

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки, специальности)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль)/специализация)

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)**

на тему Синтез ингибиторов Rho-киназы на основе

2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазола

Студент

А.А. Мельников

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Тольятти 2021

Аннотация

Выпускная квалификационная работа изложена на 54 страницах, содержит 10 рисунков, 1 таблицу, 20 схем, использован 51 литературный источник.

Объектами настоящего исследования являются ингибиторы Rho-киназы на основе 2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазола. Ингибиторы Rho-киназы представляют фармакологический интерес, ввиду их важного влияния на клеточные процессы.

В литературном обзоре рассмотрены синтезы и биологические исследования ингибиторов ROCK. Особое внимание было уделено селективности исследуемых ингибиторов.

В экспериментальной части описаны методики получения и биологические испытания 2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазолов.

Abstract

The title of the graduation work is «Synthesis of Rho-kinase inhibitors based on 2-amino-4-(pyridine-4-yl)-thiazole».

The aim of this work is to create new highly active ROCK I inhibitors based on thiazole scaffold, as well as to study their inhibitory activity.

This paper describes a practical approach to the development of Rho-kinase inhibitors. In the course of the work, new Rho-kinase inhibitors based on thiazole scaffold were created, their biological tests were carried out, and a method for their preparation was developed.

The graduation project consists of an introduction, 3 chapters, a conclusion, an explanatory note on 54 pages, including 10 figures, 1 table, 20 schemes, the list of 51 references.

The literature review considers the approaches and scaffolds used in the synthesis and biological studies of ROCK inhibitors. Special attention was paid to the selectivity of the studied inhibitors.

The second part provides a detailed description of synthesis and biological research.

The third part presents methods for the synthesis of inhibitors, their physico-chemical properties.

In conclusion, it was noted that compound **118e**, according to the test for inhibitory activity in relation to ROCK I, has good inhibitory activity, and is promising for further research and modifications.

Содержание

	Стр.
Принятые сокращения	5
Введение.....	7
1 Литературный обзор	8
1.1 Селективные ингибиторы ROCK I.....	8
1.2 Селективные ингибиторы ROCK II.....	12
1.2.1 Ингибиторы на основе хромана	12
1.2.2 Ингибиторы на основе других производных	18
1.3 Ингибиторы смешанного типа	26
2 Обсуждение результатов	36
2.1 Синтез ингибиторов.....	37
2.2 Биологические испытания.....	41
3 Экспериментальная часть.....	44
3.1 Реагенты и оборудование.....	44
3.3 Синтез целевых соединений	46
3.4 Ингибирование ROCK 1.....	48
Заключение	49
Список используемой литературы	50

Принятые сокращения

MLC	лёгкая цепь миозина
ВГД	внутри глазное давление
HATU	гексафторфосфат <i>O</i> -(7-азабензотриазол-1-ил)- <i>N,N,N',N'</i> -тетраметилурия
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования
DCM	дихлорметан
DIPEA	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
АДФ	аденозиндифосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
AGC	группа семейств протеинкиназ А, G и С
Met	метионин
Glu	глутаминовая кислота
Phe	фенилаланин
Ala	аланин
mPCBA	<i>m</i> -хлорнадбензойная кислота
TFA	трифторуксусная кислота
S _N 2	бимолекулярное нуклеофильное замещение
Вос	трет-бутоксикарбонильная группа
DMF	<i>N,N</i> -диметилформаид
NBS	<i>N</i> -Бромсукцинимид
THF	тетрагидрофуран
DMA	<i>N,N</i> -Диметилацетамид
K _i	константа ингибирования
MDA-MB-231	линия клеток рака молочной железы человека
DABCO	1,4-диазабицикло[2.2.2]октан
Cdc42	гомолог белка 42 контроля клеточного деления

C57	инбредный штамм лабораторных мышей
Prkce	протеинкиназа С эpsilon типа
293T	вариант клетки человеческой эмбриональной почки НЕК 293
PAMPA	параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны
PKA	протеинкиназа А
PKG	протеинкиназа G
PKC	протеинкиназа С
JNK3	митоген-активированная протеинкиназа 10
p38	митоген-активированная протеинкиназа 14
MYPT1	субъединица связывания миозина
KITD814V	мутация KIT в домене тирозинкиназы
FLT3N51	мутация FLT3 в домене тирозинкиназы
KIT	прото-онкоген
FLT3	fms-подобная тирозинкиназа 3
BCR-ABL	гибридный белок, продукт гибридного гена BCR-ABL1
T-клетка	разновидность лимфоцитов, развивающихся в вилочковой железе
HeLa	линия клеток рака шейки матки человека
hERG	ионный канал

Введение

Rho-ассоциированная протеинкиназа (ROCK) - это киназа, принадлежащая к семейству AGC (PKA/PKG/PKC). Она участвует главным образом в регулировании формы и движения клеток, воздействуя на цитоскелет [1].

Rho-киназа играет важную роль в широком спектре различных клеточных явлений, таких как: регуляция миграции клеток, антагонизация сигнального пути инсулина [2], ингибирование деполимеризации актиновых нитей [3].

Исследования последних двух десятилетий показали, что rho-киназы играют важную роль во многих заболеваниях, таких как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания [4], болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз [5] и рак [6]. Поэтому синтез ингибиторов rho-киназы являются важным направлением медицинской химии.

Цель работы: Изучить подходы, а также перспективные скаффолды используемые при синтезе ингибиторов rho-киназы, и на основании полученных данных создать новые ингибиторы.

Задачи работы:

- Исследовать научную литературу о различных способах синтеза ингибиторов rho-киназы;
- Подготовить методику для получения ингибиторов, выбранных с помощью молекулярного докинга;
- Синтезировать и провести биологические исследование синтезированных ингибиторов;
- Проанализировать полученные данные и сделать выводы, об успешности полученных ингибиторов.

1 Литературный обзор

1.1 Селективные ингибиторы ROCK I

Во многих классах ингибиторов ROCK, включая некоторые, содержащие 7-азаиндольный фрагмент, киназным шарнирно-связывающим элементом является пиразольная группа [7,8]. В данной работе [9] были рассмотрены 3- и 4-тиазолзамещённые 7-азаиндола. Проведя конформационный анализ 4-замещённых тиазо-7-азаиндолов было выявлено, что желаемая компланарность азаиндольного и тиазольного колец, будет энергетически не благоприятной. Самое низкое энергетическое состояние для 4-тиазол-4-ил-7-азаиндолов будет наблюдаться, когда угол между двумя кольцевыми системами будет равен 45° , однако в этом случае ингибитор будет плохо выровнен для оптимального связывания активного сайта киназы. Конформации, в которых кольца азаиндола и тиазола являются копланарными, находятся на высоком уровне энергии. Однако, когда биарильное соединение смещено в 3-положение 7-азаиндола, самая низкая конформация энергии возникает, когда кольца тиазола и азаиндола компланарны. Молекулярное моделирование 3-замещённой 7-азаиндольной системы, пристыкованной к активному участку ROCK показало, что расположения азота пиридина всё ещё будет образовывать водородную связь с Met156. Таким образом было предположено, что 2-(фенилацетиламино)тиазол как в 3-, так и в 4-положении 7-азаиндольного кольца может обеспечить ингибирование ROCK I.

Синтез 4-замещённых азаиндольных соединений **11a** и **11b** показан на схеме 1. На 1 стадии идёт защита пиррольного атома азота 4-хлор-7-азаиндола **1** с помощью бензолсульфонилхлорида **2**. Далее полученное соединение **3** обрабатывают 1-этоксивинилтри-*n*-бутилоловом **4** в присутствии $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_2)_2$ и диоксана с получением енол-эфира **5**. Взаимодействие соединения **5** с NBS даёт α -бромкетон **6**, который при

реакции с тиомочевинной **7**, образует аминотиазольное кольцо. Далее идёт ацилирование между соединениями **8** и **9**, с последующим удалением бензолсульфонильной защитной группы, с получением соединений **11a-11b**.

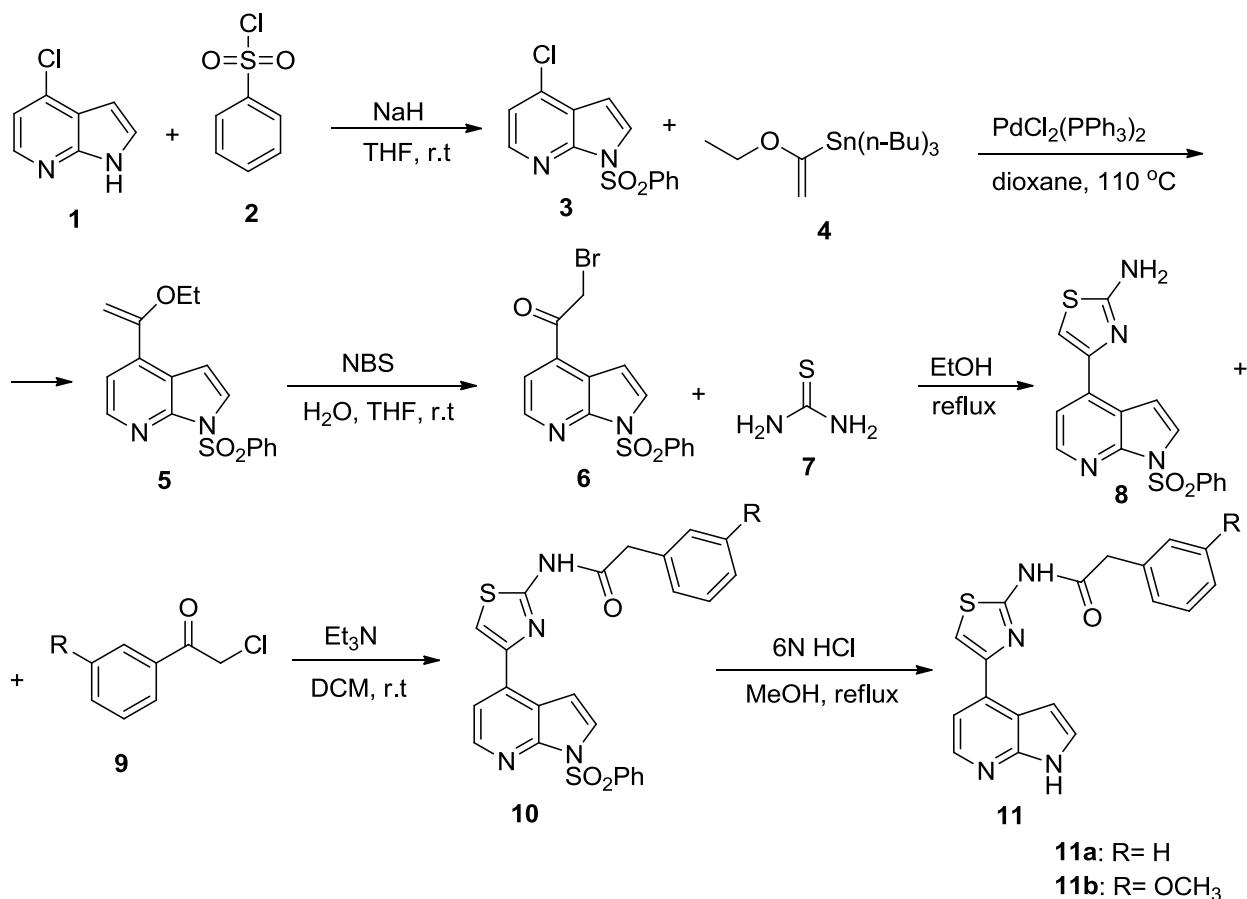


Схема 1 – Синтез 4-замещённых 7-азаиндолов соединений **11a-11b**

3-Замещённые-7-азаиндолы **17a-17p** получали в три стадии, как показано на схеме 2. На первой стадии, коммерчески доступный 7-азаиндол **12**, ацилировали по Фриделю - Крафтсу, с помощью бромацетилбромида **13** в дихлорметане, с получением соединения **14**. Далее соединение **14** обработали тиомочевинной **7** в кипящем этаноле. Амидирование соединения **15** с помощью различных *m*-замещённых фенилуксусных кислот **16** осуществляли, с использованием метансульфонилбензотриазольного реагента в присутствии Et₃N, THF и DMA в микроволновой печи при температуре 160 °С, с получением соединений **17a-17p**.

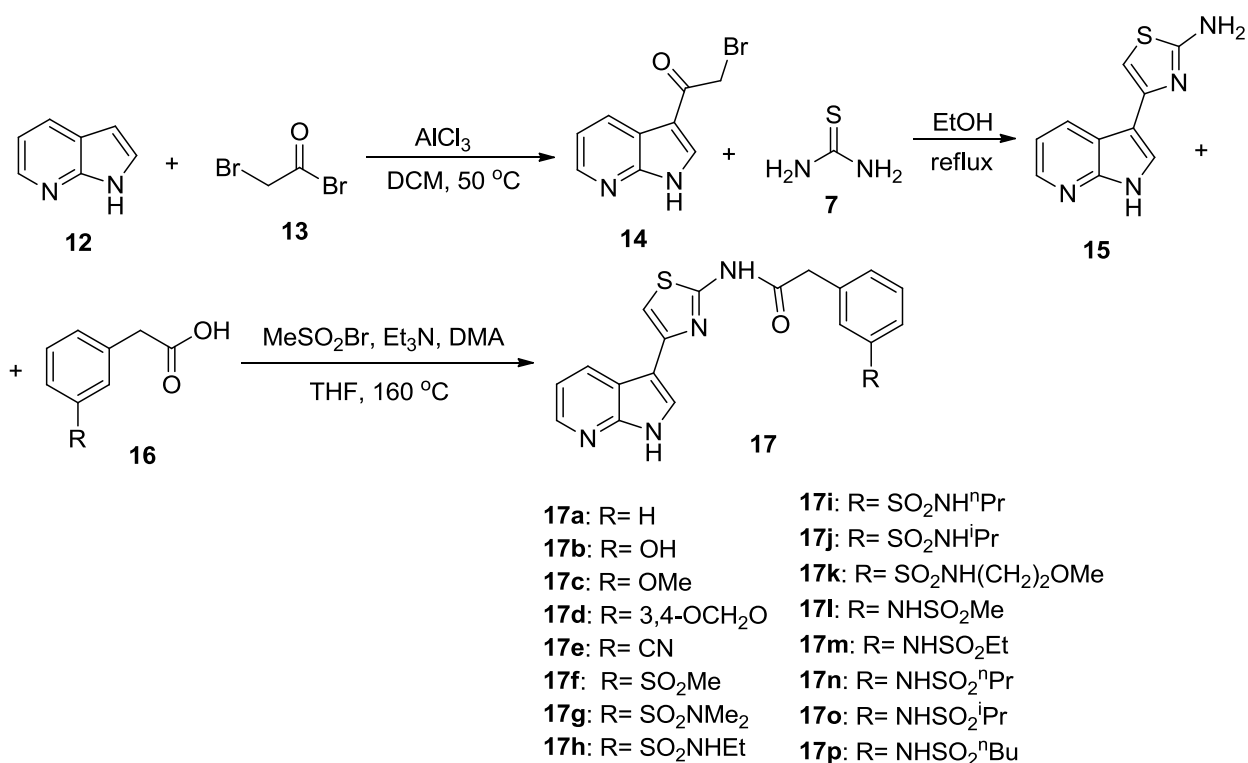


Схема 2 – Синтез 3-замещённых 7-азаиндолов соединений **17a-17p**

Данные по ингибированию для соединений **11a-11b** и **17a-17p**, показывают, что аналоги 7-азаиндола являются сильными ингибиторами ROCK I, со значениями K_i обычно ниже 20 нМ. Однако большинство из них показали низкую селективность по отношению к PKA и ROCK II. В частности, 4-замещенные соединения **11a** и **11b** показали наименьшую селективность и несколько более слабое сродство к ROCK I, что приводит к снижению LLE. В аналогичном 3-замещенном 7-азаиндольном ряду общее сродство к ROCK I было несколько улучшено (следовательно, улучшено LLE значения), хотя селективность относительно PKA и ROCK II не улучшилась. Наиболее успешное соединение **17i** показало 5-кратную селективность изоформы ($K_i = 2$ нМ, 10 нМ) по отношению к ROCK II и 24-кратную селективность ($K_i = 2$ нМ, 48 нМ) по отношению к PKA. Следует отметить, что ингибирование СУР 3A4, проблема, которая ранее наблюдалась в серии пиридинов, осталась и у этих производных азаиндола. Чтобы понять способы

связывания этих соединений, было произведено рентгеновское излучение кристаллической структуры соединения **17i**, связанного с ROCK I (рисунок 1). Как и ожидалось, 7-азаиндольный остаток соединения **17i** образует водородную связь между пиридиновым атомом азота и Met156. Пиррольный атом азота образует новую водородную связь с карбонилем основной цепи Gln154. Также две водородные связи между сульфонамидом и амино группой остатков Phe87 и Ala86.

