

4-Amino-5,6,7-trifluor-ftálimidek előállítása, in vitro és in vivo biológiai vizsgálata

MADÁCSI Ramóna,^{a,b} GYURIS Márió,^{c,d} KANIZSAI Iván,^a SIPOS Péter,^e WÖLFLING János^b és

PUSKÁS László G.^{a,c,*}

^aAVIDIN Kft., Alsókikötő sor 11., 6726, Szeged, Magyarország

^bSzegedi Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék, Dóm tér 8., 6720, Szeged, Magyarország

^cAVICOR Kft., Alsókikötő sor 11., 6726, Szeged, Magyarország

^dSzegedi Tudományegyetem, Orvos Vegytani Intézet, Dóm tér 8., 6720, Szeged, Magyarország

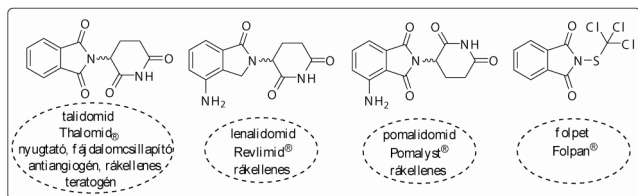
^eSzegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Eötvös utca 6., 6720, Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

Az *N*-szubsztituált 1,3-izoidolon származékok (ftálimidek) széles farmakológiai hatásspektrummal rendelkező vegyületek, emellett az *N*-tioklóralkil származék gombaölő növényvédőszer (Folpan®) (1. ábra).¹⁻⁴

A család legismertebb farmakológiai képviselője, a Grünenthal gyógyszergyárban előállított (1957) talidomid, amely recept nélkül kapható nyugtató/fájdalomcsillapító gyógyszerként (Contergan®) került forgalomba. Évekkel később teratogén hatása (súlyos fejlődési és idegrendszeri károsodás, végtaghiány, végtagfejlődési rendellenességek) miatt kivonták a forgalomból.⁵⁻¹¹ Későbbi vizsgálatok kimutatták az egyik enantiomer (*S*-talidomid) felelősségét a rendellenesség kialakulásáért, azonban az emberi szervezetben lejátszódó racemizáció miatt az eredeti indikációban nem jelenthetett megoldást az eutomer (*R*-talidomid) előállítása és alkalmazása.¹²⁻¹³

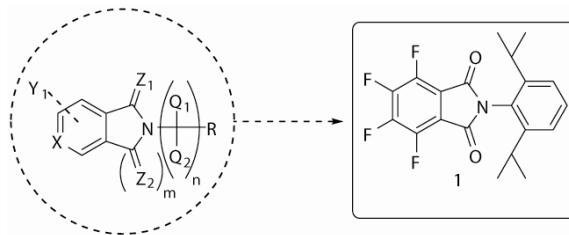
A közelmúltban azonban a racém talidomid felhasználásában új dimenzió nyílt; számos kórképben – Crohn-betegség, AIDS, valamint Kaposi-sarkóma és örökletes, vérzékenységgel járó kisértágulat (hereditary hemorrhagic telangiectasia, HHT) – vizsgálták és igazolták biológiai hatását.¹⁴⁻¹⁷ Nem mellékesen, a feltételezett angiogenezis gátló hatás miatt a talidomidot és az időközben törzskönyvezett származékait, a lenalidomidot (Revlimid®) és pomalidomidot (Pomalyst®) sikeresen alkalmazták tumoros megbetegedések (pl.: myeloma multiplex, leukémia, prosztatarák) kezelésére is (1. ábra).¹⁸⁻²⁷



1. Ábra. Kereskedelmi forgalomban kapható izoidolonok.

Az aromás gyűrűben a 4, 5, 6 és a 7-es helyzetben halogénnel tetraszubsztituált variánsok jelentős tumor-nekrózis faktor (α -TNF) gátló hatást mutattak. A vizsgált vegyületeket nukleofil acil szubsztitúciós reakcióval (S_N -acil), a

polifluorozott vagy poliklórozott ftálsavanhidrid és a megfelelő anilin reakciójával állították elő. A 2,6-diizopropil-anilin felhasználásával jutottak az adott assay-ben legaktívabb 2-(2,6-diizopropilfenil)-4,5,6,7-tetrafluorizoidolin-1,3-dionhoz (**1**) (2. ábra).²⁸⁻³⁰



2. Ábra. Szabadalmi védetség alatt lévő ftálimid származékok általános képlete, kiemelt példa (**1**).

