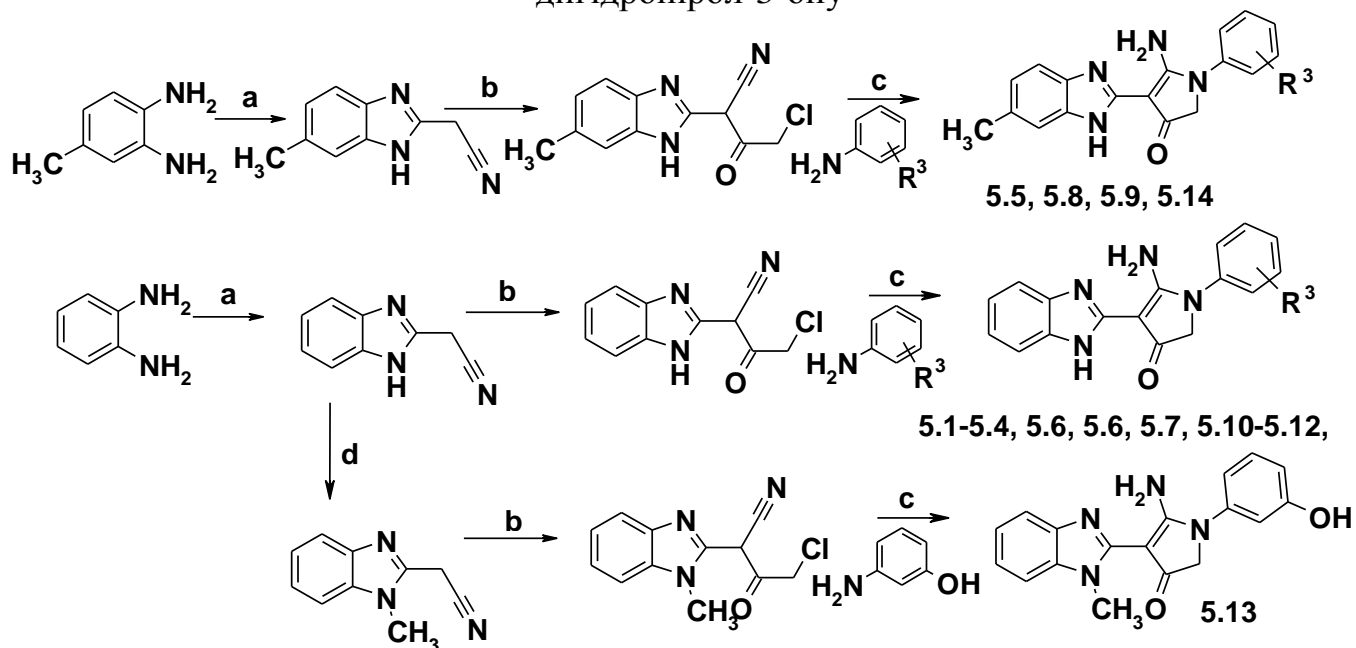


Рис. 7. Хімічні структури сполуки **5.1** та мультикіназного інгібітора TKI258

Методом молекулярного докінгу віртуальної бібліотеки 98 нових похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону нами відібрано та синтезовано за методиками [Volovenko Y. et al. – Eur. J. Org. Chem. – 2002. – 4. – P. 663] 29 сполук з виходами 63-85% (схема 5).

Схема 5

Загальна схема синтезу похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону



Умови синтезу: а) $\text{CNCH}_2\text{COOCH}_3$, 178°C , 1 год.; в) ClCH_2COCl , триетиламін, діоксан, $0-20^\circ\text{C}$, 1 год.; с) ДМФА, 145°C , 2-3 год.; д) вода, гідроксид натрію, диметилсульфат, 1 год.