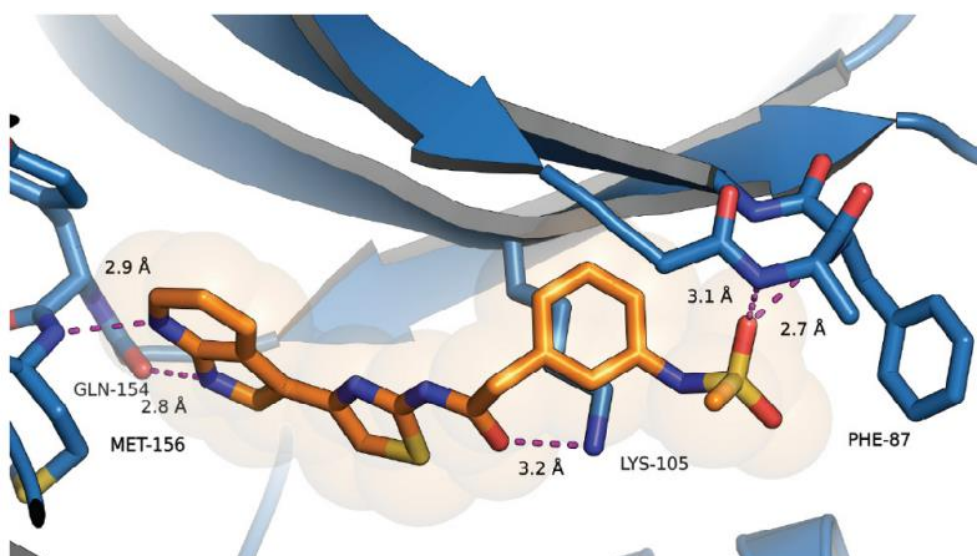


Рисунок 1 – Рентгеновская кристаллическая структура соединения **17i**, связанного с ROCK I

В 2007 году были проведены обширные исследования по выявлению новых классов мощных и селективных ингибиторов ROCK [10]. Для идентификации новых ингибиторов использовали специализированные методы скрининга, на основе фрагментов низкомолекулярных соединений [11]. В работе [12] описывается основанный на этих исследованиях подход, который позволил получить новый низкомолекулярный ингибитор ROCK I с улучшенной фармакокинетикой, по сравнению со соединениями первого поколения, для потенциального лечения атеросклероза.

Синтез наиболее успешного соединения представлен на схеме 3. Окисление соединения **18** с помощью mCPBA с последующей обработкой POCl₃ давало соединение **19**, которое было преобразовано в соединение **20** в

реакции с фенолом и гидроксидом калия. Затем соединение **20** обрабатывали ацетатом аммония до получения соединения **21**, которое депротектировали бромидом бора с получением соединения **22**. Далее произошла S_N2 реакция между соединением **22** мезилатом **23** с получением эфира **24**. На последней стадии была снята Boc защитная группа.

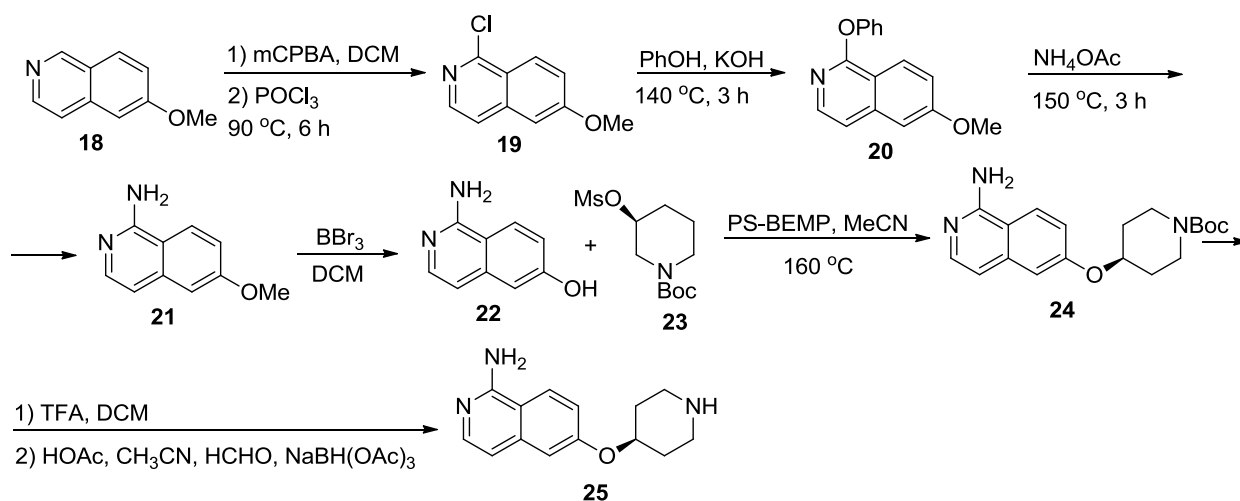


Схема 3 – Синтез соединения **25**

Соединение **25** показало 5-кратную селективность изоформы при ($ROCK\ I-IC_{50} = 5.67 \pm 0.16\ nM$) и ($ROCK\ II-IC_{50} = 25.89 \pm 0.04\ nM$). В ходе исследований было выявлено, что соединение **25** обладает лучшей фармакокинетикой *in vivo* у лабораторных мышей C57 по сравнению с ингибиторами ROCK I первого поколения.

1.2 Селективные ингибиторы ROCK II

1.2.1 Ингибиторы на основе хромана

В работе [13] Чен и его коллеги усовершенствовали своё предыдущие производное хромана [14]. В прошлой статье был представлен синтез хроман-амидов, которые были субнаномолярными ингибиторами ROCK II с отличной селективностью по отношению к родственным киназам, таким как PKA, AKT1 и высоко гомологичной Cdc42. Кроме того, эти соединения

проявляли хорошую активность в анализе бис-фосфорилирования MLC на основе функциональных клеток (ppMLC) [15] и умеренный фармакокинетический профиль. Хроман был предварительно подготовлен и оценен как рацемат. Поэтому масштабируемый синтез энантиомеров этого соединения стал одним из главных приоритетов оптимизации предыдущей работы.

Энантиомерно чистые хромановые кислоты **33a** и **33b**, необходимые для синтеза одного энантиомера ингибитора **40**, были получены, в ходе следующей цепочки превращений (схема 4). Циклизация саликальдегида **26** с акрилонитрилом **27**, по реакции Бейлиса – Хиллмана, давала нитрил **28**, который впоследствии гидролизовался до *2H*-хроменовой кислоты **29**. Затем полученную кислоту обработали оксалилхлоридом с получением ацилгалогенида, который обработали (+,-) камфорсультамом, и в результате получили два энантиомерных производных *2H*-хроменовой кислоты **31a** и **31b**. После соединения **31a** и **31b** обработали L-селектридом, что привело к соединениям **32a** и **32b**. Камфорсультам был удален смесью гидроксида лития и перекиси водорода с получением энантиомерно чистых кислот **33a** и **33b** в качестве *R* - и *S* - энантиомеров.

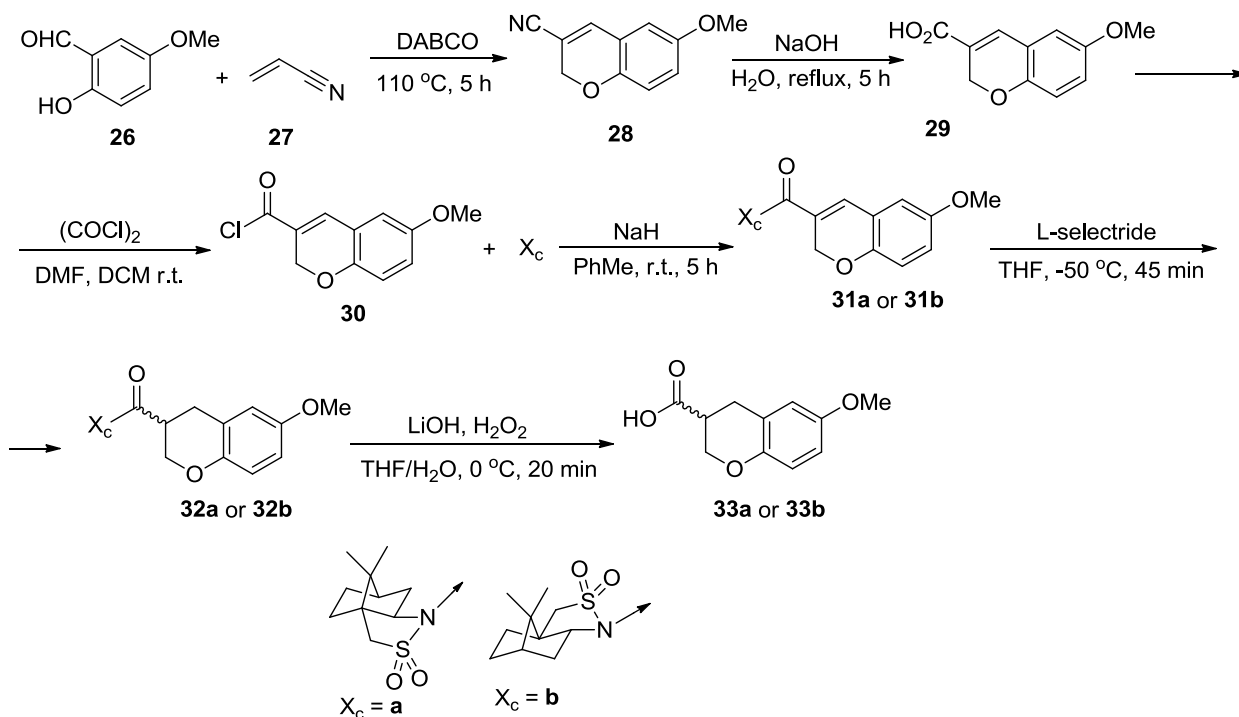


Схема 4 – Синтез соединений **33a** и **33b**

В предыдущий работе синтез рацемического ингибитора включал несколько этапов, с присутствующими основаниями, которые потенциально могли бы рацемизировать соединения, возникающие из хромановых кислот **33a** и **33b**. Чтобы избежать лишних стадий, был разработан новый метод получения хромансодержащих ингибиторов. В этом пересмотренном синтезе (схема 5) 4-бром-2-фторнитробензол **3** превращали в ариловые эфиры с общей структурой **35** путем нуклеофильного замещения фтора соответствующим спиртом с последующей реакцией Сузуки, между соединениями **35** и **36**. Далее пиррольный атом азота был защищен с помощью Wos_2O , а нитрогруппа бензола была восстановлена путём гидрирования. Наконец, была проведена реакция амидирования между соединением **39** и соединениями **33a-b**, с последующим снятием защитной группы. Универсальность этого синтетического пути позволила не только синтез одиночных энантиомеров хромана, а также различных аналогов с различными заместителями арилового эфира (**40 (S) a-d** и **40 (R) a-d**).

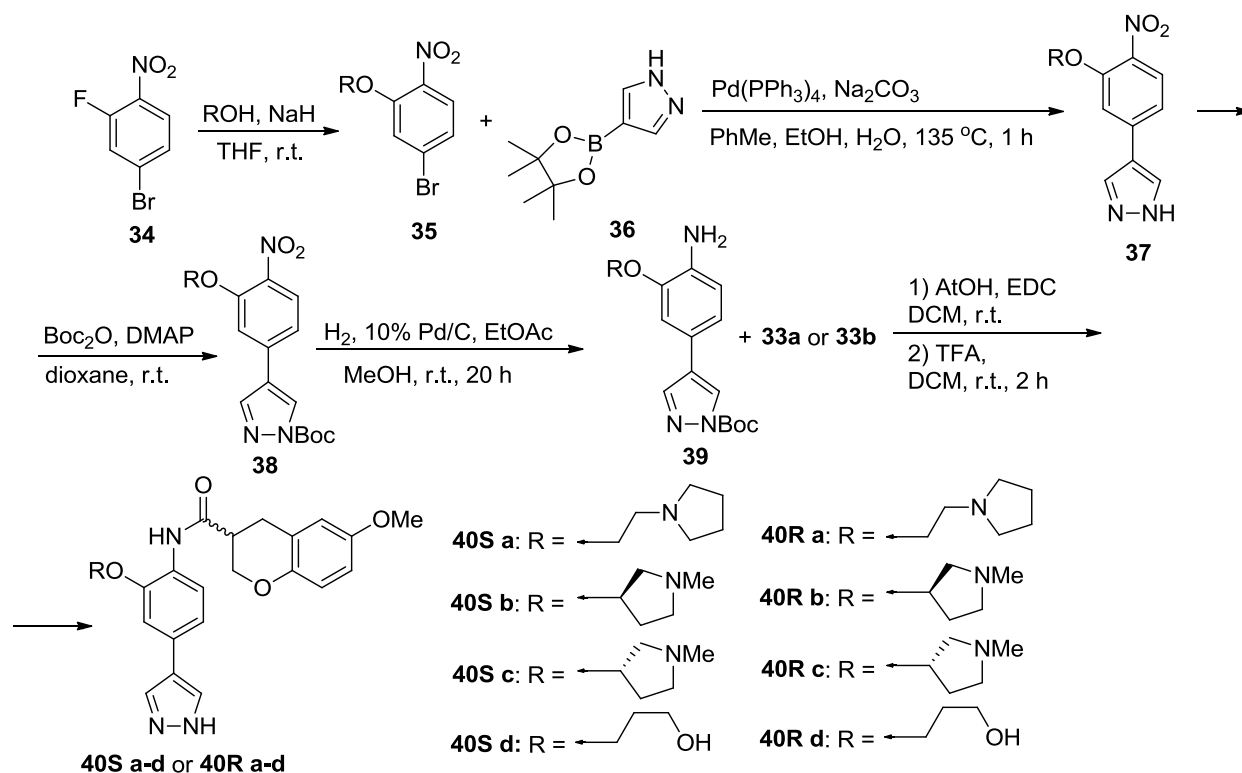


Схема 5 – Синтез соединений **40 (S) a-d** и **40 (R) a-d**

Селективность полученных соединений по отношению к ROCK II, PKA и MRCKa была оценена методами, описанными ранее [16]. Серия (*S*)-хроманов **40a-d** демонстрировала лучшую субнанолярную активность ($IC_{50} = 4$ нМ) по отношению к ROCK II нежели серия (*R*)-хроманов **40a-d** ($IC_{50} = 28$ нМ), однако с точки зрения селективности, серия *R*-хроманов была более интересна, из-за их способности эффективно ингибировать ROCK II с низким или нулевым сродством к PKA и MRCKa. В частности, аналог пирролидина **40 (R) b** показал самую высокую селективность относительно PKA и MRCKa в этом исследовании (>9500 и >1200-кратная против PKA и MRCKa соответственно).

В недавних исследованиях было показано, что ROCK I и ROCK II функционируют независимо друг от друга и играют разные роли в клеточных процессах [17-18], поэтому селективное ингибирование ROCK может приводить к различным биологическим эффектам. Недавно было высказано предположение, что селективное ингибирование изоформы ROCK II имеет широкое применение в лечении очаговой ишемии головного мозга. Также

предполагается, что гипертензивные эффекты системного ингибирования ROCK, в основном обусловлены ингибированием ROCK I [19]. SR3677, один из наиболее известных АТФ-конкурентных ингибиторов ROCK, продемонстрировал примерно 17,5-кратную селективность изоформы ROCK II [16]. В работе [20] авторы описали синтез соединений **46 (S)** и **46 (R)**, а также дали оценку их активности.

Сначала была синтезирована 6-метоксихроман-3-карбоновая кислота **33**. Соединение **26** обработали акрилонитрилом **27** в присутствии DABCO. Соединение **33** получили путём гидрирования кислоты **29** в присутствии метанола и Pd/C катализатора при комнатной температуре. Синтез представлен на схеме 6.