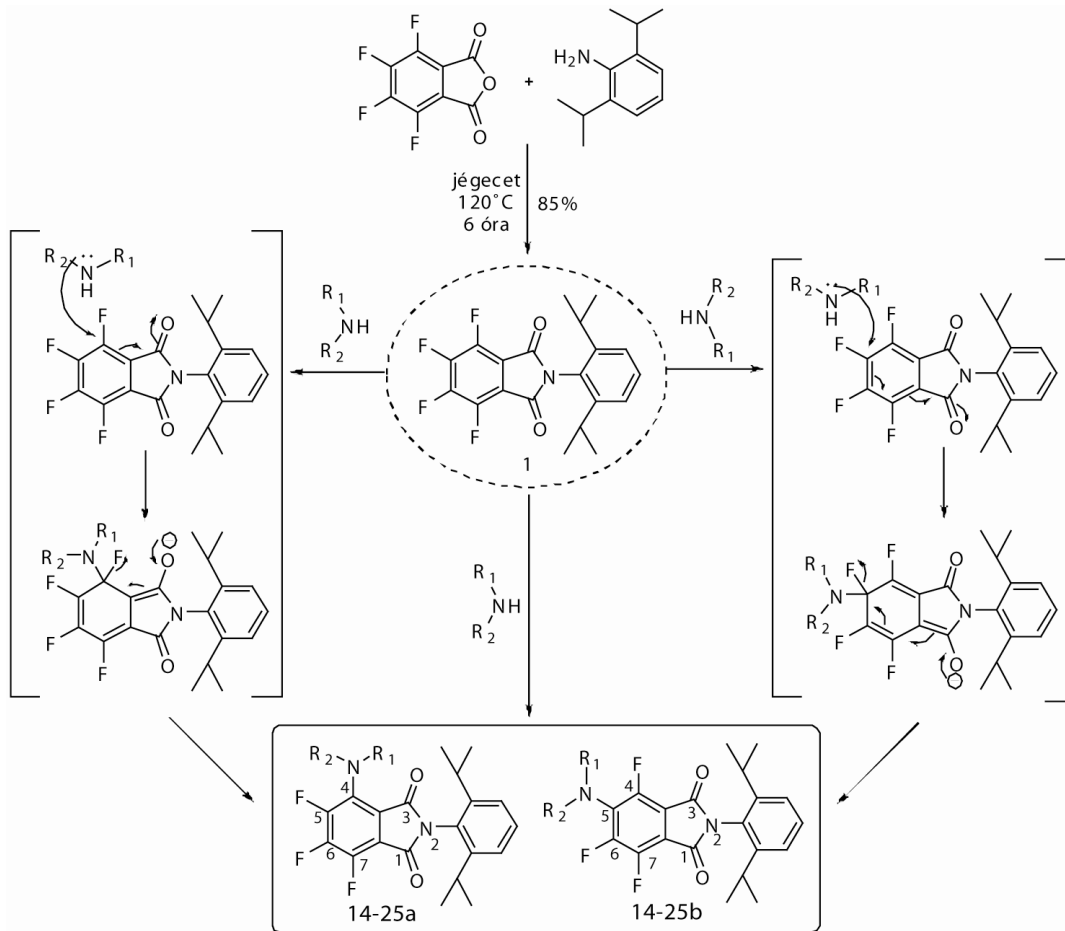
Az **1** tetrafluorozott ftálimid primer vagy szekunder aminokkal történő továbbalakításával, egy gyorsan felépíthető citotoxikus aktivitással rendelkező vegyületeknyvtárát kívántunk létrehozni, és a biológiai eredmények függvényében olyan molekulát kiválasztani, amely a lenalidomid és az **1** kiindulási vegyület farmakológiai hatását ötvözi.

2. Eredmények és értékelésük

Az aril-halogenidek aromás nukleofil szubsztitúciós reakcióban (S_N Ar) általában nem reaktívak, erre csak meghatározott szerkezeti feltételek adnak lehetőséget. Az *orto* vagy *para* helyzetben elektronszívó csoporttal szubsztituált aromás rendszerben egy elektronhiányos átmeneti állapot alakulhat ki, amely nukleofil aminokkal támadható. A folyamat lejátszódhat S_N1 , arin vagy S_N2 mechanizmussal Meisenheimer-komplexen keresztül (3. ábra).³¹⁻³³

Kiindulási vegyületünket a 2-(2,6-diizopropilfenil)-4,5,6,7-tetrafluorizoidolin-1,3-diont (**1**) a 3,4,5,6-tetrafluorftálsavanhidrid és 2,6-diizopropil-anilin S_N -acil reakciójával állítottuk elő (reakciókörülmények: jégecet, 120°C; 6 óra, termelés: 85%).

* Tel.: 06-30/676-5384 ; fax: 06-62/202-108; e-mail: laszlo@avidinbiotech.com

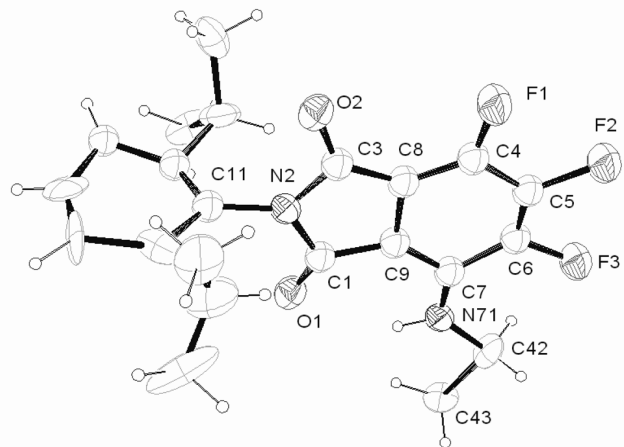


3. Ábra. 4- és 5-amino szubsztituált trifluor-ftalimidek előállítás; S_N2 mechanizmussal Meisenheimer komplexen keresztül.

Az **1** vegyület primer vagy szekunder aminokkal (**2-13**) aromás nukleofil szubsztitúciós reakcióban (S_NAr) a 4- és 5-amino-5,6,7- és 4,6,7-trifluor-ftalimid regioizomerekhez (**14a,b-25a,b**) vezet (1. táblázat). Az addíciós-eliminációs mechanizmus lejátszódásának feltételei adottak: nukleofil támadás (aminok); fluorid (F^-) mint jól távozó csoport; illetve a ftalimid funkció karbonil csoportja a távozó halogenidhez képest *orto* és/vagy *para* helyzetben.