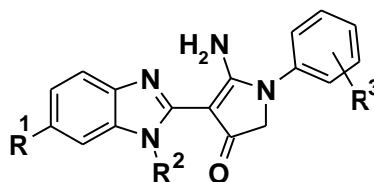
Досліджено залежність інгібувальної активності по відношенню до протеїнкінази FGFR1 від хімічної будови похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону (табл. 4).

Сполука **5.7** з *мета*-хлорофенільним залишком демонструє втричі кращу інгібувальну активність ($\text{IC}_{50} = 1,12 \text{ мкМ}$) по відношенню до протеїнкінази FGFR1 ніж сполука **5.1**. Сполука **5.4** з 2,5-диметоксифенільним залишком має активність такого ж рівня ($\text{IC}_{50} = 3,28 \text{ мкМ}$), а сполука **5.6** з 2-метокси-5-хлорофенільним

залишком має активність в 5,5 разів вищу ($IC_{50} = 0,6$ мкМ) ніж у сполуки **5.1**. Введення гідроксильної групи в *meta*-положення арильного замісника веде до значного зростання інгібувальної активності щодо FGFR1 (сполука **5.15**, $IC_{50} = 0,32$ мкМ), а наявність метильної групи в положенні *N1* бензімідазолу знижує інгібувальну активність (сполука **5.13**, $IC_{50} = 3,8$ мкМ). Імовірною причиною цього ефекту є блокування *NH*-групи бензімідазолу, що є донором водневого зв'язку, залученого у взаємодію з АТФ-акцепторним сайтом протеїнкінази FGFR1. Метильна група в положенні С-6 бензімідазолу лише незначним чином знижує інгібувальну активність сполук **5.8** ($IC_{50} = 1,85$ мкМ) та **5.14** ($IC_{50} = 0,63$ мкМ).

Таблиця 4

Інгібувальна активність похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону по відношенню до протеїнкінази FGFR1



Сполука	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ , мкМ
5.1	H	H	3-OCH ₃	3,5
5.2	H	H	2-OCH ₃	9,9
5.3	H	H	4-OCH ₃	7
5.4	H	H	2,5-diOCH ₃	3,28
5.5	CH ₃	H	2-OCH ₃ , 5-CH ₃	11
5.6	H	H	2-OCH ₃ , 5-Cl	0,6
5.7	H	H	3-Cl	1,12
5.8	CH ₃	H	3-Cl	1,85
5.9	CH ₃	H	3-F	7,3
5.10	H	H	3-CF ₃	10
5.11	H	H	4-OH	2,12
5.12	H	H	3-OH, 4-CH ₃	2,28
5.13	H	CH ₃	3-OH	3,8
5.14	CH ₃	H	3-OH	0,63
5.15	H	H	3-OH	0,32

Для з'ясування механізму зв'язування похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону із АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази FGFR1, досліджено комплекси описаних сполук, отримані за допомогою молекулярного докінгу. Спосіб зв'язування сполуки **5.15** із протеїнкіназою FGFR1 представлено на *рис. 8*. Водневі зв'язки показано зеленими пунктирними лініями. Атоми Нітрогену показано синім кольором, Оксигену – червоним.

Згідно з результатами молекулярного моделювання, 1,2-дигідро-1*H*-пірол-3-он залучений до ван-дер-ваальсових та гідрофобних взаємодій із амінокислотними залишками Leu630, Val561 та Ala512 у аденін-зв'язувальній ділянці I АТФ-акцепторного сайту. Крім того, виявлено, що карбонільна група цього гетероциклу формує водневий зв'язок із аміногрупою Ala564, що знаходиться у шарнірній ділянці ензиму.

Бензімідазольний гетероцикл утворює ван-дер-ваальсові контакти із амінокислотними залишками Tyr563, Leu484 і Gly567 та формує водневий зв'язок із карбонільною групою Ala564.