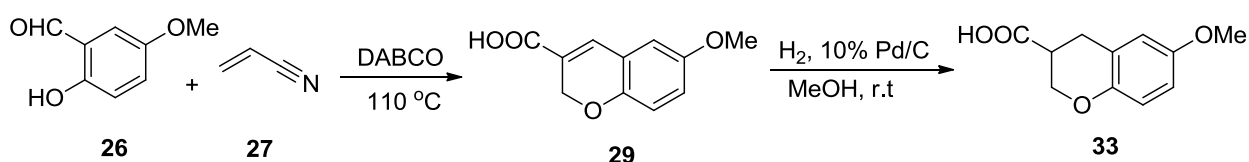


Схема 6 – Синтез соединения **33**

Для получения оптически активных 3-метоксилхроман-3-карбоновых кислот был разработан дешёвый и зелёный метод синтеза оптического активного соединения **33** из рацемического. Оба соединения (**R**)-**33a** и (**S**)-**33b** были получены путем этерификации соединения **33** с помощью (1R, 2R) или (1S, 2S) 2-амино-1-(4-нитрофенил)-пропан-1,3-диола, рекристаллизации в MeCN/MeOH, диссоциации с HCl и рекристаллизация в смеси Hexane/MeCN.

На схеме 7 представлен синтез соединений **46 (S)** и **46 (R)**, которые были получены в 4 стадии. На первой стадии была реализована реакция нуклеофильного замещения между коммерчески доступными 4-бром-2-фторнитробензолом **34** и 2-диметиламиноэтанолом **41** в THF при комнатной температуре с использованием гидроксида натрия в качестве основания. Далее

соединение **44** получили по реакции Сузуки – Мияуры между соединением **42** и 4-пиридинборной кислотой **43** с использованием $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ в качестве катализатора, карбоната натрия в качестве основания и смеси диоксана и воды в качестве растворителя при 100 °С. Далее была восстановлена нитро группа соединения **44** с помощью хлорида олова(II) в этилацетате при комнатной температуре. Конечный продукт получали путём амидирования между кислотами **33(a)**, **33(b)** и соединения **45** с HATU в качестве связующего реагента, DIPEA в качестве органического основания и DMF в качестве растворителя при комнатной температуре.

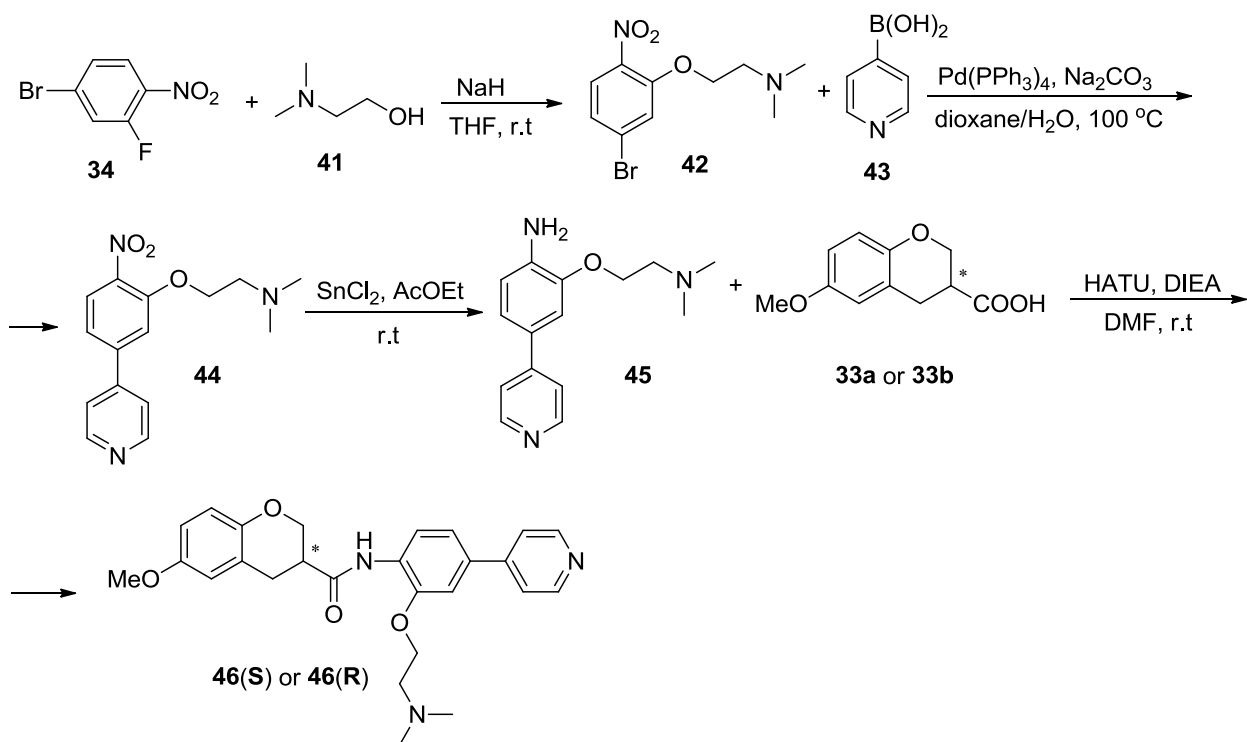


Схема 7 – Синтез оптически активных соединений **46 (R)** и **46 (S)**

После исследования полученных соединений было выявлено, что соединение **46 (S)** показало 22,7-кратную селективность изоформы при ($\text{ROCK I-IC}_{50} = 68 \text{ нМ}$) и ($\text{ROCK II-IC}_{50} = 3 \text{ нМ}$), в то время как **46 (R)** имел только 3-кратную селективность изоформы и слабую ингибирующую активность в отношении ROCK I и ROCK II ($\text{IC}_{50} = 523 \text{ нМ}$ и $\text{IC}_{50} = 172 \text{ нМ}$) соответственно. Эти результаты показали, что *S* конфигурация была

стереохимически предпочтительней, как и для ингибирования ROCK, так и для изоформной селективности. По итогу можно констатировать, что соединение **46 (S)** обладает лучшей селективностью и ингибирующей активностью, нежели соединение SR3677.

1.2.2 Ингибиторы на основе других производных

Одним из хорошо известных факторов, способствующих развитию сердечно-сосудистых заболеваний, является гипертония, вызванная повышенным сокращением гладкой мускулатуры [21]. Механистически rho-киназа катализирует инактивирующее фосфорилирование миозинсвязывающей субъединицы, что приводит к длительному сокращению гладкой мускулатуры и повышению сосудистого тонуса [22]. Таким образом, ингибирование ROCK представляет собой новый подход к лечению сердечно-сосудистых заболеваний, таких как гипертония. В последние годы сообщалось о ряде ингибиторов ROCK [23], наиболее цитируемыми из которых являются производное изохинолина Фазудил и пиридиновый Y-27632. В данной статье [24] сообщается об открытии и последующей оценке новой серии замещенных 2*H*-изохинолин-1-онов. Самым успешным производным изохинолина стало соединения **57**, синтез которого представлен на схеме 8.

Нитрозамещённую коричную кислоту **47** восстанавливали до соответствующего амина с использованием хлорида олова II в соляной кислоте, а после провели реакцию амидирования с использованием уксусного ангидрида и уксусной кислоты получив соединения **48**. Далее был получен ацилгалогенид, путём добавления хлорэтилформиата, в триэтиламине в качестве основания и ацетона в качестве растворителя, который затем обработали азидом натрия с получением соединения **49**. Ацилазид **49**, был превращен в изохинолин-1-оны **50**, **51** с помощью перегруппировки Курциуса, путём нагреванием в дибутиловом эфире диэтиленгликоля при температуре 230-260 °C. Смесь региоизомерных продуктов (**50**, **51**), была разделена хроматографией. Ацетильную группу

соединения **51** удаляли гидролизом в кислых условиях с использованием концентрированной соляной кислоты, образуя аминокинолиноновый промежуточный продукт **53**. Далее продукт **53** обрабатывали соединением **54** в присутствии DMF в качестве растворителя и триэтиламина в качестве основания. На последней стадии к соединению **55** добавляли циклопропиламин **56** в присутствии DMF с получением соединения **57**.

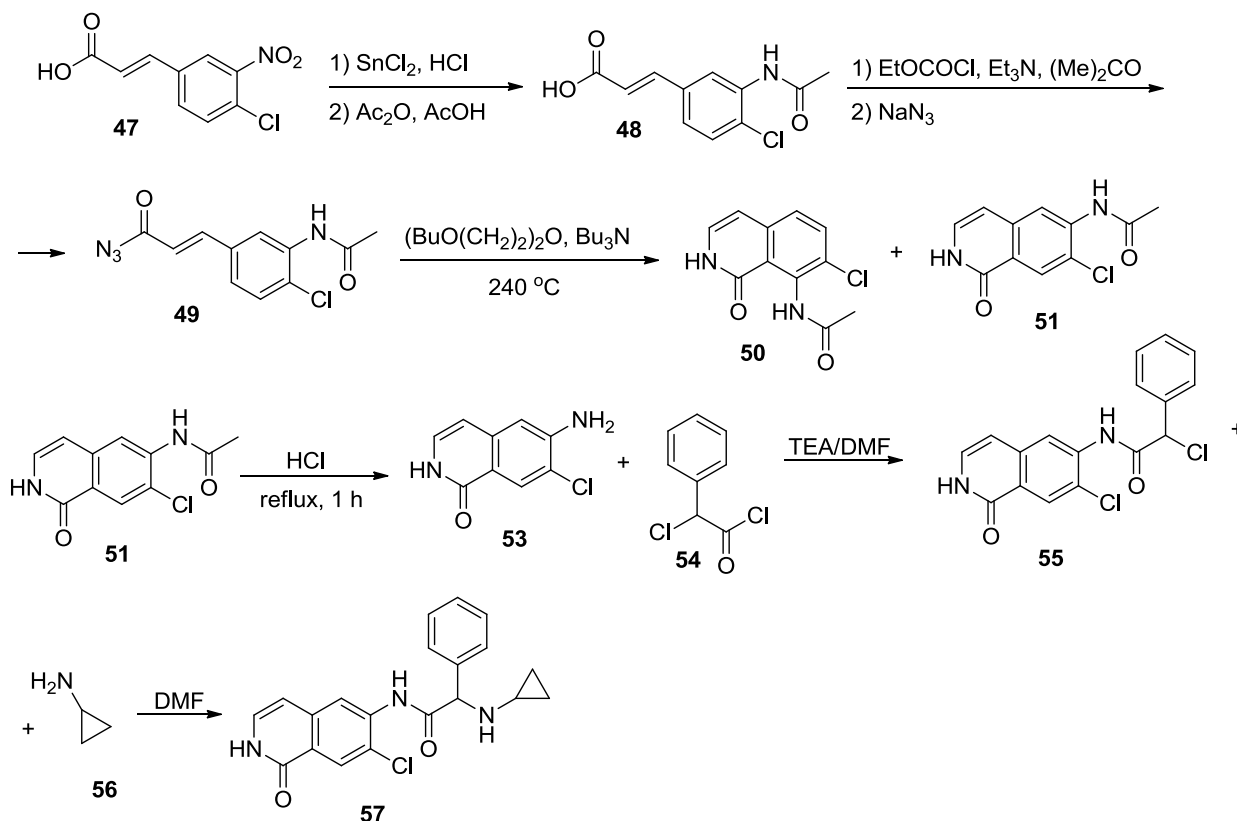


Схема 8 – Синтез соединения **57**

Соединение **57** показало субнанолярную активность по отношению к ROCK II ($\text{IC}_{50} = 19 \text{ нМ}$) и было протестировано на селективность по отношению встречающихся экранных киназ, таких как: Prkce, DMPK, cdc42 и Prkcl2, которые были выбраны в качестве представителей, на основе их сходства с ROCK, с точки зрения гомологии последовательностей, филогенетического родства, биологического родства и химической восприимчивости. В ходе исследований было выявлено, что соединение **57**

демонстрируют лучшую селективность (>420 по отношению к Prkce, DMPK, cdc42 и Prkc12) нежели фасудил и Y-27632. Ингибирование ROCK II расслабляет кровеносные сосуды *ex vivo*. Релаксационный эффект этих соединений был обратимым, так как сократительная способность могла быть восстановлена путем промывания обработанных колец аорты. Разница между ферментативной и тканевой активностями может быть частично обусловлена более высокой концентрацией АТФ на клеточном уровне, а также проницаемостью соединений. По сравнению с фасудилом и Y-27632, соединение **57** продемонстрировало более чем 10-кратное улучшение потенции как в ферментативном, так и в физиологическом отношении. Кроме того, соединение не индуцировало цитотоксических эффектов в клетках HeLa до концентрации 10 мкМ. Чтобы оценить ключевые области для дальнейшей оптимизации, соединение **57** анализировали на лекарственные свойства. Эти анализы включают растворимость, проницаемость, ингибирование CYP450, ингибирование hERG-канала и метаболическую стабильность *in vitro*. Этот анализ показал общий многообещающий профиль данного соединения. Соединение **57** продемонстрировало умеренную, но статистически значимую активность в ослаблении артериальной гипертензии при самой высокой испытанной дозе – 40 мг/кг.

В том же году Фанг и его коллеги предложили синтез 3-замещённого тетрагидроизохинолина [25]. В данном исследовании сообщается об идентификации нового класса мощных и селективных ингибиторов ROCK II на основе α -аминоанилидов связанных с тетрагидроизохинолином. В ходе молекулярного моделирования было предположено, что этот класс соединений, состоящий из гетероцикла, который связывается с шарнирным участком в АТФ-связывающем кармане ROCK-II, и амидной части на основе аминокислот, которая, как ожидается, будет связываться с АТФ-связывающим карманом ROCK II. Синтез наиболее эффективного соединения представлен на схеме 9.

Соединение **60** было получено по реакции Пикте – Шпенглера, между *L*-3-метоксифенилаланином **58** и карбальдегидом **59** в присутствии соляной кислоты. Далее соединение **60** обработали $(\text{Boc})_2\text{O}$ в присутствии гидроксида натрия. После провели реакцию амидирования между соединениями **61** и **62** в присутствии HATU в качестве катализатора, DIPEA в качестве основания и DMF в качестве растворителя с получением соединения **63**. Далее с соединения **63** была снята Boc защитная группа. На последней стадии, была проведена реакция Сузуки – Мияуры между соединениями **64** и **36** с получением соединения **65**.

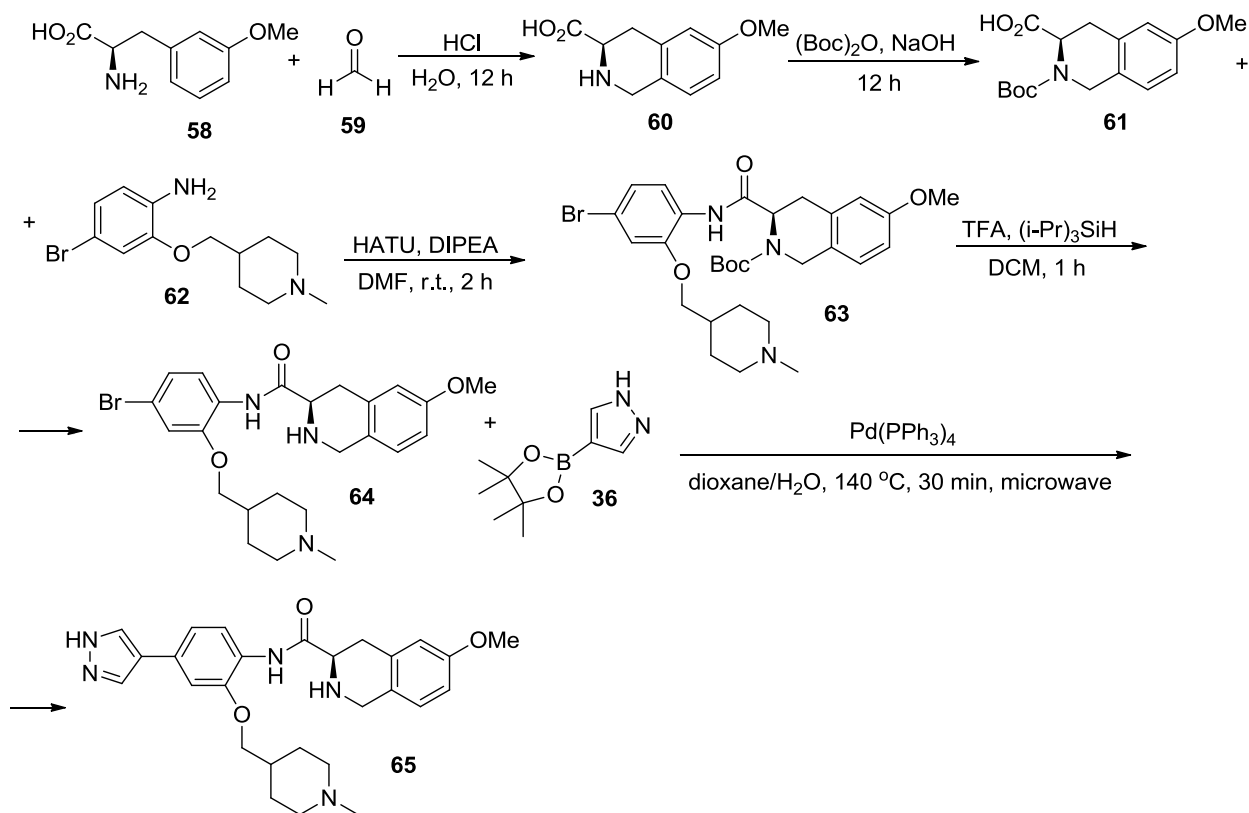


Схема 9 – Синтез соединения **65**

Соединение **65**, имело субнанолярную активность по отношению к ROCK-II ($\text{IC}_{50} < 1\text{ нМ}$), высокую селективность по отношению к PKA (>5000 раз), хорошую клеточную активность ($\text{IC}_{50} = 51\text{ нМ}$), а также хорошую микросомальную стабильность. Для изучения селективности ингибитора ROCK II на основе тетрагидроизохинолина, соединение **65** было подвергнуто

встречному скринингу по отношению к нескольким протеинкиназам, отличным от PKA. Соединение **65** в целом было неактивно в отношении JNK3 и p38. Селективность против MRCKR (принадлежащего к тому же семейству киназ, что и ROCK) была ниже, но все же хорошей (>55 раз). Скорость попадания оффтаргета всего 1,6% (7 из 442), что делает это соединение селективным АТФ-конкурентным ингибитором ROCK II.