Első kísérleteinket feleslegben (2 ekvivalens) használt etilaminnal (**2**), szobahőmérsékleten, aprotikus oldószerben (diklórmetán) végeztük, és a várt **14a** és **14b** regioizomerek képződését tapasztaltuk, 39:61 arányban, jó termeléssel (87%). Az oszlopkromatográfiás tisztítást és átkristályosítást követően a **14a** és **14b** regioizomerek pontos szerkezetét röntgenkristallográfiával határoztuk meg (4. és 5. ábra).^{30,34}

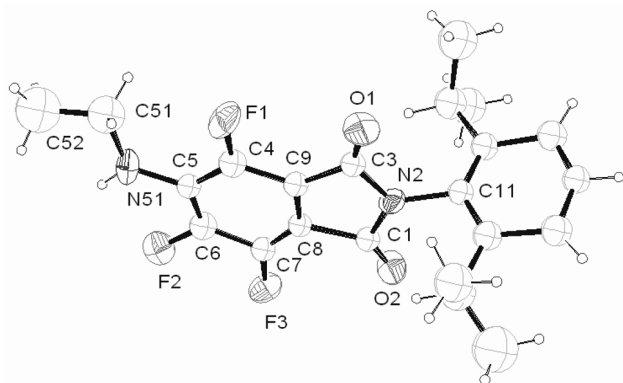
A további S_NAr reakciókat a **14a** és **14b** regioizomerek *in vitro* MTS_N (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfófenil)-2*H*-tetrazolium) tesztek eredményének függvényében terveztük meg.^{30,34} Kezdetben alifás aminokban gondolkodtunk, és etilamin vagy etanolamin egység beépítését céloztuk meg, végül 30 primer és 34 szekunder amin alkalmazva összesen 128 talidomid analógot állítottunk elő. A biológiailag aktívabb **a** regioizomer és a kevésbé aktív **b** származék szétválasztását és tisztítását Combiflash R_f 200 kromatográffal végeztük. A beállított módszerrel a későbbiekben a grammos tétel elválasztását is elvégeztük.



4. Ábra. A **14a** vegyület molekulászerkezete röntgen kristallográfiás módszerrel.

A cikk terjedelmi korlátai miatt, csak az *in vitro* MTS eredményekben szignifikáns citotoxikus aktivitást mutató **14-25(a)** vegyületeket emeljük ki. A szintézisek során 2 ekvivalens primer és szekunder amin reagáltattunk az **1** kiindulási vegyülettel aprotikus oldószerben, szobahőmérsékleten 8 órán át kevertetve. A regio szelektív átalakulással döntően a biológiai értelemben kevésbé aktív **b** regioizomer képződését tapasztaltuk (1. táblázat). A szelektivitást érdemben befolyásolni képes körülményeket (hőmérséklet és/vagy ekvivalencia változtatása, additívek

használata) nem változtattuk, a célnak megfelelően a tiszta **a** regioizomerek izolálását tartottuk a szemünk előtt.



5. Ábra. A **14b** vegyület molekulaszervezete röntgen kristallográfiás módszerrel.

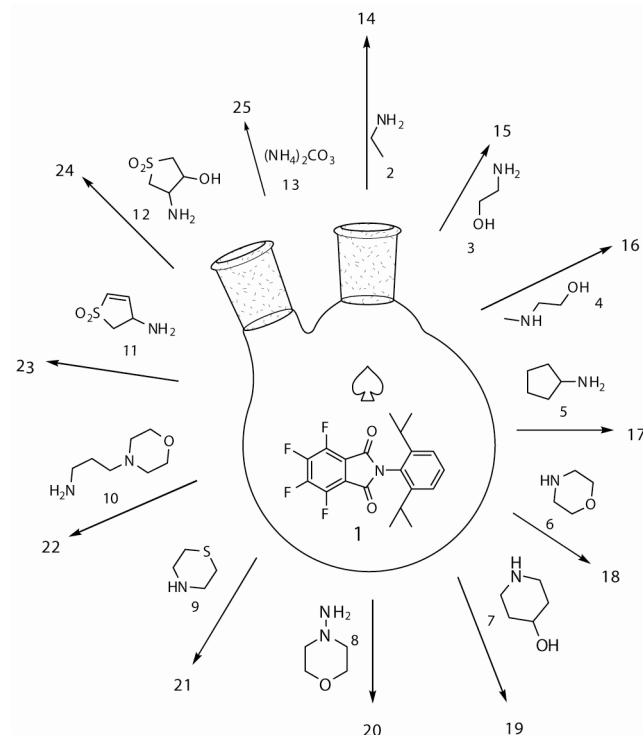
Két példától, a **20** és **22** vegyületektől eltekintve az **a** és **b** regioizomerek megközelítőleg 1:2 arányban képződnek (HPLC) míg a **15**, **17**, **21** és **25** vegyületeknél 1:4 és 1:9 közötti intervallumban változó értékeket tapasztaltunk. Meglepetésünkre, a **20** és **22** származékoknál megközelítőleg 1:1 arányt mértünk. Külön kiemelnénk a **11** és **12** heterociklusokat, amelyek rossz oldhatóságuk miatt aprotikus, poláris oldószert (pl.: DMF vagy DMSO) igényeltek. Az **1** kiindulási vegyület (médiá: H₂O:DMF 1:1) a 3-aminoszulfolén hidroklorid sóval (**11**) reagáltatva a **23a** és **23b** vegyületekhez jutottunk 69 %-os termeléssel; (regioizomerek aránya: **a**:**b**=28:72). Dimetil-szulfoxidban, *cis*- és *transz*-3-amino-4-hidroxiszulfolánból (**12**) kiindulva hasonló arányban (1:2) nyertük a (*cis* vagy *transz*) **24a** és **24b** izomereket megfelelő hozammal (79 %) (1. Táblázat).