Мета-заміщений арильний замісник сполуки **5.15** розміщується у гідрофобній ділянці I, що формується бічними ланцюгами амінокислотних залишків Lys514, Ile545, Val561 і Ala640. Бензенове кільце вступає в гідрофобні взаємодії з цими амінокислотними залишками, а гідроксильна група арильного замісника утворює водневий зв'язок із карбоксильною групою бічного ланцюга Asp641. Це відіграє значну роль для специфічності зв'язування з протеїнкіназою FGFR1 (*рис. 8*).

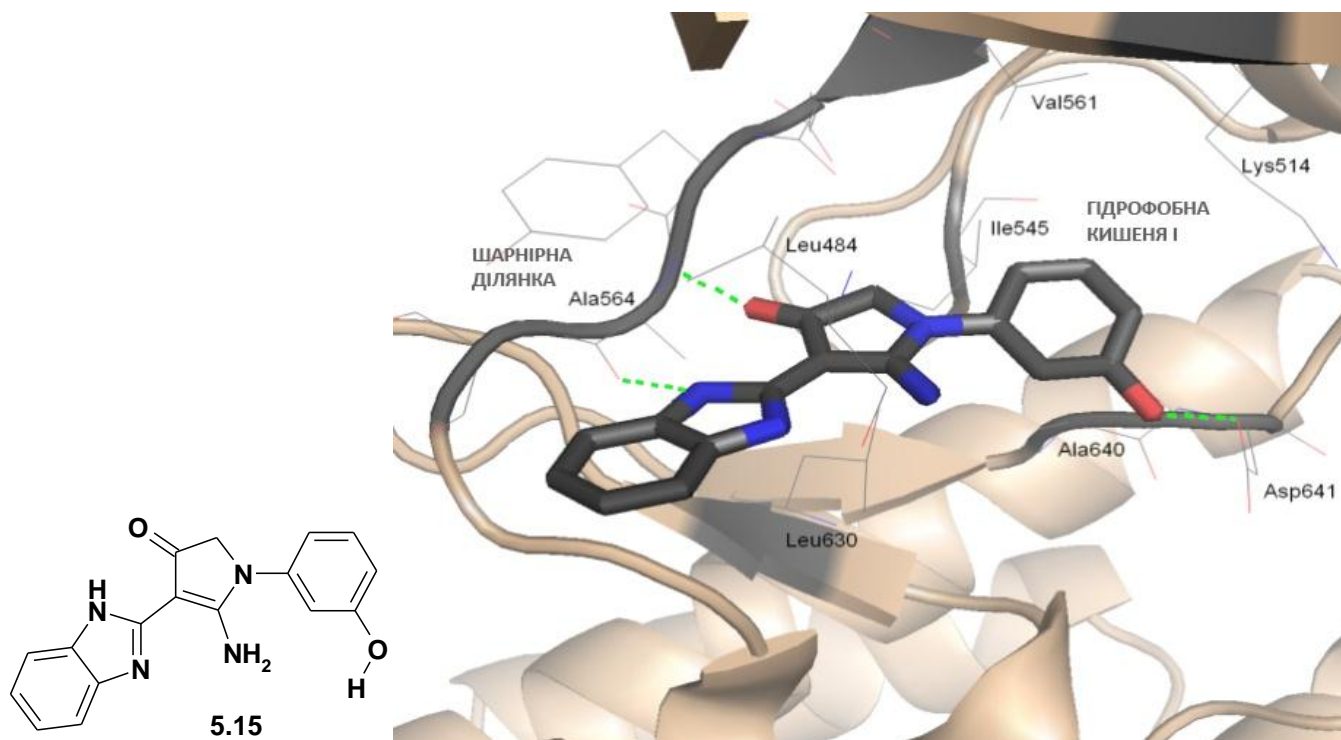


Рис. 8. Хімічна структура сполуки **5.15** та спосіб зв'язування її з активним центром протеїнкінази FGFR1. Водневі зв'язки показано зеленими пунктирними лініями

Дві найактивніші сполуки (**5.14**, **5.15**) були відібрані для аналізу їхньої активності на панелі з 7 протеїнкіназ (*табл. 5*). Результати дослідження показали, що ці сполуки є селективними інгібіторами по відношенню до протеїнкінази FGFR1.