При ингибировании ROCK II, параллельно может идти ингибирование таких киназ, как: PKA, MRCKa, JNK3 и p38, что является нежелательными процессами. С целью создать селективный ингибитор ROCK II, Ин и его команда, синтезировали и исследовали соединения на основе бензотиазола [26]. Синтез наиболее эффективных соединений представлен на схеме 10.

Синтез серии соединения **74a-h** начался с ацилирования анилина **66** этилоксалилхлоридом **67** в присутствии пиридина и DCM при 0 °С с получением соединения **68**. Соединение **69** получили путём обработки соединения **68** TFA в микроволновой печи при 160 °С, которое впоследствии подвергли щёлочному гидролизу, в присутствии гидроксида натрия, метанола и воды. Полученную кислоту **70** обработали оксалилхлоридом, а затем провели реакцию амидирования с соединением **72** в присутствии пиридина в качестве основания и DCM в качестве растворителя. На последней стадии была проведена реакция Сузуки – Мияура между полученным ранее амидом **73** и соединением **36** с получением конечного продукта **74**.

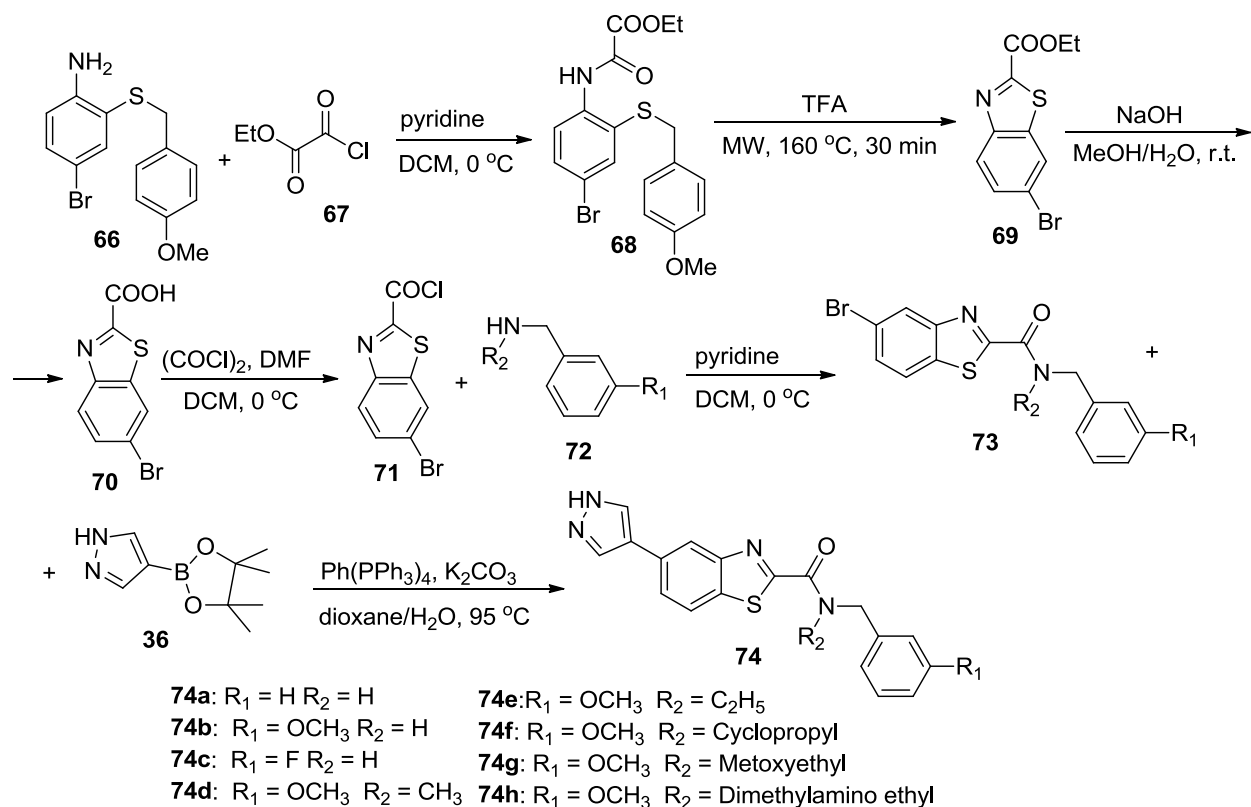


Схема 10 – Синтез соединений **74a-h**

Соединение **74h** показало отличное ингибирование как в ферментативном, так и в клеточном анализе (IC₅₀: 0.4 нМ и <6 нМ соответственно) и хорошую селективность в отношении РКА (>100 раз). Фармакокинетические свойства указывали на то, что **74h** будет иметь минимальное системное воздействие, что, потенциально, делает его хорошим кандидатом для местного применения, например в терапии глаукомы. Для оценки селективности ингибиторов на основе бензотиазола по отношению к другим киназам соединение **74h** было подвергнуто встречному скринингу по нескольким родственным или нежелательным киназам, таким как MRCK α , JNK3 и p38. Данные скрининга показали, что соединение **74h** селективно ингибировало ROCK II (IC₅₀(нМ): ROCK II – 0.4; РКА – 45; ROCK I – 3.5; MRCK α – 247; JNK3 – 13670; p38 - <20000).

В 2020 году, Shuchao Ma совместно с коллегами сообщили о синтезе 2,4,5-замещённых тиазолов [27]. Ранее сообщалось о мощном и селективном ингибиторе ROCK II, селективность полученного соединения была

приписана аминоалкильной боковой цепи, однако высокий клиренс и низкая биодоступность не позволяют использовать это соединение перорально [28]. Соединение CID5056270 (Схема 14), проявляло мощную ингибирующую активность ROCK II, но имело большой сдвиг в клеточной активности [29]. Для дальнейшей оптимизации этих соединений были разработаны 2-амидо-4-арил-5-аминоалкил-тиазолы.

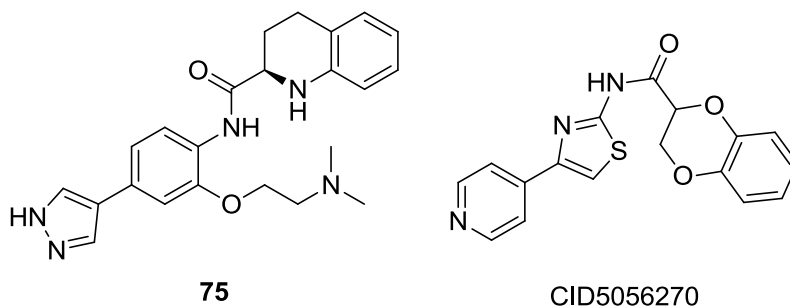


Схема 11 – Соединения **75** и CID5056270

Синтез соединения **81** представлен на схеме 15. На первой стадии было проведено бромирование кетона **76** в присутствии уксусной кислоты. Далее α -бромкетон **77** прореагировал с тиомочевинной с получением соединения **78**, которое обработали кислотой, в присутствии EDCI. После, соединение **79** обрабатывали вторичным амином **80**, с получением конечного продукта **81**.

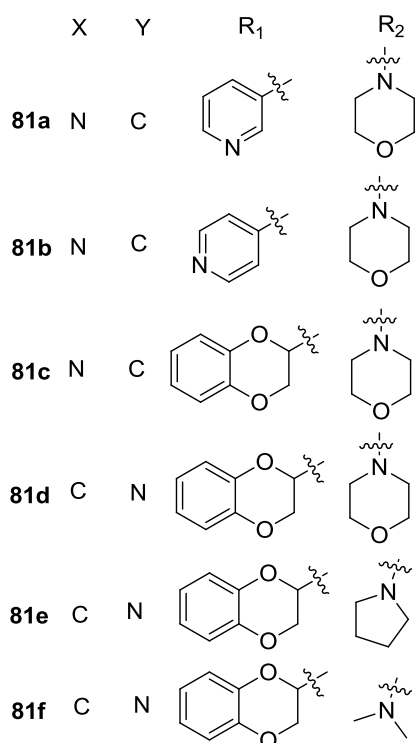
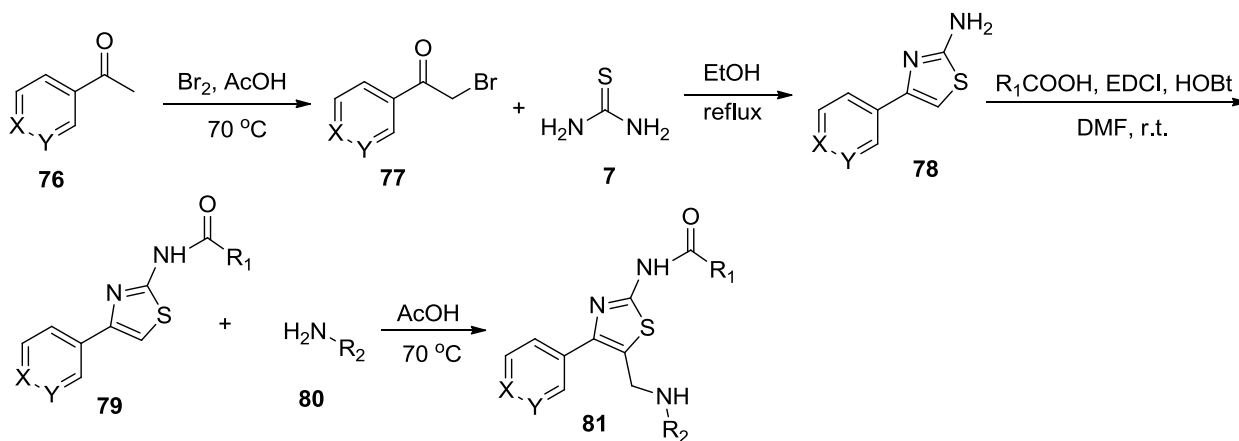


Схема 12 – Синтез соединений **81a-f**

Ингибирующую активность соединений по отношению к ROCK II проверяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Все соединения первоначально оценивали на процентное ингибирование против ROCK II. Соединения с хорошим ингибированием ROCK II, были дополнительно оценены на полных графиках концентрации-реакции для определения их IC₅₀. Соединение **81c** показало лучшую ингибирующую активность ROCK II с IC₅₀ равной 20 нМ.

1.3 Ингибиторы смешанного типа

Так как ингибиторы ROCK вызывают снижение артериального давления [30], то использование их для системного лечения не по сердечно-сосудистым заболеваниям является проблематичным, ввиду побочных эффектов. Даже при местном применении, ингибиторы ROCK не лишены побочных эффектов. В контексте офтальмологии распространенным побочным эффектом местного применения ингибиторов ROCK является легкая или тяжелая гиперемия конъюнктивы [31,32], как следствие, большинство существующих ROCK ингибиторов имеют узко направленный профиль. Учитывая потенциал ингибиторов ROCK, снижение побочных эффектов при их использовании, может послужить толчком, к их использованию в качестве лекарственных средств. С целью создать ингибитор ROCK лишённый типичных побочных эффектов, Боланд и его коллеги предложили синтез мягкого ингибитора ROCK на основе 3-[2-(Аминометил)-5-[(пиридин-4-ил)карбамоил]фенил] бензоата [33]. В качестве отправной точки, было взято соединение **82** [34], так как это соединение обладает хорошей субнаномолярной активностью, а также хорошей селективностью по отношению к родственным киназам, таким как PKA и AKT1. Кристаллическая структура соединения **82** выявила важность пиридинового азота и первичного амина, обеспечивающих субнаномолярную активность ингибитора. В ходе дальнейшего исследования соединения **82** было выявлено, что введение сложноэфирных боковых цепей обеспечивает механизм инактивации полученных производных, делая их потенциальными субстратами для эстераз.

Синтез наиболее успешного соединения **95** представлен на схеме 11. На первой стадии была проведена реакция этерификации по Фишеру между соединением **76** и метанолом с последующим радикальным бромированием бензильной группы, что в итоге дало промежуточный бензилбромид **78**. Это соединение было преобразовано в Вос защищенный бензиламин **81** через

последовательность из трех стадий, включающую замещение брома в соединении **78** на $(\text{Ooc})_2\text{NH}$, селективное удаление одной группы Ooc трифторуксусной кислотой и, наконец, гидролиз метилового эфира в основных условиях. Полученная кислота **81** реагирует с 3-фтор-4-аминопиридином **82**, в смеси HATU/DMAP используемых в качестве связующих агентов для получения промежуточного продукта **83**. Далее, к соединению **83** добавили бор производное бензойной кислоты **84** и по реакции Сузуки получили соединение **85**. Соединение **87** получали путём проведения реакции этерификации между соединениями **85** и **86**. На последней стадии с помощью соляной кислоты была снята Ooc защитная группа соединения **87**, что дало конечный продукт **88**.

Состояние фосфорилирования MLC является прямым маркером ферментативной активности ROCK в клетках. Оценка выбранного соединения **95** в клеточном анализе фосфорилирования MLC подтвердила его функциональную эффективность. Соединение **95** имело субнанолярную активность по отношению к ROCK II ($\text{IC}_{50} = 16 \text{ нМ}$), было сопоставимо с соединением **82** ($\text{IC}_{50} = 6.1 \text{ нМ}$) и показало лучшую активность, нежели Y-27632 ($\text{IC}_{50} = 200 \text{ нМ}$). Концепция мягкого препарата предполагает превращение исходного соединения в неактивный метаболит. Этот аспект был первоначально оценен путем оценки плазменной стабильности. Соединение **95** обладало малым периодом полураспада ($t_{1/2} \text{ Plasma} < 5 \text{ мин}$) при этом в фосфатно-буферном физиологическом растворе полураспад не наблюдался.