Egy változatosabb, citotoxikus potenciállal rendelkező vegyületkönyvtár felépítéséhez a **25a** és **25b** ftálimideket állítottuk elő. A primer amino csoport acilezésével vagy karbamid addukt képzésével hatásosabb citotoxikus vegyületeket kívántunk előállítani. Ammóniás etanolal (20 m/V%) a 2-(2,6-diizopropilfenil)-4,5,6,7-tetrafluor-izoidolin-1,3-dion (**1**) a **26** savamidhoz vezetett kiváló termeléssel (90%). Gyengébb nukleofil karakterű aminforrást használva ((NH₄)₂CO₃) nyertük a kívánt 1-(2,6-diizopropilfenilamino)-2-oxoetil)-3,4,5,6-tetrafluorbenzamid (**25a**) és 5-amino-2-(2,6-diizopropilfenil)-4,6,7-trifluorizoidolin-1,3-dion (**25b**) termékeket (60%; **a**:**b**=10:90). A **25a** ftálimidet a későbbiekben klóracetil-izocianáttal reagáltatva kaptuk „lead” vegyületünket, a **27** karbamid származékot jó hozammal (74%). Egyéb izocianátokkal megkísérelve a reakciót, nem tapasztaltunk konverziót (6. ábra).

Az előállított 129 analog tumorellenes hatását különböző sejtkultúrákon vizsgáltuk: HT168 (humán melanóma), HepG2 és Hep3B (humán hepatocelluláris karcinóma), MCF7 (humán emlő adenokarcinóma), PC3 (humán prosztatata karcinóma), A549 (humán tüdőkarcinóma), HT29 (humán vastagbél karcinóma), K562 és HL60 (humán leukémia) és GBM1 (humán glióma). CellTiter® 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay-t végeztünk, mely MTS-t és PMS-t tartalmazott. Az MTS-t az élő sejt formazánná alakítja, melynek abszorbanciája

a tápfolyadékban 490 nm-en detektálható ELISA lemez leolvasóval. Így indirekt módon az élő sejtek mennyiségére lehet következtetni.^{30,34}

1. Táblázat. 4- és 5-amino-2-(2,6-diizopropilfenil)-4,6,7-trifluor-izoidolin-1,3-dionok előállítás (14-25).



Reakció ^a	Amin	Termelés (%)	Izomerarány (%) ^b	
			a	b
14	etil-amin	86	39	61
15	etanol-amin	79	18	82
16	<i>N</i> -metil-etanol-amin	90	33	67
17	ciklopentil-amin	87	17	83
18	morfolin	73	30	70
19	4-piperidinol	71	34	66
20	<i>N</i> -aminomorfolin	59	44	56
21	tiomorfolin	77	8	92
22	<i>N</i> -aminopropil-morfolin	51	46	54
23	3-aminoszulfolén	69	28	72
24	3-amino-4-hidroxi-szulfolán	79	36	64
25	(NH ₄) ₂ CO ₃	60	10	90

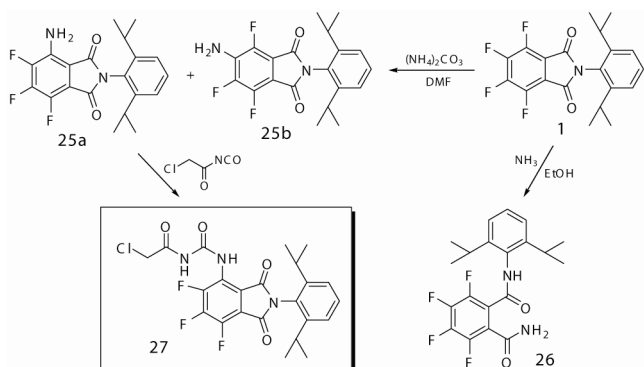
^a: a és b regioizomerek; ^b: HPLC alkalmazásával

Az *in vitro* mérések alapján négy vegyületet emelhetünk ki: a **23a**, a *cis*-**24a**, *transz*-**24a** és a **27** származékokat. Minden általunk vizsgált sejtvonalon a **27** bizonyult a leg-aktívabbnak. Melanoma és leukémia esetén mind a négy vegyület EC₅₀ értéke (tumor sejtek maximális növe-

2. Táblázat. EC₅₀ értékek meghatározása.

	Sejtvonal	EC ₅₀ (23a) (μM)	EC ₅₀ (<i>cisz</i> - 24a) (μM)	EC ₅₀ (<i>transz</i> - 24a) (μM)	EC ₅₀ (27) (μM)
emlő adenokarcinóma	MCF7	1,83	2,03	n.a.	1,08
hepatocelluláris karcinóma	HepG2	1,21	2,03	2,08	1,05
hepatocelluláris karcinóma	Hep3B	0,76	1,39	1,49	0,54
melanóma	HT168	0,25	0,52	0,52	0,23
tüdő karcinóma	A549	1,05	1,50	1,55	0,45
leukémia	K562	0,12	0,16	0,19	0,11
leukémia	HL60	0,15	0,21	0,22	0,12
vastagbél karcinóma	HT29	1,77	3,85	n.a.	1,58
prostatata karcinóma	PC3	1,45	2,04	n.a.	0,53
glióma	GBM1	1,06	1,09	1,11	0,45

kedésének 50 %-os gátlása) nanomólos koncentráció tartományban volt (2. táblázat).