Таблиця 5

Залишкова активність протеїнкіназ (%) за присутності сполук **5.14**, **5.15** при концентрації 10 мкМ

Сполука/Кіназа	FGFR1	Tie-2	c-MET	Aurora A	JNK3	CK2	ASK1
5.14	5	92,7	92,5	75,8	100,8	77,3	91,6
5.15	2,1	84,7	128,3	85,8	118	81,4	95,7

П'ять сполук (**5.6**, **5.7**, **5.8**, **5.14**, **5.15**) із субмікромолярними та мікромолярним інгібувальними активностями щодо протеїнкінази FGFR1 тестували на антипроліферативну активність на клітинній лінії гострої мієлоїдної лейкемії KG1. Ця пухлинна клітинна лінія характеризується конститутивною активністю протеїнкінази FGFR1 і часто використовується як модель для дослідження антипроліферативної активності інгібіторів FGFR1. Результати антипроліферативної активності наведено в *табл. 6*.

Таблиця 6

Антипроліферативна активність сполук **5.6**, **5.7**, **5.8**, **5.14**, **5.15** на клітинних лініях KG1 і HEK293

Сполука	Проліферація клітин KG1, IC ₅₀ , мкМ ^a	Проліферація клітин HEK293, IC ₅₀ , мкМ ^a
5.6	>50	>50
5.7	9	>50
5.8	2	>50
5.14	5,6	>50
5.15	9,3	>50

^a – Представлено середні значення трьох незалежних експериментів.

Сполука **5.6** виявилася неактивною. Антипроліферативна активність сполуки **5.14** вища, ніж сполуки **5.15** (IC₅₀ = 5,6 мкМ та 9,3 мкМ відповідно) незважаючи на нижчу інгібувальну активність по відношенню до ензиму. Сполуки **5.7** та **5.8**, що інгібували FGFR1 зі значеннями IC₅₀ = 1,12 мкМ та 1,85 мкМ відповідно, проявили антипроліферативну активність на KG1 зі значеннями IC₅₀ = 9 мкМ та 2 мкМ відповідно.

Всі досліджені сполуки не є цитотоксичними щодо умовно-нормальної клітинної лінії HEK293 (*табл. 6*).

Аналізуючи залежність структура-активність необхідно відмітити, що інгібітори клітинного росту **5.8** та **5.14**, які показали найкращу протипухлинну активність, мають 6-метильний замісник у бензімідазольному фрагменті. Також показано, що сполука **5.8** має *мета*-хлоро замісник в арильному фрагменті, тоді як сполука **5.14** – гідроксильну групу. (рис.9).

Вірогідно, наявність *мета*-хлоро замісника в арильному фрагменті та метильного замісника в положенні С-6 бензімідазольного циклу сприяє підвищенню гідрофобності сполуки, що покращує її проникнення через клітинну мембрану.