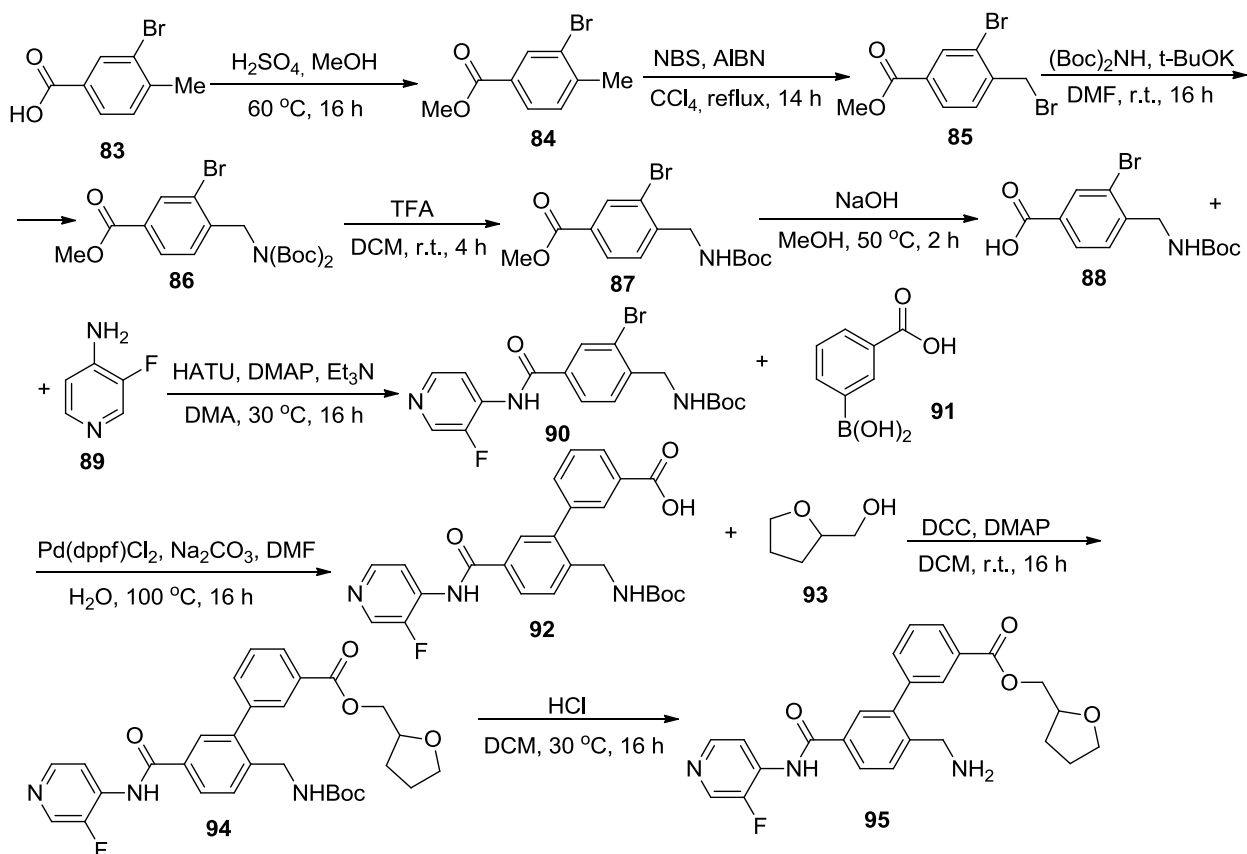


Схема 13 – Синтез соединения **95**

Соединение **95** было оценено *in vivo*, так как оно сочетало высокую эффективность с быстрым гидролизом в плазме. Для исследования был выбран нормотензивный Ново-Зеландский белый кролик. Выбор пал на эту животную модель, так как она соответствует потенциальному показанию к применению ингибиторов ROCK, а также позволяет легко контролировать ожидаемый побочный эффект – гиперемия конъюнктивы. Гидролитическую активность тканей глаза кролика оценивали путем инкубации соединения **95** в концентрации 20 мкМ. Удельную гидролитическую активность рассчитывали для каждой ткани, путем нормализации наблюдаемой скорости деградации по отношению к массе ткани. Несмотря на свою метаболически лабильную природу, соединение **95** имело ярко выраженный ВГД-понижающий эффект при местном введении нормотензивным кроликам. Значительное снижение ВГД по сравнению с контралатеральным глазом, обработанным транспортным средством, наблюдалось в течение шести часов

после введения препарата. Самое высокое среднее снижение ВГД было достигнуто через 3 ч после инстилляций и составило 28.7% от исходного уровня (3.85 мм рт.ст.). В ходе эксперимента не было замечено никакой явной гиперемии, что позволяет предположить, что мягкие ингибиторы ROCK, такие как соединение **95**, потенциально могут снижать ВГД без типичных для ROCK ингибиторов побочных эффектов.

В статье [35] представлен синтез замещённого тиено[2, 3-*d*] пиримидин-4 (3*H*) -она. Для начала был проведён виртуальный скрининг на основе молекулярного докинга по химической базе данных, который дал хит – соединение 3-(3-метоксибензил)-7-(1*H*-индазол-5-Ил) хиназолин-4(3*H*)-он. Этот комплекс, показал хорошую ингибирующую активность в отношении ROCK (ROCK- I: 3.106 нМ и ROCK- II: 0.088 нМ). Затем осуществили структурную оптимизацию, чтобы улучшить эффективность соединения. Структурные модификации были сосредоточены в трех областях: хиназолин-4(3*H*)-он (область I), индазол (область II) и метоксибензол (область III).

На схеме 12 представлен синтез наиболее эффективных соединений данной статьи. Бромирование соединения **96** под действием уксусной кислоты дало продукт **97**. Далее соединение **97** прореагировало с 3-метилбромметоксибензолом **98** в DMF в присутствии карбоната калия с получением соединения **99**. Конечный продукт **101** был получен с помощью реакции Сузуки – Мияуры между соединениями **99** и **100**, в качестве растворителя выступала смесь диоксана с водой (5/1), в качестве катализатора тетракис(трифенилфосфин)палладия, в качестве основания карбонат цезия.

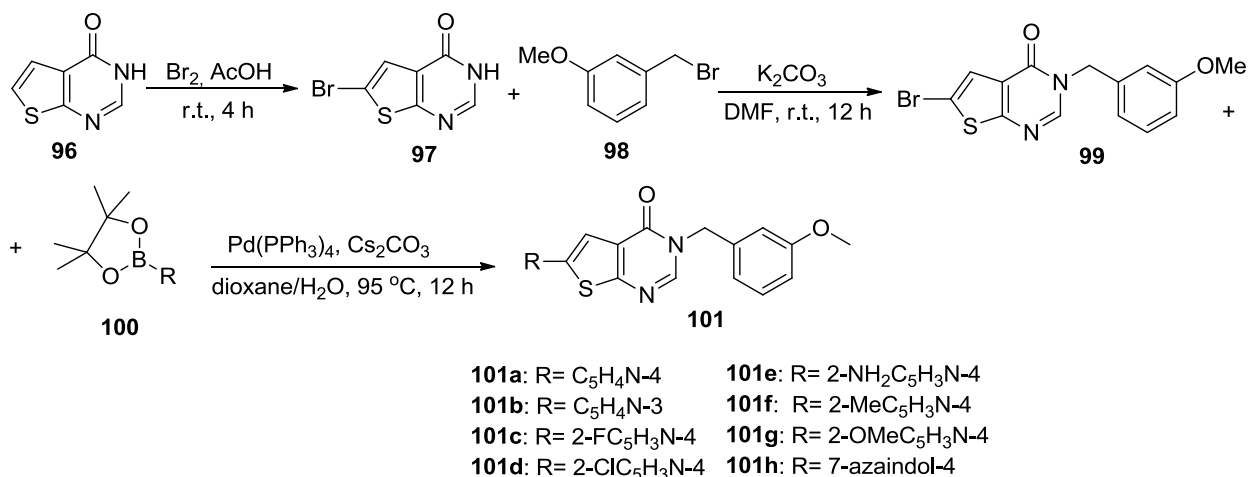


Схема 14 – Получение соединений **101a-h**

Все полученные соединения проявляли хорошую ингибирующую активность. Соединение **101h** показало лучшие значения: (IC₅₀ = 0.004 нМ и 0.001 нМ) по отношению к ROCK I и ROCK II соответственно, поэтому все дальнейшие исследования проводились только с ним. Для изучения активности использовали Вест-блоттинговый анализ соединения **101h** в интактных клетках. Для анализа были использованы клетки 293Т, и был измерен уровень фосфорилирования белка MYPT1. В ходе исследования было выявлено, что **101h** значительно снижал уровень фосфорилирования MYPT1, при этом не влияя на уровень MYPT1. Поскольку MYPT1 является распространенным субстратом ROCK I и ROCK II соединение **101h** обладает ингибирующим действием как против ROCK I, так и против ROCK II. Ожидается, что снижение уровня фосфорилирования MYPT1 происходит из-за совместного ингибирующего действия соединения **101h** против ROCK I и ROCK II. Также была проверена способность соединения **101h** индуцировать изменения в миграции клеток, для этого были использованы клетки MDA-MB-231. В ходе исследований было выявлено, что **101h** значительно предотвращал миграцию клеток по сравнению с контрольной группой (рисунок 2). Исследователи также отслеживали форму клеток и обнаружили, что большинство клеток MDA-MB-231 проявляли веретенообразную морфологию по краям после обработки соединением **101h** (рисунок 3).

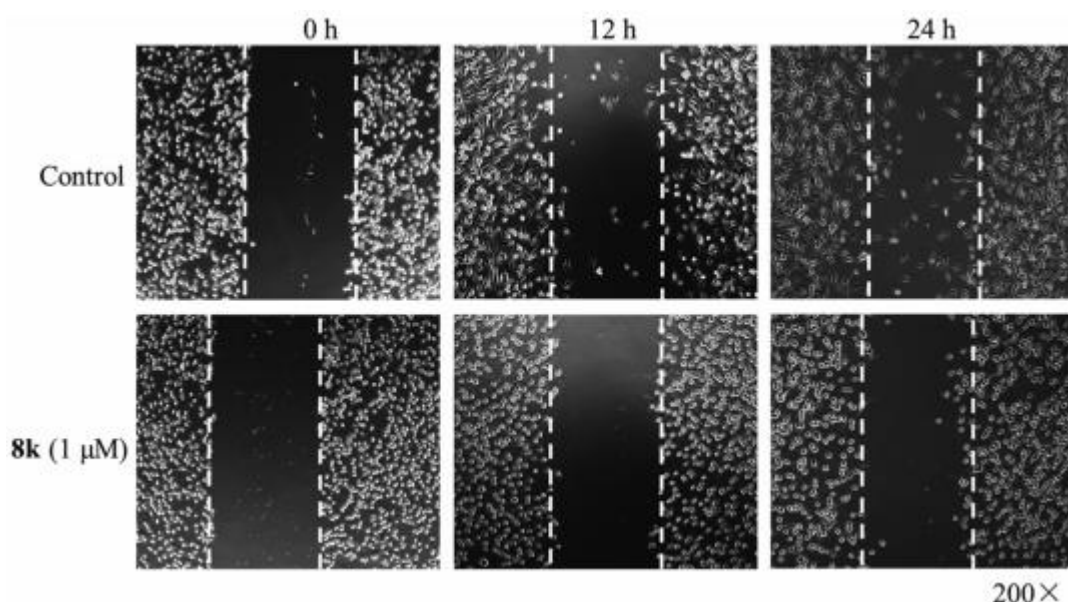


Рисунок 2 – Ингибирование миграции клеток MDA-MB-231 соединением **101h** *in vitro*

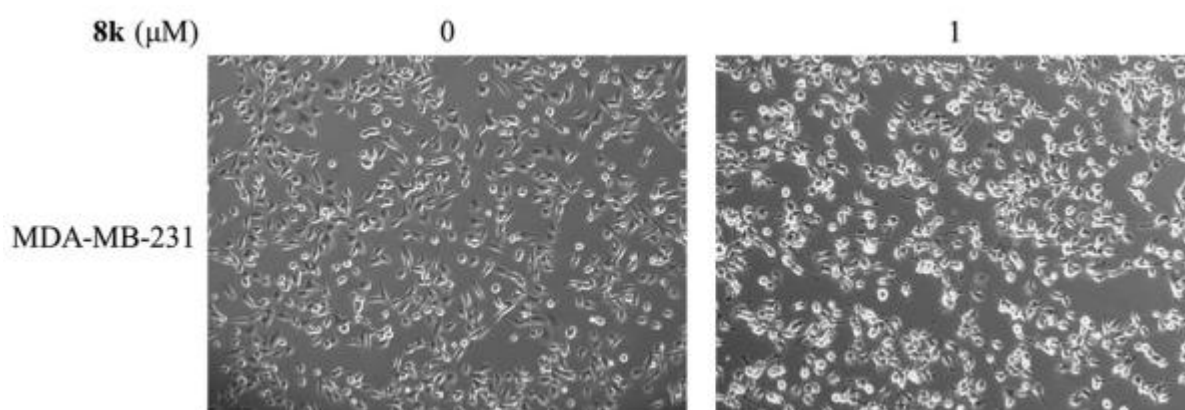


Рисунок 3 – Морфология клеток MDA-MB-231 спустя час после обработки 1 нМ соединением **101h**

В следующей работе представлен синтез ингибиторов ROCK на основе производных фенилпиразолов [36]. Исходное соединение **102** было идентифицировано с помощью внутреннего интеллектуального анализа данных rho-киназы. Соединение **102** представляло собой двойной ингибитор ROCK I/II, однако оно проявляло нежелательную киназную активность. Было выдвинуто предположение, что оксазольная часть, присутствующая в молекуле, является связующим звеном с нежелательными киназами. Замена оксазола на пиразол, который был успешно использован в качестве связующего шарнира в других работах [37], привела к образованию

анилинового амида, который обладал лучшей селективностью, нежели соединение **102** (рис. 4). Дальнейшие модификации соединения **103**, привели исследователей к соединению **102**, синтез которого представлен на схеме 13.

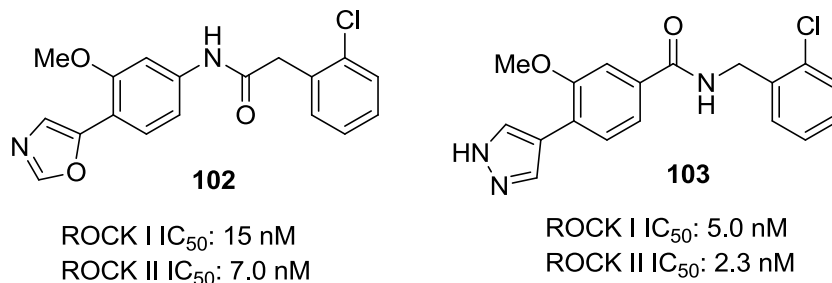


Рисунок 4 – Соединения **102** и **103** и их селективность в отношении к ROCK

На первой стадии была проведена реакция Сузуки – Мияуры между борным эфиром имидазола **104** и бромпроизводным анилина **105** с получением замещённого фенилпиразола **106**. Далее была проведена реакция амидирования между соединением **106** и аминокислотой **107**. На последней стадии произошло удаление Boc защитных групп с получением соединения **109**.

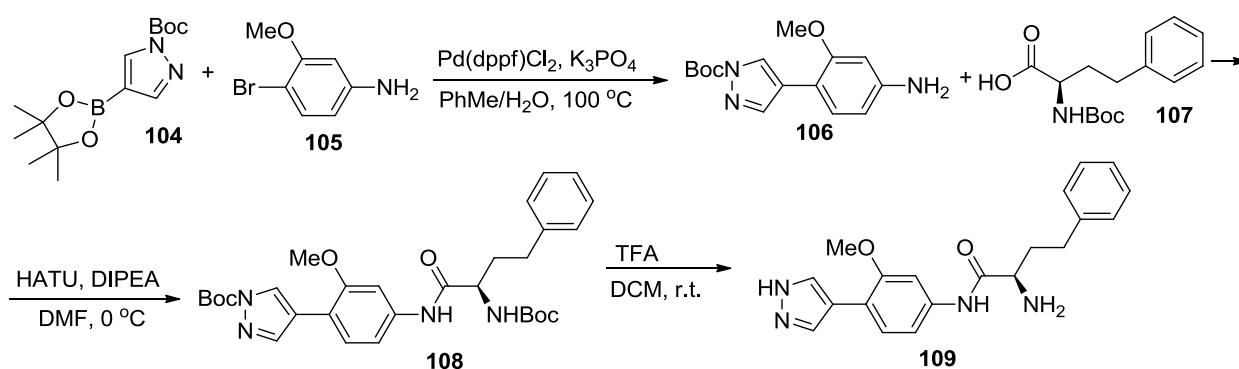


Схема 15 – Синтез соединения **109**

Соединение **109** обладало субнанолярной активностью равной (IC₅₀ = 7.2 нМ и 5.4 нМ) по отношению к ROCK I и ROCK II соответственно, а

также имело хорошую селективность кинома, метаболическую стабильность и РАМРА проницаемость как при рН равном 5.5, так и при рН равном 7.4. С целью оценить влияние на артериальное давление, соединение **109** было исследовано на телеметризованных мышах в дозировке 1 и 10 мпк. Снижение среднего артериального давления наблюдалось при обеих дозах препарата -9 мм рт.ст. (-8%) и -11 мм рт. ст. (-10%) соответственно. Продолжительность эффектов длилась 6-8 ч после дозирования.