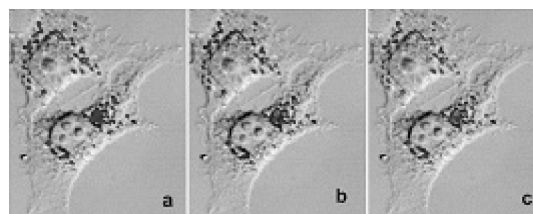


6. Ábra. Primer amino funkció kiépítése és továbbalakítása.

Konfokális fluoreszcens lézer szkennig mikroszkóppal, kiváló fluoreszcens tulajdonsága által a **14b** vegyületet választva, úgynevezett „dupla-festési” eljárással vizsgáltuk az anyagok intracelluláris elhelyezkedését. HT168 sejtvonalon a lipid cseppeket (LD) szelektíven színező oil red O festéket használtunk (1. kép). Azon lipid cseppek, melyekben a kéken fluoreszkáló **14b** jelen van, lila színt mutatnak. Endoplazmatikus retikulumra (ER) specifikus ER-Tracker™ Green alkalmazásával a két szín szinergizmusából türkiz szín jön létre (2. kép). A tumor sejtekben megfigyelhető a lipid cseppek felhalmozódása szemben a normál szövettel, így a lipid cseppekben jelen lévő **14b** mennyiségi meghatározása alkalmas lehet a tumor sejtek szelektív azonosítására is.²³⁻²⁴

A **23a** és **27** vegyületek rákellenes hatását élő állatban máj karcinóma modellen vizsgáltuk, melyben dietil-nitrózamin (DEN) bevitel hatására a *Matn2*^{-/-} transzgenikus egerek májában tumorképződést indukáltunk.^{30,34} A nanoméretű hatóanyag-hordozó rendszer biokompatibilis és biodegradálható anyagokból formulált SUV típusú

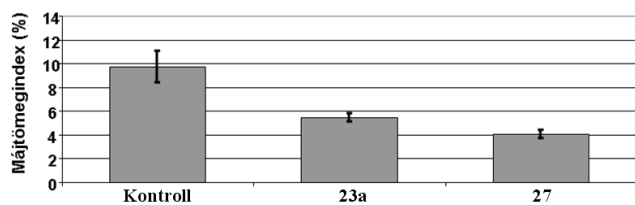
liposzóma volt, mivel a nem formulált hatóanyag az előkísérletek során kedvezőtlen felszívódási és toxikológiai profil mutatott. Tíz hónap várakozás után az átlagos tumorszám 32,6%, míg a tumor incidencia 100% volt. Mértük a májtömeg testtömeghez viszonyított százalékos arányát, amely 5,43 értékről a DEN tumorindukció hatására 9,70 értékre emelkedett. Vegyületeink tumorelles hatását vizsgálva, a DEN injekciót követő 4. hónaptól 3 hónapon át, hetente kétszer 0,75 mg **23a**, illetve 2 hónapon át hetente kétszer 0,50 mg **27** kezelést alkalmaztunk. Tíz hónappal az tumorindukció után az egerek májtömegének testtömeghez viszonyított százalékos aránya a **23a** vegyülettel kezelt egerekben 5,5%, a **27** vegyülettel kezelt egerekben ugyanez a mérőszám 4% volt (7. ábra).



1. kép. Konfokális fluoreszcens lézer szkennig mikroszkópos felvétel oil red O festéssel. HT168 humán melanóma sejtekben a kékel fluoreszkáló **14b** (a. 5μM), illetve a lipid cseppekre specifikus (oil red O) (b) festési eljárás látható. A lila szín az oil red O vörös, a **14b** kék színének szinergizmusából keletkezik (c).²³⁻²⁴

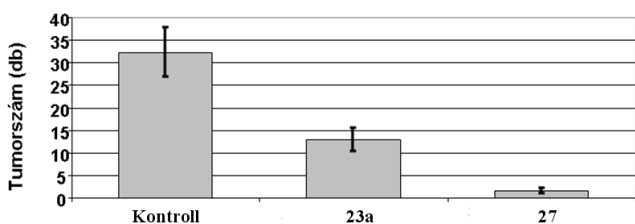


2. kép. Konfokális fluoreszcens lézer szkennig mikroszkópos felvétel ER-Tracker™ Green festéssel. HT168 humán melanóma sejtekben a kékel fluoreszkáló **14b** (d, 20μM), illetve az endoplazmatikus retikulumra specifikus (ER-Tracker™ Green) (e) festési eljárás látható. A türkiz szín az ER-Tracker™ Green és a **14b** színének szinergizmusából keletkezik (f). A d-f képek magasabb lézer teljesítmény mellett SCID egerek májszövetéből készültek.²³⁻²⁴



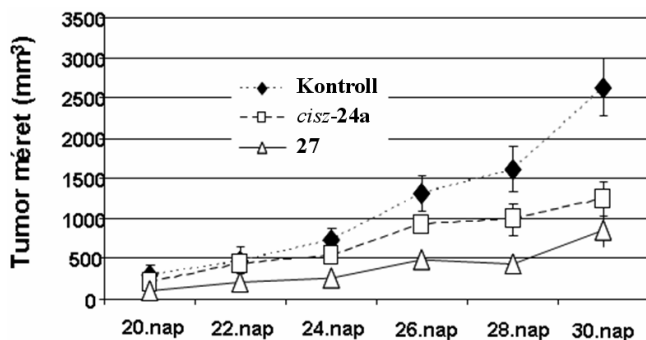
7. Ábra. 23a és 27 rákellenes hatása élő állatban; májkarcinóma.