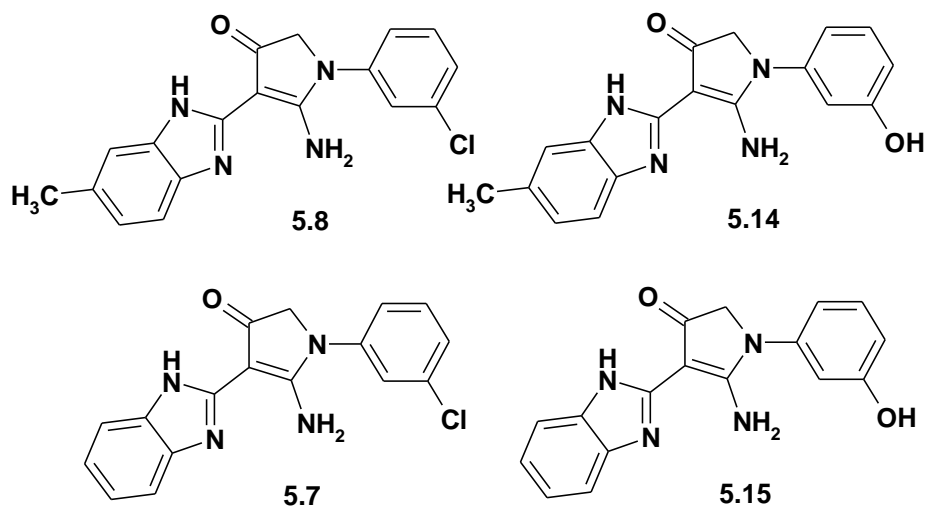


Рис. 9. Хімічні структури найактивніших сполук з протипухлинною активністю

Таким чином, серед інгібіторів протеїнкінази FGFR1 знайдено 4 сполуки: **5.7** (5-аміно-1-(3-хлорофеніл)-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-он), **5.8** (5-аміно-1-(3-хлорофеніл)-4-(6-метил-1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-он), **5.14** (5-аміно-1-(3-гідроксифеніл)-4-(6-метил-1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-он), **5.15** (5-аміно-1-(3-гідроксифеніл)-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-он), які мають антипроліферативну активність на клітинній лінії гострої мієлоїдної лейкемії KG1 зі значенням IC₅₀ 9; 2; 5,6 та 9,3 мкМ відповідно. Вони не є цитотоксичними щодо умовно-нормальних клітин HEK293.

Сполуки **5.7**, **5.8**, **5.14** та **5.15** є перспективними для подальшої їх оптимізації з метою розробки нових протипухлинних препаратів.

ВИСНОВКИ

Використовуючи методи органічного синтезу, біохімічного тестування та комп'ютерного моделювання, розроблено низку нових сполук з протипухлинною активністю на основі похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону.

1. Синтезовано 96 нових похідних *N*-бензил- і *N*-арил-4-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіонів та вивчено залежність їхньої антипроліферативної активності від хімічної будови. Три сполуки виявили протипухлинну дію на клітинних лініях раку нирок, легенів, яєчників, грудей, лейкемії з GI₅₀ в межах

- 0,01–2 мкМ. Показано, що *n*-фторобензильний, бензильний, 2,3-дихлорофенільний та 3-хлоро-4-метилфенільний замісники у положенні *N1*, *m*-гідроксифенільний замісник у положенні *C-4* та фенілсульфанільний у положенні *C-3* малеїмідного циклу суттєво збільшують протипухлинну активність сполук.
2. Розроблено одностадійний («одноколбовий») препаративний метод синтезу 3-сульфанільних похідних *N*-бензил-4-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону. Показано, що запропонований метод збільшує на 10-25% загальний вихід продукту та зменшує час реакції, порівняно зі стандартним двостадійним синтезом.
 3. Встановлено, що під дією надлишку тіофенолу на 3-арилсульфанільні похідні 4-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону утворюються 4-незаміщені похідні 3-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону. Це є новим методом синтезу сполук цього класу.
 4. На основі результатів молекулярного докінгу синтезовано 29 нових похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону. Серед них знайдено чотири інгібітори протеїнкінази FGFR1 зі значеннями IC_{50} в межах 0,32–1,85 мкМ. Показано, що наявність *N1*-незаміщеного залишку бензімідазолу в положенні *C-4* та *m*-гідрокси- або *m*-хлорофенільного замісника у положенні *N1* фрагменту 1,2-дигідропірол-3-ону суттєво збільшує інгібувальну активність сполук щодо протеїнкінази FGFR1.
 5. Встановлено, що вказані інгібітори протеїнкінази FGFR1 виявляють протипухлинну активність на клітинній лінії гострої мієлоїдної лейкемії людини KG1 з IC_{50} в межах 2–9,3 мкМ і не є токсичними щодо умовно нормальної клітинної лінії НЕК293.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Тарнавський С.С. Взаємодія 3,4-дихлормалеїмідів з N- та S-нуклеофілами / Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Ярмолюк С.М., Головач С.М. // Укр. хім. журн. – 2002. – 68. № 9. – С. 47-51.
2. Тарнавський С.С. Пошук протипухлинної активності серед похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону / Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Головач С.М., Ярмолюк С.М. // Біополімери і клітина. – 2003. – 19. №3. – С. 287-291.
3. Тарнавський С.С. Взаємозв'язок протипухлинної активності зі структурою 3-хлоро-4-(3-гідроксианіліно)-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону / Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Головач С.М., Ярмолюк С.М. // Біополімери і клітина. – 2003. – 19. № 6. – С. 548-552.
4. Тарнавський С.С. Цитотоксична активність у ряду похідних 1-бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону / Тарнавський С.С., Остринська О.В.,