Ремоделирование актина, которое регулируется ROCK, важно для подвижности и инвазии клеток, и поэтому ингибирование активности полимеризации актина через ингибирование киназной активности ROCK может быть терапевтической стратегией для ингибирования метастазирования рака [38,39]. В докладе Рейбена и соавторов было продемонстрировано, что путь ROCK I/II также играет важную роль в миелопролиферации [40]. В статье показано, что путь ROCK конститутивно активируется в клеточных линиях, содержащих онкогенные FLT3, BCR-ABL и KIT. Интересно, что выживаемость мышей, с пересаженными 32D клетками, несущими клетки KITD814V или клетки FLT3N51, может быть продлена при лечении ингибиторами ROCK, фасудилом или H-1152. В другой интересной работе Кимом и его коллегами было показано, что обработка макрофагов или дендритных клеток Y-27632 (ингибитор ROCK) увеличивает скорость поглощения раковых клеток [41]. Авторы также показали, что при фагоцитозе раковых клеток, дендритные клетки усиливают прайминг Т-клеток, что приводит к существенному снижению роста опухоли *in vivo*. Вышеупомянутые исследования, продемонстрировавшие важную роль ROCK как в миграции раковых клеток, так и в их выживании. Учитывая большой потенциал ингибиторов ROCK в терапии рака, Даял и соавторы предложили синтез производного 3H-пиразоло[4,3-f]хинолина, являющегося ингибитором ROCK смешанного типа [42]. Проведя виртуальный скрининг, было обнаружено, что бор может участвовать в ковалентных связях с

доменом киназ. На основе этого наблюдения был синтезирован ряд боркислото содержащих соединений 3*H*-пиразоло[4,3-*f*]хинолина.

Синтез соединения HSD1590, самого эффективного в данной статье, показан на схеме 14. Продукт был получен по реакции Поварова – Дёбнера путём смешения 1*H*-5-аминоиндазола **110**, 3,4-дизамещённого бензальдегида **111** и циклопентанона **112** при кипячении в присутствии соляной кислоты и этанола.

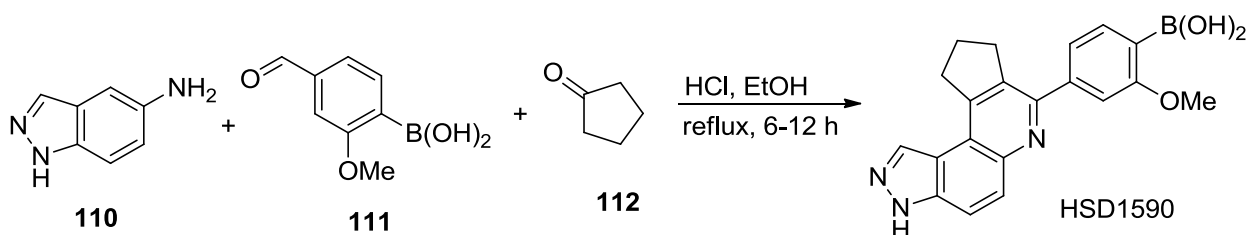


Схема 16 – Многокомпонентный синтез соединения HSD1590

Соединение HSD1590 показало хорошую субнаномолярную активность ($IC_{50} = 1.22$ нМ и 0.51 нМ) по отношению к ROCK I и ROCK II соответственно. Одна из мотиваций для развития ингибиторов ROCK, помимо того, что они используются в качестве терапии глаукомы [43] и инсульта [44], заключается в использовании этих соединений в качестве ингибиторов миграции раковых клеток. Миграция как ключевой фактор метастазирования и дистального рака трудно поддается лечению/уничтожению. Хотя ингибиторы ROCK сами по себе могут не обладать мощной цитотоксичностью в отношении большинства видов рака, они могут быть использованы в комбинации с противораковым агентом для повышения эффективности [45]. Садок и его коллеги предположили, что ингибирование ROCK снижает способность клеток меланомы эффективно колонизировать легкие, и что ингибиторы ROCK могут быть полезны при лечении метастазов [46]. Исследователи использовали клетки MDA-MB-231 для оценки, способности HSD1590 ингибировать миграцию. Клетки MDA-

MB-231 подвергали обработке 1 мкМ нетарсудила и HSD1590, позволяя мигрировать в течение 24 ч. Было замечено, что нетарсудил не ингибирует миграцию, в то время как HSD1590 продемонстрировал сильное ослабление миграции. Чтобы убедиться, что торможение миграции не было вызвано гибелью клеток, были проведены анализы жизнеспособности. Спустя 12 ч и концентрации лиганда до 5 мкМ, клетки MDA-MB-231 продемонстрировали почти 80% жизнеспособности, что свидетельствует о том, что наблюдаемое ингибирование миграции (даже при низкой концентрации 1 мкМ) обусловлено не гибелью клеток, а ингибированием миграции живых клеток. Даже через 24 ч и дозе в 10 мкМ HSD1590 давало общую жизнеспособность 63%. Это резко контрастирует с обработанными нетарсудилом клетками, которые демонстрировали почти полную потерю жизнеспособности через 12 ч.

2 Обсуждение результатов

Пиридин содержащий *rap*-ROCK ингибитор - Y-27632 (рисунок 4) является одним из наиболее цитируемых ингибиторов ROCK, с умеренной ингибирующей активностью ($IC_{50} = 46$ нМ ROCK I и 61 нМ ROCK II). В ходе изучения механизма связывания Y-27632 в киназном домене ROCK, было установлено, что ключевая водородная связь образуется между пиридиновым атомом азота Y-27632 и амидным атомом азота остатка метионина (Met156).

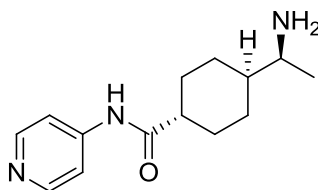


Рисунок 4 – Ингибитор Rho-киназы Y-27632

С целью создать новый, не цитотоксичный и высоко активный ингибитор был произведён молекулярный докинг, в ходе которого было выявлено, что тиазольный скаффолд с пиридином в 4 положении и замещённым амином во 2 положении является перспективным, ввиду его хорошей ингибирующей активности (рисунок 5). Пиридиновый фрагмент нужен для ключевого связывания, обуславливающего ингибирование, с остатком метионина (Met156), тиазольный фрагмент, для достижения желаемой компланарности пиридинового и тиазольного колец, обеспечивающих оптимальное связывание активного сайта киназы, пиперазиновый фрагмент для усиления активности соединения, за счёт образования водородной связи с Asp176.

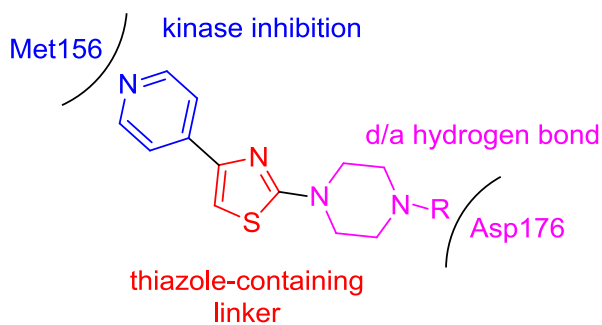


Рисунок 5 – Конструирование лиганда

Поскольку многие киназы в основном существуют в инактивированном состоянии и для перехода их в активированное состояние требуют воздействия на них специфичного агента, было предположено, что соединения, которые предотвращают эту активацию, могут обеспечить селективное ингибирование киназ. Далее будет рассмотрен синтез 2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазолов, а также результаты ингибирования ROCK I *in vitro*.

2.1 Синтез ингибиторов

Для планирования синтеза найденных лигандов, нами был применён метод ретросинтетического анализа. Ключевые синтоны, полученные в ходе расщепления тиазольного цикла представлены на схеме 17:

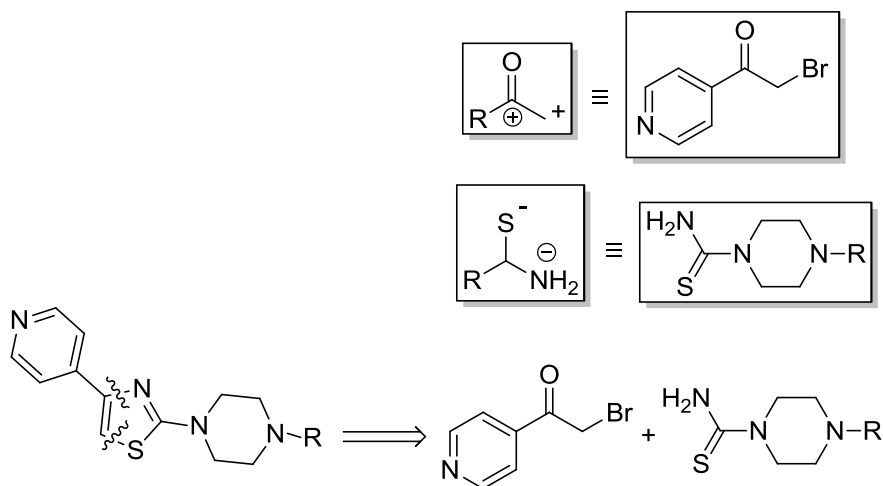


Схема 17 – Ретросинтетический анализ 2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазола

Из приведённой выше схемы видно, что ключевой стадией является сборка тиазолов по методу Ганча.

Синтез *N'*-замещённой тиомочевины представлен на схеме 18. На первой стадии получали *N*-циано-*N'*-замещённый пиперазин, путём нуклеофильного замещения между *N'*-замещённым пиперазином и бромцианом в присутствии DIPEA в качестве основания в дихлорметане. Далее, полученное соединение **114** обработали сероводородом в присутствии триэтиламина в качестве основания в пиридине с получением конечного соединения **115**.

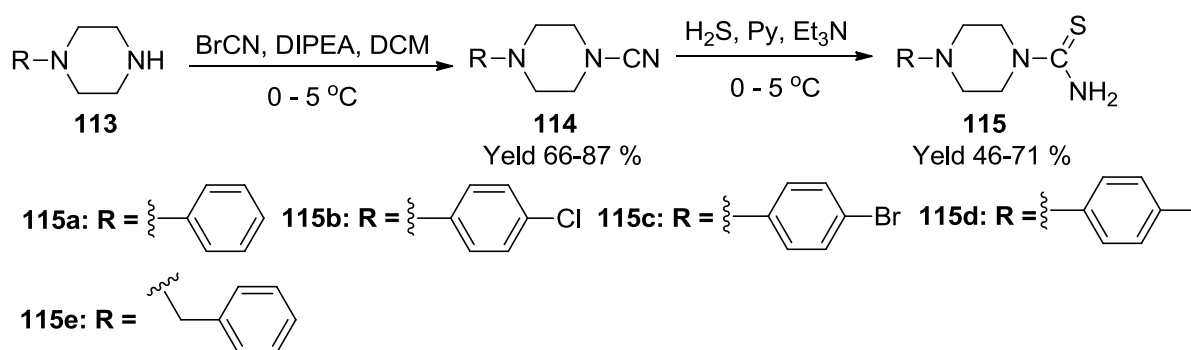


Схема 18 – Синтез серии *N*-замещённых тиомочевин **115a-e**

2-бromo-1-(пиридин-4-ил)этан-1-он гидробромид **117** получали путём обработки 4-ацетилпиридина бромом, в присутствии уксусной кислоты и бромоводорода. Синтез представлен на схеме 19:

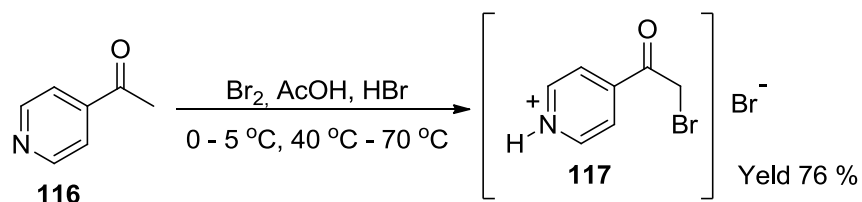


Схема 19 – Синтез 2-бromo-1-(пиридин-4-ил)этан-1-он гидробромида **117**

Финальная сборка тиазольного кольца (схема 20) проводилась по методу Ганча, путём кипячения соединений **115a-e** и **117** в этаноле, с последующей обработкой раствором гидрокарбоната натрия.

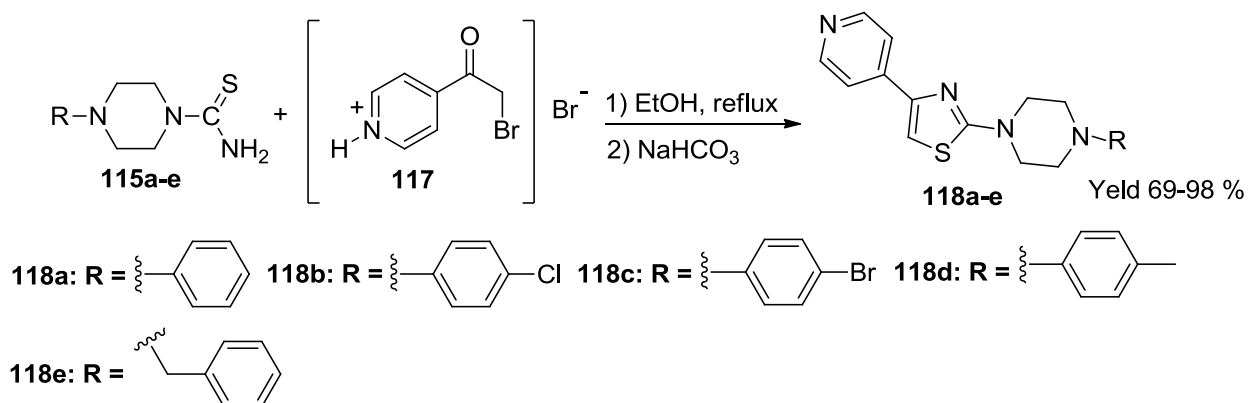


Схема 20 – Синтез замещённых 2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазолов **118a-e**

Строение всех синтезированных лигандов подтверждено методом ЯМР ^1H и ^{13}C , а также двумерного эксперимента COSY. На рисунках 6 - 8 приведены примеры наблюдаемых спектров ЯМР.

В спектрах ЯМР ^1H (рисунок 6) характерной особенностью является наличие синглета тиазольного протона Н-4 в области 7.84 м.д. В соединении **118c** наличие пиридинового фрагмента подтверждается дублетом в области 8.65 м.д. и мультиплетом в области 7.97 – 7.92 м.д. Бензольный фрагмент подтверждается двумя дублетами в областях 7.39 м.д. и 6.98 м.д. Наличие пипирезина подтверждается двумя мультиплетами в областях 3.67 – 3.60 м.д. и 3.35 – 3.29 м.д.

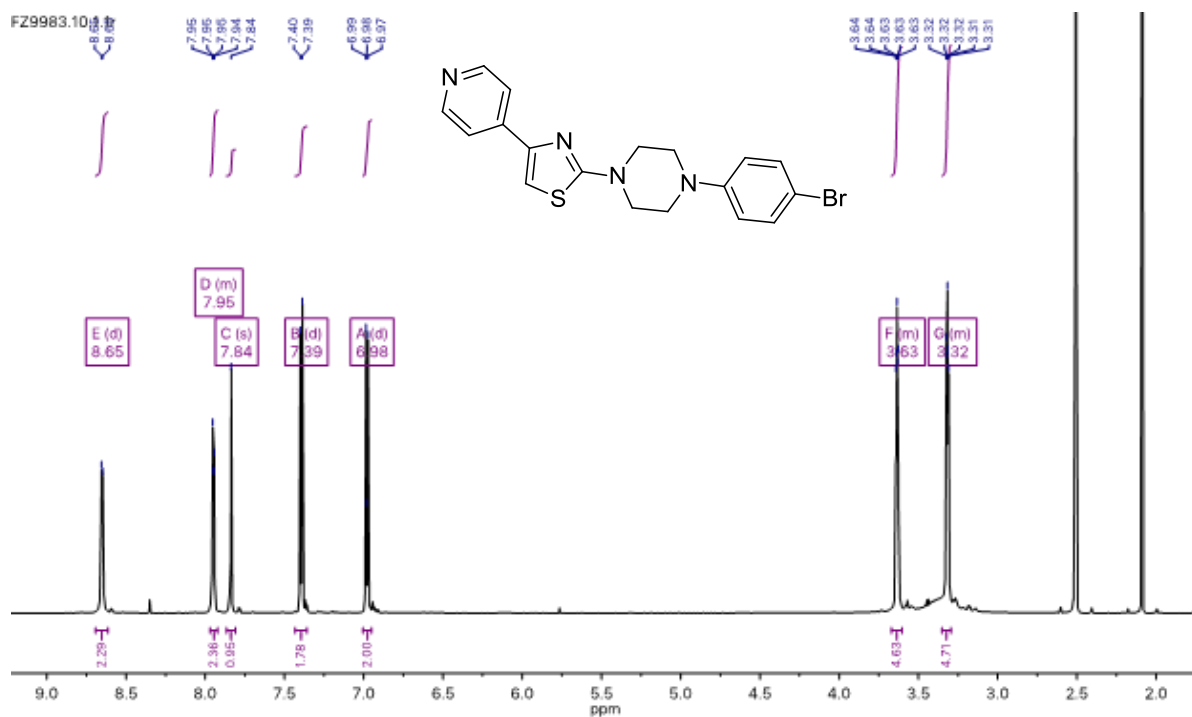


Рисунок 6 – ЯМР ^1H 2-(N'-(4-бромфенил)-пиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118c**

В спектрах ЯМР ^{13}C присутствуют характерные сигналы, отвечающие химическим сдвигам ядра углерода тиазольного цикла в области 172 – 171 М.Д.