Az átlagos tumorszám a csak DEN-t kapott egércsoportban a **23a** vegyület hatására lecsökkent 13 értékre, a **27** származék esetében 1,6-ra (8. ábra). Megállapíthatjuk, hogy DEN indukált máj karcinogenezis modellben **23a** és **27** kezeléssel mind a májtömegindexet, mind a tumorszámot sikeresen csökkentettük.



8. Ábra. 23a és 27 rákellenes hatása élő állatban; májkarcinóma.

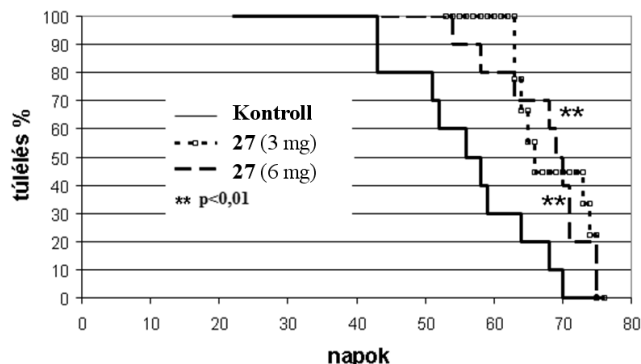
Az *cisz-24a* és **27** vegyületek tumorelles hatását MCF7 szubkután oltott SCID immunhiányos egérmodellel is elvégeztük.^{30,34} A kezeléseket a harmadik naptól kezdve, 4 héten keresztül heti háromszor (*cisz-24a* esetén 10 mg/kg, **27** esetén 3 mg/kg) adtuk. A 20. naptól minden másnap meghatároztuk a növekvő tumorok méretét. Látható, hogy mindkét vegyülettel történő kezelés csökkentette a növekvő emlőtumor méretét (9. ábra).



9. Ábra. *cisz-24a* és **27** rákellenes hatása élő állatban; emlőtumor.

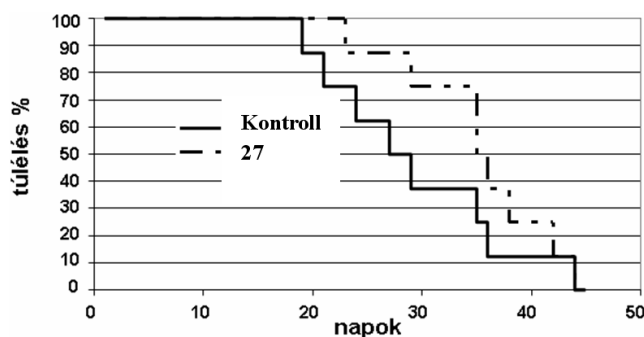
A **27** vegyületet melanóma ellen is vizsgáltuk, HT168 humán sejttel lépbe oltott SCID immunhiányos egérmodellel.^{30,34} A kezeléseket a harmadik naptól kezdve, 4 héten keresztül heti háromszor adtuk 3 mg/kg illetve 6 mg/kg dózisban intravénásan. Az idő előrehaladtával minden nap meghatároztuk a túlélő állatok számát (10. ábra). Mind a 3 mg/kg, mind a 6 mg/kg dózis hatásos volt, a **27** vegyülettel történő kezelés megnövelte az állatok túlélését.

A **27** glioblasztóma vizsgálatát U87 humán sejttel agyba oltott „nude” immunhiányos patkánymodellel végeztük el.^{30,34} A kezeléseket a hatodik naptól kezdve, 4 héten keresztül heti háromszor 3 mg/kg dózisban intravénásan adtuk. Az idő előrehaladtával minden nap meghatároztuk



10. Ábra. **27** rákellenes hatása élő állatban; melanóma.

a túlélő állatok számát (11. ábra). Itt is látható, hogy a vegyülettel történő kezelés hatásos volt, megnövelte az állatok túlélését.



11. Ábra. **27** rákellenes hatása élő állatban; glioblasztóma.

3. Összefoglalás

A 2-(2,6-diizopropilfenil)-4,5,6,7-tetrafluorizindolin-1,3-dion (**1**) aromás nukleofil szubsztitúciós reakcióban 129 új talidomid származékot állítottunk elő. A vegyületkönyvtárból az elsődleges biológiai teszteredmények (K562, humán leukémia sejtvonal) alapján a szignifikáns citotoxikus aktivitással rendelkező 13 molekula közül 4 „hit” vegyület; a **23a**, a *cisz-* és *transz-24a* és a **27** származékokat további sejtvonalakon (humán tumor sejtvonalak: HT168, HepG2, Hep3B, MCF7, PC3, A549, HT29, K562, HL60, GBM1) is vizsgáltunk és nanomólos EC₅₀ értéket detektáltunk melanóma (HT168) valamint leukémia (K562, HL60) sejtvonalon.

A gramm-tételes előállítás optimalizálva, majd SUV liposzómába zárva a négy vegyületet *in vivo* teszteltük. Máj karcinóma modellben a **23a** és **27** vegyület, míg emlődaganat modellben a *cisz-24a* és **27** származék csökkentette szignifikánsan a tumorszámot. Emellett a **27** „lead” vegyület melanóma és glioblasztóma esetében megnövelte a kezelt állatok túlélési idejét.