- Волинець Г.П., Коцаренко К.В., Старосила Ю.А., Протопопов М.В., Бджола В. Г., Ярмолюк С.М. // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2015. – 13. №2. – С. 7-16.
5. Тарнавський С.С. Малеймідні похідні як потенційні протиракові препарати (Огляд літератури) / Тарнавський С.С., Волинець Г.П., Ярмолюк С.М. // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2016. – 14. – №1. – С. 9-23.
 6. Gryschenko A. A.. Design, synthesis and biological evaluation of 5-amino-4-(1H-benzoimidazol-2-yl)-phenyl-1,2-dihydro-pyrrol-3-ones as inhibitors of protein kinase FGFR1 / Gryschenko A. A., Tarnavskiy S.S., Levchenko K.V., Bdzholo V.G., Volynets G.P., Golub A.G., Ruban T.P., Vygranenko K.V., Lukash L.L., Yarmoluk S.M. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2016. – 24. – P. 2053–2059.
 7. Тарнавський С.С. Дослідження антипроліферативної активності інгібіторів протеїнкінази FGFR1 класу 5-аміно-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-феніл-1,2-дигідропірол-3-ону / Тарнавський С.С., Волинець Г.П., Горбатюк О.Б., Бджола В.Г., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л., Ярмолюк С.М. // *Ukrainica Bioorganica Acta*. – 2016. – 14. №1. – С. 48–51.
 8. Tarnavskiy S.S. Hit identification of FGFR1 inhibitors using receptor-based virtual screening / Tarnavskiy S.S., Protopopov M.V., Borovykov O.V., Prykhod'ko A.O., Bdzholo V.G., Yarmoluk S.M., Matyushok V.I., Balanda A.O. // *Biopolymers and Cell*. – 2019. – 35. № 2. – P. 143–151.
 9. Пат. на винахід 61626 А, Україна, МПК C07D207/444, 61K31/40 (2003.11) Структури активних сполук, що мають протипухлинну активність в ряду похідних 1-Бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону / Тарнавський С.С. (UA), Головач С.М. (UA), Дубініна Г.Г. (UA), Ярмолюк С.М. (UA); заявник та власник Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії наук України. – № 2003032383; заявл. 19.03.2003; опубл. 17.11.2003, бюл. № 11, 2003 р.
 10. Тарнавський С.С. Синтез похідних 6-сульфаніл-2,3,4,5-тетрагідро-1,2,4-триазин-3,5-діонів / Тарнавський С.С., Дубініна Г.Г., Ярмолюк С.М. // *Матеріали міжнародної конференції: Хімія азотовмісних гетероциклів, 2 - 5 жовтня*. – Харків. – 2000. – С. 52.
 11. Golovach S.M.. Antitumor activity of 2,5-dihydropyrrole-2,5-dione derivatives against human cancer cell lines / Golovach S.M., Tarnavskiy S.S., Dubinina G.G., Yarmoluk S.M. // *International conference: Chemistry of nitrogen containing heterocycles (CNH-2003), 30 September – 3 October*. – Kharkiv. – 2003. – P. 237.
 12. Тарнавський С.С. Синтез похідних 1-Бензил-3-хлоро-4-аніліно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону як потенційних протиракових речовин / Тарнавський С.С., Головач С.М., Ярмолюк С.М. // *XX Українська конференція з органічної хімії, 20 - 24 вересня*. – Одеса. – 2004. – С. 448.