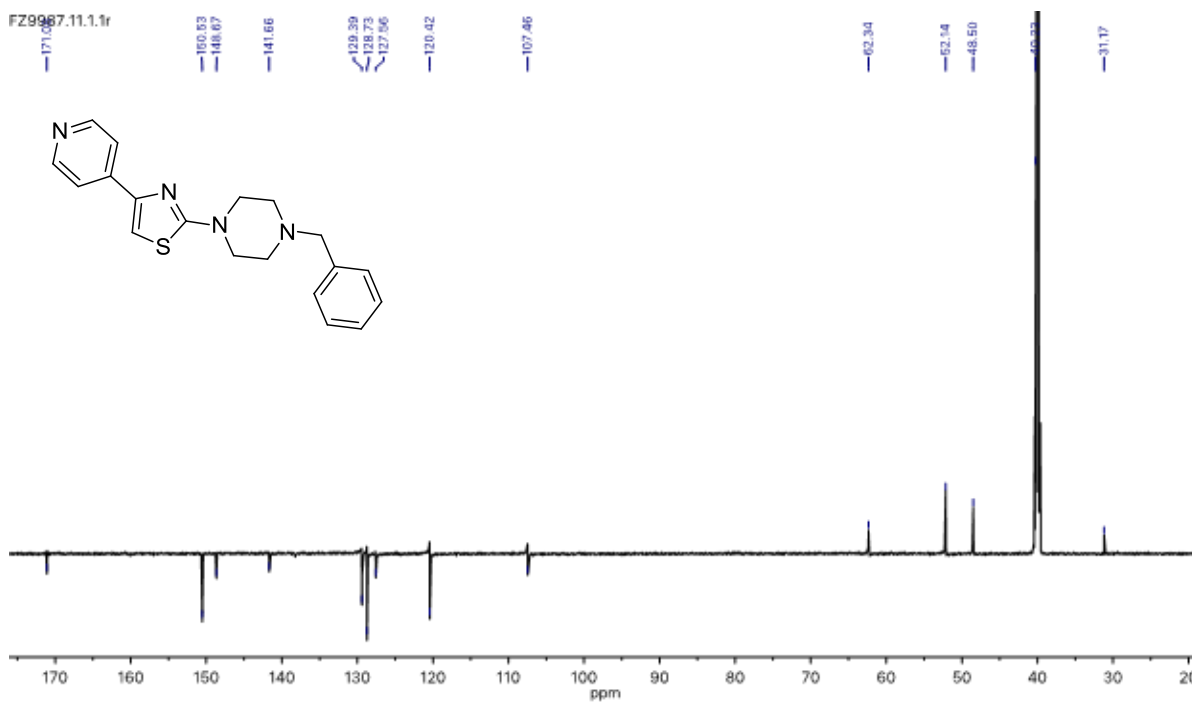


Рисунок 7 – ЯМР ^{13}C 2-(*N'*-бензилтиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118e**

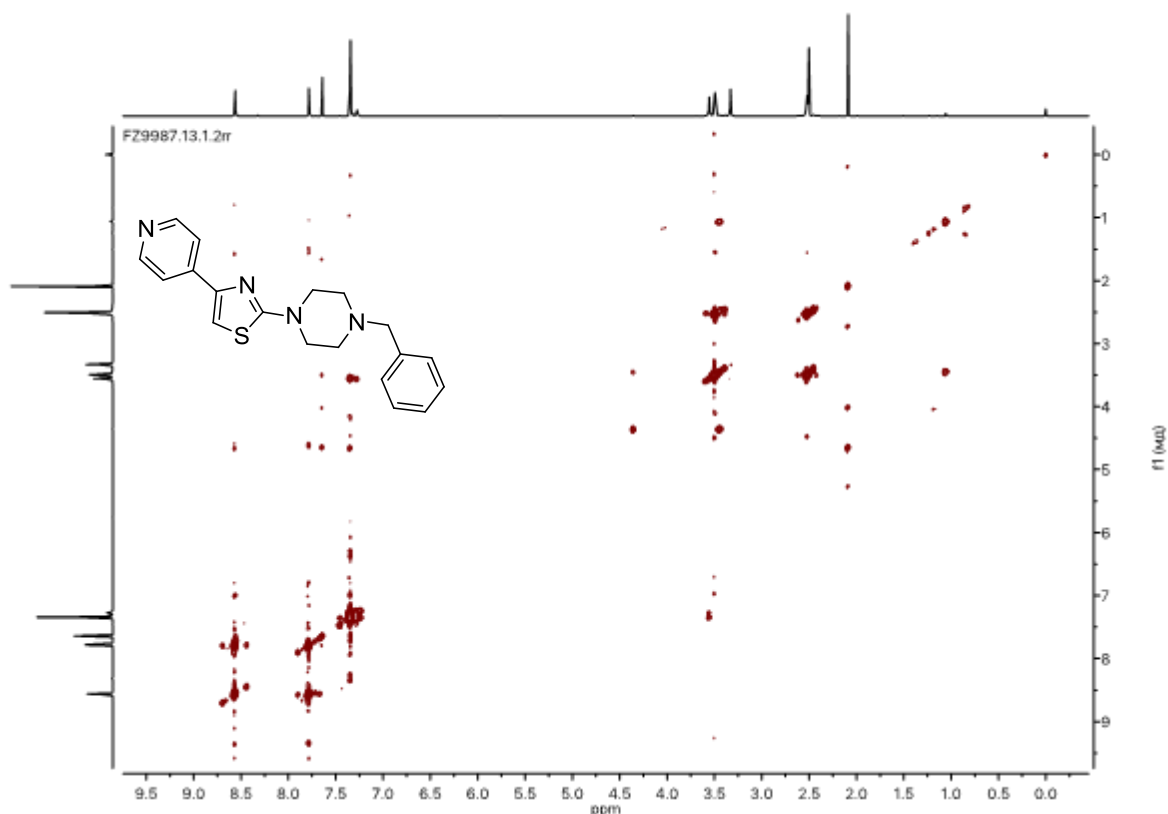


Рисунок 8 – ЯМР COSY (^1H - ^1H) спектр 2-(*N'*-бензилтиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118e**

2.2 Биологические испытания

Полученные соединения тестировали на ингибирующую активность по отношению к ROCK I (рисунок 9). В качестве теста использовался ADP-Glo™ киназный анализ [47]. Этот люминесцентный анализ, который обеспечивает универсальный, однородный и высокопроизводительный метод скрининга для измерения активности киназы, путем количественного определения АДФ вырабатываемого в ходе киназной реакции. Анализ обнаружения АДФ проводят в два этапа. Сначала, добавляется равный объем реагента ADP-Glo™, прекращающего киназную реакцию. Затем, добавляется реагент, для обнаружения и одновременного преобразования АДФ в АТФ, позволяющий измерять концентрацию вновь синтезированного АТФ с помощью реакции люциферазы/люциферина (рисунок 10).

Генерируемый свет измеряется с помощью люцинометра. Люминесценция может быть коррелирована с концентрациями АДФ с помощью кривой преобразования АТФ в АДФ.

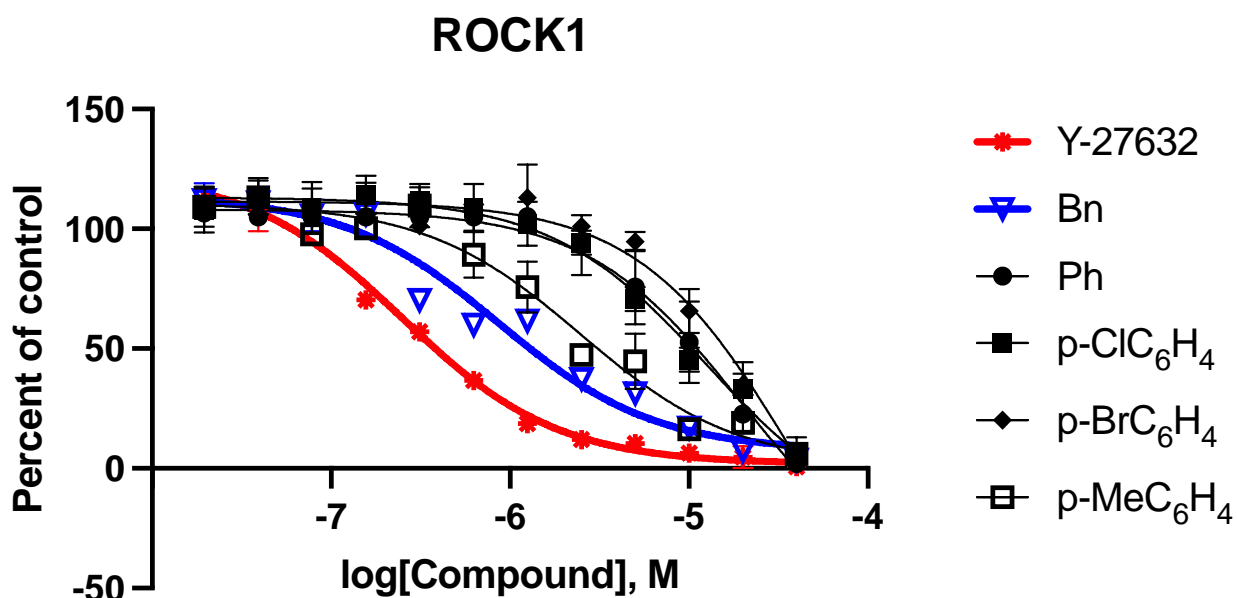


Рисунок 9 – Кривая доза-эффект для соединений **118a-e** и Y-27632

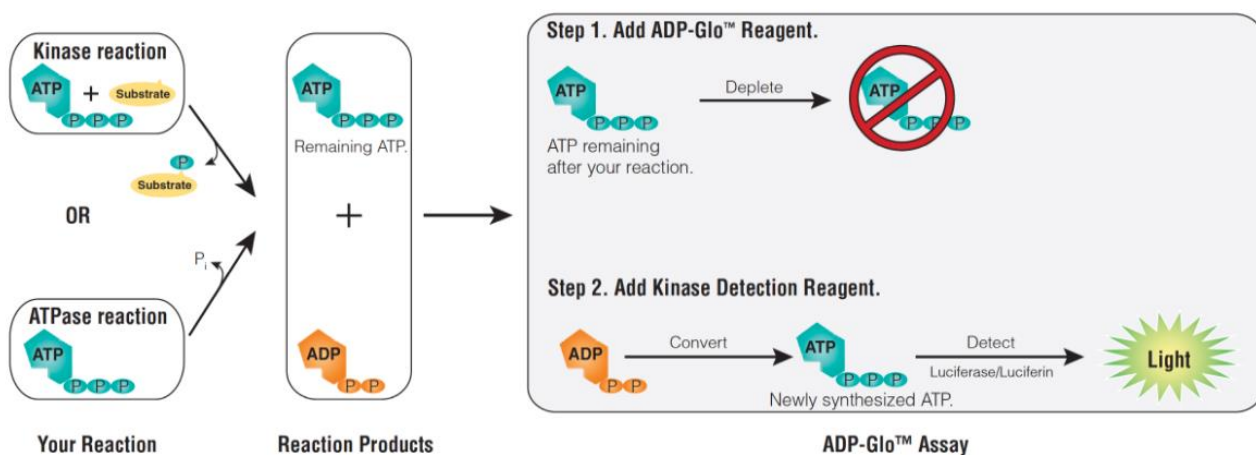
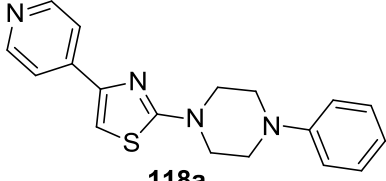
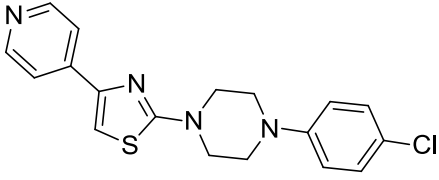
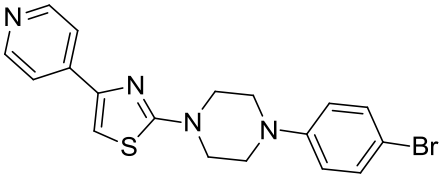
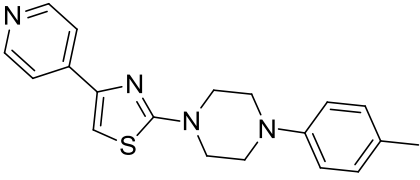
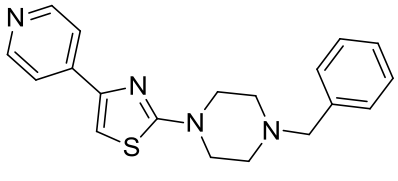
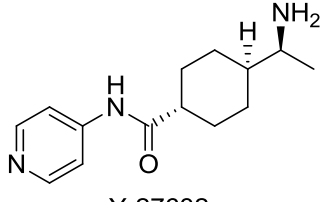


Рисунок 10 – ADP- Glo™ киназный анализ

По результатам проведённого теста по ингибированию ROCK I (таблица 1), было выявлено, что наилучшей ингибирующей активностью обладает соединение **118e** с показателем $IC_{50} = 934 \pm 340$ нМ. Это обусловлено наличием свободно вращающейся, липофильной бензильной группы, которая

взаимодействует с гидрофобным карманом в активном сайте киназы, тем самым улучшая связывание ингибитора.

Таблица 1 – Результаты теста по ингибированию ROCK I

Соединение	IC ₅₀ , нМ
 <p>118a</p>	>10000
 <p>118b</p>	>5000
 <p>118c</p>	>10000
 <p>118d</p>	2646±886
 <p>118e</p>	934±340
 <p>Y-27632</p>	255±49

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Ход реакций синтеза исходных соединений оценивали посредством тонкослойной хроматографии с применением пластинок с закрепленным слоем марки «Силуфол». В качестве элюентов применялась смесь растворителей следующего состава: гексан:этилацетат 3:7. Обнаружение веществ (проявление пятен) проводили в парах йода, в концентрированном растворе перманганата калия и при УФ-облучении.

Контроль за ходом реакций окисления и чистоту полученных соединений оценивали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent 1220 м» со спектрофотометрическим детектором. Колонка ZORBAX C-18, элюент: MeCN:H₂O в соотношении 8:2; скорость потока элюента 1 мл/мин. Обработка данных на выходе проводилась с применением программы OpenLab фирмы Agilent.

Данные ЯМР спектроскопии получены при комнатной температуре в дейтерированном диметилсульфоксиде (DMCO-*d*6) на спектрометре Bruker Asceud NEO с рабочей частотой 700 и 176 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно. Сигналы химических сдвигов ядер ¹H и ¹³C приведены в миллионных долях относительно сигнала тетраметилсилана.

ИК спектры записаны на приборе ФСМ-1201 в таблетках KBr.

Температуры плавления определены на нагревательном столике Boetius.

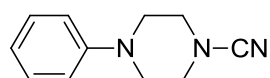
Все реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников и использовались без дальнейшей очистки.

3.2 Получение исходных соединений

Получение N-циано-N'-арилпиперазинов.

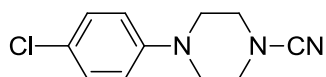
Общая методика получения [48].