Feltételezésünk szerint ezek a ftalimid származékok a cel-luláris vezikuláris rendszerek, különösen a lipid-cseppecskék kialakulását és működését befolyásolják. A biológiai hatás hátterében az endoplazmatikus retikulum oxidatív stressz folyamatának indukciója állhat, amely a tumorsejtek pusztulását eredményezi.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak a kutatásokhoz nyújtott támogatásokért (GOP-1.1.1-11-2011-0003, GOP-1.1.1-11-2012-0015).

Hivatkozások

- Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Melis, M.; Pirisi, F. M.; Farris, G. A.; Sotgiu, C.; Minelli, E. V. *J. Agr. Food Chem.* **1997**, *45*, 476-479.
- Salau, J. S.; Alonso, R.; Batlló, G.; Barceló, D. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *293*, 109-117.
- Buettler, B.; Hoermann, W. D. *J. Agr. Food Chem.* **1981**, *29*, 257-260.
- Molnár, P.; Véghelyi, K.; Balogh, I. *J. Hort. Sci.* **2003**, *9*, 29-33.
- Simpson, J.; Weiner, E. *The Oxford English Dictionary*; Oxford University Press; 3rd edition, **2005**.
- Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 461-479.
- Matthews, S. J.; McCoy, C. *Clin. Ther.* **2003**, *25*, 342-395.
- Knightley, P.; Evans, H.; Potter, E.; Wallace, M. *Suffer The Children: The Story of Thalidomide*; New York: The Viking Press; **1979**.
- Miller, M. T. *T. Am. Ophthal. Soc.* **1991**, *81*, 623-674.
- Rouhi, M. *Chem. Eng. News* **2005**, *83*, 122.
- Franks, M. E.; Macpherson, G. R.; Figg, W. D. *Lancet* **2004**, *363*, 1802-1811.
- Pályi, G.; Zucchi, C.; Caglioti, L. *Advances in BioChirality*; Elsevier; 1st edition, **1999**.
- Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Elsevier; 2nd edition, **2004**.
- Lebrin, F.; Srun, S.; Raymond, K.; Martin, S.; van den Brink, S.; Freitas, C.; Bréant, C.; Mathivet, T.; Larrivé, B.; Thomas, J. L.; Arthur, H. M.; Westermann, C. J. J.; Disch, F.; Mager, J. J.; Snijder, R. J.; Eichmann, A.; Mummery, C. L. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 420-428.
- Ng, S. S.; Gütschow, M.; Weiss, M.; Hauschildt, S.; Teubert, U.; Hecker, T. K.; Luzzio, F. A.; Kruger, E. A.; Eger, K.; Figg, W. D. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3189-3194.
- Capitosti, S. M.; Hansen, T. P.; Brown, M. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 327-336.
- Calabrese, L.; Fleischer, A. B. *Am. J. Med.* **2000**, *108*, 487-495.
- Singhal, S.; Mehta, J.; Desikan, R.; Ayers, D.; Roberson, P.; Eddlemon, P.; Munshi, N.; Anaissie, E.; Wilson, C.; Dhodapkar, M.; Zeldis, J.; Siegel, D.; Crowley, J.; Barlogie, B. *New Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 1565-1571.
- Durine, B. G. M. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 3-38.
- Rajkumar, S. V. *Expert Rev. Anticanc.* **2001**, *1*, 20-28.
- Little, R. F.; Wyvill, K. M.; Pluda, J. M.; Welles, L.; Marshall, V.; Figg, W. D.; Newcomb, F. M.; Tosato, G.; Feigal, E.; Steinberg, S. M.; Whitby, D.; Goedert, J. J.; Yarchoan, R. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 2593-2602.
- Ge, Y.; Montano, I.; Rustici, G.; Freebern, W. J.; Haggerty, C. M.; Cui, W.; Ponciano-Jackson, D.; Chandramouli, G. V. R.; Gardner, E. R.; Figg, W. D.; Abu-Asab, M.; Tsokos, M.; Jackson, S. H.; Gardner, K. *Blood* **2006**, *108*, 4126-4135.
- Puskas, L. G.; Feher, L. Z.; Vizler, C.; Ayaydin, F.; Raso, E.; Molnar, E.; Magyary, I.; Kanizsai, I.; Gyuris, M.; Madacsi, R.; Fabian, G.; Farkas, K.; Hegyi, P.; Baska, F.; Ozsvári, B.; Kitajka, K. *Lipids Health Dis.* **2010**, *9*:56.
- Nagy, L. I.; Molnár, E.; Kanizsai, I.; Madácsi, R.; Ozsvári, B.; Fehér, L. Z.; Fábán, G.; Marton, A.; Vizler, C.; Ayaydin, F.; Kitajka, K.; Hackler, L. Jr.; Mátés, L.; Deák, F.; Kiss, I.; Puskás, L. G. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*:175.
- Mitsiades, N.; Mitsiades, C. S.; Poulaki, V.; Chauhan, D.; Richardson, P. G.; Hideshima, T.; Munshi, N. C.; Treon, S. P.; Anderson, K. C. *Blood* **2002**, *99*, 4525-4530.
- Singhal, S.; Mehta, J. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 4-12.
- Noopur, R.; Kenneth, A. *Curr. Opin. Oncol.* **2002**, *14*, 635-640.
- Kaisha, I. S.; Yuichi, H. Phthalimide derivative or its salt, their production and pharmaceutical composition containing the derivative JPH Patent 10,231,285, **1998**.
- Avicor Kft. Compounds and composition for labeling lipid droplets, and a method for visualization of cells and/or cellular organelles WO Patent 155,593, **2008**.
- Avidin Kft. Phthalimide derivatives that influence cellular vesicular systems, pharmaceutical compositions, and use thereof US Patent 184,762, **2010**.
- Muir, M.; Baker, J. *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 727-738.
- Chambers, R. D.; Martin, P. A.; Sandford, G.; Williams, D. L. *H. J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 998-1002.
- Liljenberg, M.; Brinck, T.; Herschend, B.; Rein, T.; Rockwell, G.; Svensson, M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3150-3153.
- Avidin Kft. Use of trifluoro phthalimides for the treatment of cancerous diseases WO Patent 85,608, **2012**.