13. Головач С.М. Протиракова активність похідних 2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону / Головач С.М., Тарнавський С.С., Костенко О.М., Ярмолюк С.М. // XX Українська конференція з органічної хімії, 20-24 вересня. – Одеса. – 2004. – С. 487.
14. Tarnavskiy S. S. Synthesis of the series of 4-phenylamino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pirolidione (maleimide) derivatives and investigation of their inhibitory activity to wardprote in kinase CK2 / Tarnavskiy S.S., Ostrynska O.V., Bdzholo V.G., Yarmoluk S.M. // XXXII наукова конференція з біоорганічної хімії та нафтохімії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України: Матеріали конференції, 31 березня – 1 квітня 2016. Катализ и нефтехимия. – Київ. – 2016. – 25. – С. 101.
15. Тарнавський С.С. Синтез ряду похідних 1-Бензил-3-хлоро-4-феніламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону та дослідження протипухлинної дії / Тарнавський С.С., Протопопов М.В., Остринська О.В., Бджола В. Г., Ярмолюк С.М. // XIV Українська конференція молодих вчених та студентів з актуальних питань сучасної хімії, 24 - 26 жовтня. – Дніпропетровськ. – 2016. – С. 49.

АНОТАЦІЯ

Тарнавський С.С. Синтез та вивчення протипухлинної активності похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук (доктора філософії) 02.00.10 «Біоорганічна хімія». – Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ім. В.П. Кухаря, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена пошуку нових похідних 2,5-дигідропірол-2,5-діону та 1,2-дигідропірол-3-ону з протипухлинними властивостями, з використанням методів органічного синтезу, комп'ютерного моделювання, тестування на інгібувальну активність по відношенню до протейніназ та тестування на клітинних лініях раку людини.

Запропоновано одностадійний («одноколбовий») препаративний метод синтезу 3-сульфанільних похідних *N*-бензил-4-феніламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону. Показано, що цей метод збільшує на 10-25% загальний вихід продукту та значно зменшує загальний час процесу, порівняно зі стандартним двостадійним синтезом.

Розроблено новий метод синтезу класу 3-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіонів, які утворюються внаслідок дії двократного надлишку тіофенолу на 3-арилсульфанільні похідні 4-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону.

Синтезовано та підтверджено структури 96 нових похідних 4-ариламіно-2,5-дигідро-1*H*-2,5-піролдіону методами фізико-хімічного аналізу. Три сполуки пригнічували ріст клітин на клітинних лініях раку нирок, легенів, яєчників, грудей,

лейкемії з GI_{50} в межах 0,01–2 мкМ. Вони є перспективними для подальшої оптимізації їх структури з метою розробки нових протипухлинних препаратів.

Знайдено та охарактеризовано новий клас інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних 5-аміно-1-арил-4-(1*H*-бензімідазол-2-іл)-1,2-дигідропірол-3-ону. Синтезовано та підтверджено структури 29 сполук цього класу методами фізико-хімічного аналізу. П'ять сполук інгібували протеїнкіназу FGFR1 зі значення IC_{50} в межах 0,32–1,85 мкМ. Встановлено, що чотири інгібітори цього класу мають протипухлинну активність стосовно клітинної лінії гострої мієлоїдної лейкемії людини KG1 з IC_{50} в межах 2–9,3 мкМ та не є токсичними щодо умовно нормальної клітинної лінії HEK293. Ці сполуки пропонуються для використання у наукових дослідженнях з метою вивчення структури й особливостей функціонування FGFR1.

Ключові слова: 2,5-дигідропірол-2,5-діон, малеїмід, 1,2-дигідропірол-3-он, протипухлинна активність, протеїнкіназа FGFR1, інгібітор, QSAR, хімічна оптимізація.

ANNOTATION

Tarnavskiy S.S. Synthesis and study of antitumor activity of the derivatives of 2,5-dihydropyrrol-2,5-dione and 1,2-dihydropyrrol-3-one. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of a Candidate of Chemical Sciences (Doctor of Philosophy) in specialty 02.00.10 "Bioorganic chemistry". – V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The thesis is devoted to the search of new derivatives of 2,5-dihydropyrrol-2,5-dione and 1,2-dihydropyrrol-3-one with antitumor properties, using the methods of organic synthesis, computer modeling and biochemical testing including ^{32}P radioactive kinase assay and *in vitro* analysis of antitumor activity on human cancer cell lines.

A one-step preparative method for the synthesis of 3-sulfanyl derivatives of *N*-benzyl-4-arylamino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pyrroldione was proposed. It was shown that this method increases the total product yield by 10-25% and significantly reduces the overall process time, compared to the standard two-step synthesis.

A new method of 3-arylamino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pyrroldiones synthesis by reacting the 2-fold excess of thiophenol with 3-arylsulfanyl derivatives of 4-arylamino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pyrroldiones was developed.

96 new 4-arylamino-2,5-dihydro-1*H*-2,5-pyrrolidone derivatives were synthesized and their structures were confirmed by physicochemical analysis methods. The antitumor activity of these compounds was studied at the National Cancer Institute (USA). Three compounds inhibited cell growth in cell lines of kidney, lungs, ovaries, breasts cancer and leukemia with GI_{50} in the range of 0.01–2 μ M. It was shown that the presence of *p*-fluoro substituent in the *N*1-benzyl, 2,3-dichloro- and 3-chloro-4-methyl substituents in the *N*1-

aryl residue of the maleimide cycle, *m*-hydroxy substituent in the aniline residue significantly increases the antitumor activity. These derivatives are promising compounds for further structure optimization to develop new anticancer agents.

A new class of FGFR1 protein kinase inhibitors, namely 5-amino-1-aryl-4-(1*H*-benzoimidazol-2-yl)-1,2-dihydropyrrol-3-ones, was identified and characterized. 29 compounds of this class were synthesized and characterized by physicochemical analytical methods. Four compounds inhibited FGFR1 protein kinase with IC₅₀ values in the range 0.32–1.85 μM. It was shown that the presence of *N*1-unsubstituted fragment of 1*H*-benzoimidazole and *m*-hydroxyphenyl or *m*-chlorophenyl substituent at position 1 of 1,2-dihydropyrrol-3-one significantly increases the inhibitory activity of compounds toward FGFR1 protein kinase.

It was found that the above four 5-amino-1-aryl-4-(1*H*-benzoimidazol-2-yl)-1,2-dihydropyrrol-3-one derivatives have antitumor activity against acute myeloid leukemia cell line KG1 with IC₅₀ values in the range of 2–9.3 μM and they are not toxic to the conditionally normal HEK293 cell line. It was shown that the introduction of methyl substituent at the position C-6 of benzimidazole increases their activity by 1.5–4 times by increasing the molecule's hydrophobicity and its better permeability through the cell membrane. These compounds can be used in biochemical experiments for the study of FGFR1 role in cellular processes.

Keywords: 2,5-dihydropyrrol-2,5-dione, maleimide, 1,2-dihydropyrrol-3-one, antitumor activity, protein kinase FGFR1, inhibitors, combinatorial synthesis, molecular docking, chemical optimization, QSAR.