Preparation and biological screening of 4-amino-5,6,7-trifluorophthalimides in vitro and in vivo

N-substituted 1,3-isoindolones (phthalimides) possess broad pharmaceutical potency and an *N*-thiochloroalkyl derivative is a marketed antifungal crop protective preparation (Folpan®). The most well known member of this family is thalidomide (Contergan®) introduced by Grünenthal in 1957. While owing to the teratogenic side-effect of the *S*-enantiomer it was withdrawn from the market, recently racemic thalidomide was re-introduced in a number of indications like Crohn's disease, AIDS and hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). Due to its supposed angiogenesis inhibitor effect, thalidomide and its recently registered derivatives (lenalidomide and pomalidomide) have been successfully applied in cancerous diseases like myeloma multiplex, leukaemia and prostate cancer (Scheme 1). Compounds having four halogen substituent in their aromatic ring showed remarkable TNF- α inhibitory effect and among them the tetrafluoro *N*-2,6-diisopropylphenyl (**1**) derivative proved to be the most potent (Scheme 2). Our aim was to further derivatize compound **1** and to attempt to merge the pharmacological efficacy of lenalidomide and **1**.

Our starting material **1** was synthesized by the S_N -acyl reaction of 3,4,5,6-tetrafluorophthalic anhydride and 2,6-diisopropyl aniline in good yield (85%). The treatment of **1** with primary or secondary amines leads to regioisomeric mixture of 4- and 5-amino 5,6,7- and 4,6,7-trifluorophthalimide derivatives in an aromatic nucleophilic substitution (S_N Ar) reaction. The circumstances are optimal for the addition-elimination pathway: nucleophilic attack of the amines, fluoride as an excellent leaving group and the carbonyl function of the phthalimide *ortho* and/or *para* to the leaving halogenide. The first obtained regioisomers **14a** and **14b** could be efficiently separated and thus their exact structures were confirmed by means of X-ray crystallography. Further derivatives were designed based on the initial MTS test. As a result, 129 thalidomide derivatives were prepared by the application of 30 primary and 34 secondary amines. Consistently, regioisomers **a** proved to be biologically more active over isomers **b**. Regarding the synthetic work, 2 equivalents of amine were reacted with starting material **1** that furnished in all case the biologically less active regioisomer **b** as the main product. However, efficient separation was possible in all case on gram

scale. The formation of the regioisomers was typically in the range of 1:9 to 1:2 apart from two examples **20** and **22** where a nearly 1:1 ratio was observed (Table 1). In order to gain access to a compound library with enhanced cytotoxicity, phthalimides **25a** and **25b** were synthesized containing a primary amino group on the aromatic ring. By further derivatizing this functionality, our aim was to prepare a more potent cytotoxic compound. As an example, reacting **25a** with chloroacetyl isocyanate furnished the urea derivative **27** in good yield. However, treatment with other isocyanates resulted in only unreacted starting material.

The obtained 129 analogues were screened in biological assay (K562, human leukaemia cell line) (See Table 2.). Four of our compounds (**23**, *cis* **24a**, *trans* **24a** and **27**) showed marked antitumor activity and further tested on numerous human tumour cell lines (MCF7, HepG2, Hep3B, HT168, A549, K562, HL60, HT29, PC3, GBM1).

Excellent activities were observed in melanoma (HT168) and leukaemia (K562 and HL60) assays, all four compounds gave EC₅₀ values in the nanomolar range. Due to the excellent fluorescent property of **14b**, the intracellular location of our materials could be examined by confocal fluorescent laser scanning microscopy

applying a “double-painting” procedure. As lipid droplet accumulation can be observed in cancer cells unlike in normal ones, quantitative measurement of **14b** could serve as a selective tool for cancer cell identification, as well. After optimization of the gram scale preparation protocol and formulation into an SUV type liposome, our compounds were tested on living animals, as well. Compounds **23a** and **27** decreased the liver mass index (from 9.7 to 5.5 and 4 respectively) and the tumour number (from 32.6 to 13 and 1.6 respectively) in liver cancer while compounds *cis* **24a** and **27** the tumour size in breast cancer models. Additionally, in melanoma and glioblastoma models analogue **27** increased the survival rate of the test animals significantly by several days.

Our nanosized liposome system formulated from biocompatible and biodegradable materials as former experiments showed adverse absorption and toxicological profile of the non-formulated active agent.

We propose that these phthalimide derivatives influence the function of the cellular vesicular system, especially the formation of lipid droplets. The background of the biological effect might be the oxidative stress induction of the endoplasmic reticulum that results in the destruction of cancer cells.