3 M раствор бромциана в DCM (61.5 ммоль, 4.5 мл, 6.5 г.) прикапывали к раствору DIPEA (148 ммоль, 25.8 мл., 19 г.), N-арилпиперазина **113a-e** (49.2 ммоль) и 88 мл DCM при 0 °C, затем полученную смесь в течении часа перемешивали при комнатной температуре. После перемешивания, к реакционной смеси приливали 120 мл воды, а затем экстрагировали водную фазу DCM (4x80 мл). Органическую фазу промывали 30 мл Брайна и сушили Na₂SO₄. Растворитель отгоняли на роторном испарителе. Остаток использовали в дальнейших синтезах без дополнительной очистки.



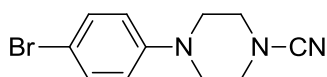
N'-фенил-*N*-цианопиперазин **114a** [48]

Выход 87 % (8 г.). Т. пл. = 51 – 52 °C.



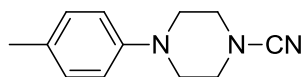
N'-(4-хлорфенил)-*N*-цианопиперазин **114b** [48]

Выход 72 % (7.9 г.). Т. пл. = 78 – 79 °C.



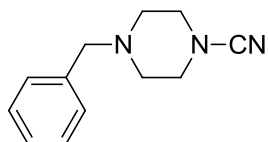
N'-(4-бромфенил)-*N*-цианопиперазин **114c** [48]

Выход 66 % (8.6 г.). Т. пл. = 96 – 97 °C.



N'-(4-метилфенил)-*N*-цианопиперазин **114d** [48]

Выход 76 % (7.5 г.). Т. пл. = 98 – 99 °C.



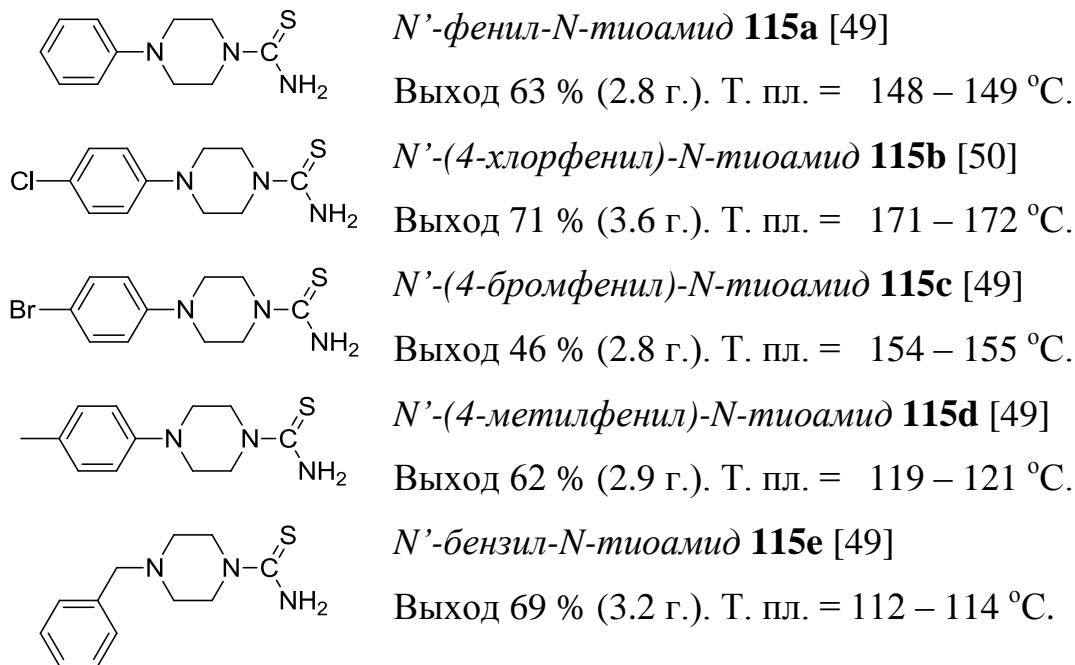
N'-бензил-*N*-цианопиперазин **114e** [48]

Выход 75 % (7.4 г.).

Получение N'-арилпиперазин-N-тиоамидов

Общая методика получения [49].

Смесь цианопиперазина **114a-e** (20 ммоль) и триэтиламина (40 ммоль, 4 г., 5.5 мл.) насыщали сероводородом в течении часа при 0 – 5 °С до появления ярко – изумрудной окраски. Спустя 24 часа смесь выливали в ледяную воду, полученный осадок отфильтровывали и сушили на воздухе.



Получение 2-бromo-1-(пиридин-4-ил)-этан-1-она [51].

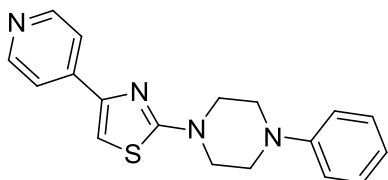
Бром (86.7 ммоль, 13.9 г., 4.5 мл.) прикапывали к раствору 4-ацетилпиридина **116** (82.5 ммоль, 10 г. 9.2 мл.) и 100 мл 30% HBr/AcOH при 0 – 5 °С. Смесь перемешивали в течении 1 часа при 40 °С, а затем ещё 1 час при 70 °С. После смесь охладили до 20 °С, разбавили 400 мл диэтилового эфира и перемешивали в течении получаса. Полученный осадок отфильтровывали и сушили под вакуумом. Получали порошок белого цвета с выходом 76 % (17.7 г.). Т. пл. = 198 – 200 °С.

3.3 Синтез целевых соединений

Производные 2-(N'-фенилпиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазола.

Общая методика получения

В колбе смешали 2-бromo-1-(пиридин-4-ил)-этан-1-она **117** (2 ммоль, 562 мг) и соответствующую тиомочевину **115a-e** (2 ммоль), полученную смесь кипятили в 50 мл этанола в течении суток. После кипячения к раствору добавили 5 мл водного раствора аммиака (25%) и разбавляли 25 мл воды и 15 мл Brine, выпавший осадок отфильтровывали и сушили под вакуумом.

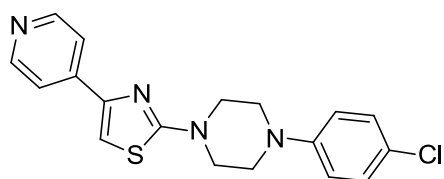


2-(*N'*-фенилпиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118a**

Выход: 69.2 %. Т. пл. = 125 – 127 °С. ВЭЖХ

(MeCN:H₂O – 8:2): 98.2 %. ИК-спектр (KBr) ν , см⁻¹: 3444, 2819, 1597, 1551, 1226, 1026, 763, 692, 526.

¹H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.63 – 8.55 (м, 2H), 7.83 – 7.78 (м, 2H), 7.69 (с, 1H), 7.29 – 7.22 (м, 2H), 7.04 – 6.99 (м, 2H), 3.66 – 3.61 (м, 4H), 3.32 – 3.29 (м, 4H). ¹³C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*₆) δ .

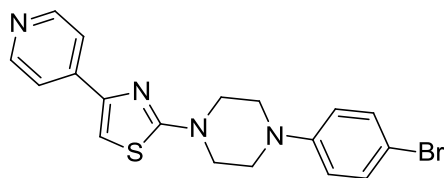


2-(*N'*-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118b**

Выход: 87.3 %. Т. пл. = 156 – 158 °С. ВЭЖХ

(MeCN:H₂O – 8:2): 98.1 %. ИК-спектр (KBr) ν , см⁻¹: 3452, 2833, 1597, 1547, 1230, 1030, 822, 692, 526.

¹H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.63 – 8.54 (м, 2H), 7.84 – 7.77 (м, 2H), 7.69 (с, 1H), 7.29 – 7.26 (м, 2H), 7.03 (дд, *J* = 9.0 Гц, 2H), 3.65 – 3.60 (м, 4H), 3.33 – 3.29 (м, 4H). ¹³C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*₆) δ .

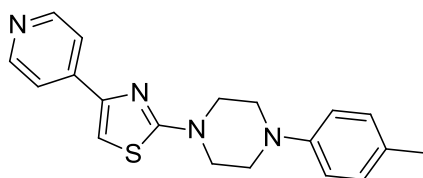


2-(*N'*-(4-бромфенил)пиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118c**

Выход: 98 %. Т. пл. = 173 – 175 °С. ВЭЖХ

(MeCN:H₂O – 8:2): 90.5 %. ИК-спектр (KBr) ν , см⁻¹: 3441, 2833, 1597, 1549, 1230, 1028, 818, 671, 521.

¹H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.65 (дд, *J* = 9.0 Гц, 2H), 7.97 – 7.92 (м, 2H), 7.84 (с, 1H), 7.39 (дд, *J* = 9.0 Гц, 2H), 6.98 (дд, *J* = 9.0 Гц, 2H), 3.67 – 3.60 (м, 4H), 3.35 – 3.29 (м, 4H). ¹³C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*₆) δ .

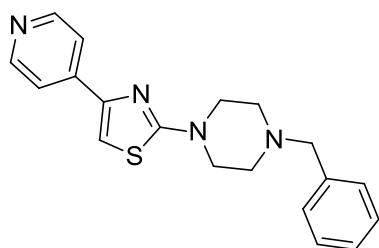


2-(*N'*-(4-метилфенил)пиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118d**

Выход: 97.6 %. Т. пл. = 145 – 147 °С. ВЭЖХ

(MeCN:H₂O – 8:2): 97.6 %. ИК-спектр (KBr) ν , см⁻¹: 3356, 2852, 1597, 1543, 1230, 1031, 808, 673, 524.

¹H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.63 – 8.54 (м, 2H), 7.84 – 7.77 (м, 2H), 7.69 (с, 1H), 7.07 (дд, J = 9.0 Гц, 2H), 6.92 (дд, J = 9.0 Гц, 2H), 3.65 – 3.59 (м, 4H), 3.27 – 3.21 (м, 4H), 2.22 (с, 3H). ¹³C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*₆) δ .



2-(*N'*-бензилпиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)-тиазол **118e**

Выход: 80.1 %. Т. пл. = 137 – 139 °С. ВЭЖХ

(MeCN:H₂O – 8:2): 97.7 %. ИК-спектр (KBr) ν , см⁻¹: 3445, 2833, 1595, 1527, 1227, 995, 774, 677, 559.

¹H ЯМР (700 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.60 – 8.53 (м, 2H), 7.80 – 7.75 (м, 2H), 7.64 (с, 1H), 7.37 – 7.31 (м, 4H), 7.30 – 7.24 (м, 1H), 3.55 (с, 2H), 3.49 (т, J = 5.0 Гц, 4H), 2.50 (квинт., J = 1.8 Гц, 4H). ¹³C ЯМР (176 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 171.1, 150.5, 148.7, 141.7, 129.4, 128.7, 127.6, 120.4, 107.5, 62.3, 52.1, 48.5, 31.2.

3.4 Ингибирование ROCK 1

Синтезированные соединения были протестированы в диапазоне концентраций 40 мкМ – 19.5 нМ с помощью набора ROCK 1 Kinase Enzyme System (Promega, USA) в соответствии с протоколом производителя [47].

Заключение

В данной работе была рассмотрена проблема синтеза ингибиторов rho-киназы. По результатам проведенного экспериментального исследования были синтезированы и изучены новые ингибиторы, обладающие хорошей ингибирующей активностью.

В литературном обзоре были рассмотрены различные методы получения и скаффолды, используемые при синтезе ингибиторов ROCK I, ROCK II и rap-ROCK.

В практической части была разработана методика получения лигандов, найденных с помощью молекулярного докинга, а также проведён синтез и тестирование ингибирующей активности по отношению к ROCK I этих лигандов.

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- В ходе изучения научной литературы, были выявлены методы синтеза ингибиторов ROCK на основе различных скаффолдов. Также было отмечено, что наличие бокового фрагмента, содержащего пиридиновый атом азота, является крайне важным для ингибиторов rho-киназы.

- С помощью молекулярного докинга, были подобраны соединения и была подготовлена методика их синтеза.

- По подготовленной нами методике, были синтезированы 2-амино-4-(пиридин-4-ил)-тиазолы с хорошими выходами 69 – 98 %, а также проведён тест на ингибирование ROCK I, по результатам которого было выявлено, что соединение **118e** обладает наилучшей ингибирующей активностью $IC_{50} = 934 \pm 340$ нМ.

- Соединение **118e** обладает хорошей ингибирующей активностью, и является перспективным для дальнейших исследований и модификаций.

Список используемой литературы

1. C. Hahmann. Rho-kinase inhibitors as therapeutics: from pan inhibition to isoform selectivity / C. Hahmann, T. Schroeter // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – Vol. 67. №2. – P. 171–177.
2. K. Riento. ROCKs: multifunctional kinases in cell behavior / K. Riento, A.J. Ridley // *Nature Rev. Mol. Cell. Biolog.* – 2003. – Vol. 4. №6. – P. 446–456.
3. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase / M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Boku et al. // *Science.* – 1999. – Vol. 285. №5429. – P. 895–898.
4. N. Sladojevic. ROCK as a therapeutic target for ischemic stroke / N. Sladojevic, N., B. Yu, G.K. Liao // *Exp. Rev. Neurotherap.* – 2017. – Vol. 17. №12. – P. 1167–1177.
5. C.M. Chong. ROCK in CNS: Different Roles of Isoforms and Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders / C.M. Chong, N. Ai, S M. Lee // *Curr. Drug Targets.* – 2017. – Vol. 18. №4. – P. 455–462.
6. L. Wei. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer / L. Wei, M. Surma, S. Shi, N. Lambert-Cheatham, J. Shi // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* – 2016. – Vol. 64. №4. – P. 259–278.
7. Discovery and optimization of indoles and 7-azaindoles as Rhokinase (ROCK) inhibitors (part-I) / S. Chowdhury, E.H. Sessions, J.R. Pocas et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. №23. – P. 7107–7112.
8. Discovery and optimization of indoles and 7-azaindoles as Rho kinase (ROCK) inhibitors (part-II) / S. Chowdhury, E.H. Sessions, J.R. Pocas et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. №23. – P. 7113–7119.
9. ROCK inhibitors 3: Design, synthesis and structure-activity relationships of 7-azaindole-based Rho kinase (ROCK-I) inhibitors / U.K. Bandarage, J. Cao, J.H. Come et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 28. №15. – P. 2622–2626.

10. Development of Dihydropyridone Indazole Amides as Selective Rho-Kinase Inhibitors / K. B. Goodman, H. Cui, S. E. Dowdell et al. // *J. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 50. №1. – P. 6–9.
11. M. Congreve. M. Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery / M. Congreve, G. Chessari, D. Tisi, A. J. Woodhead // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51. №13. – P. 3661–3680.
12. Fragment-based discovery of 6-substituted isoquinolin-1-amine based ROCK-I inhibitors / P. Ray, J. Wright, J. Adam et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. №1. – P. 97–101
13. Asymmetric synthesis of potent chroman-based Rho kinase (ROCK-II) inhibitors / Y. T. Chen, T. Vojkovsky, X. Fang et.al // *Med. Chem. Commun.* – 2011. – Vol. 2. №1. – P. 73–75.
14. Chroman-3-amides as potent Rho kinase inhibitors / Y. T. Chen, T. D. Bannister, A. Weiser et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18. №24. – P. 6406–6409
15. T. Schröter. Detection of myosin light chain phosphorylation—A cell-based assay for screening Rho-kinase inhibitors / T. Schröter, E. Griffin, A. Weiser, Y. Feng, P. LoGrasso // *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 374. №2. – P. 356–360.
16. Discovery of Substituted 4-(Pyrazol-4-yl)-phenylbenzodioxane-2-carboxamides as Potent and Highly Selective Rho Kinase (ROCK-II) Inhibitors / Y. Feng, Y. Yin, A. Weiser et al. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51. №21. – P. 6642–6645.
17. J. Zhang. Junctional adhesion molecule A of red drum (*Sciaenops ocellatus*): A possible immunomodulator and a target for bacterial immune evasion / J. Zhang, M. Zhang, L. Sun // *Vet. Immunology and Immunopathology.* – 2014. – Vol. 161. №1-2. – P. 99–107.
18. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles / Y. Shimizu, D. Thumkeo, J. Keel et al. // *J. Cell Biol.* – 2015. – Vol. 168. №6. – P. 941–953.

19. Rho-Kinase Inhibition Acutely Augments Blood Flow in Focal Cerebral Ischemia via Endothelial Mechanisms / H.K. Shin, S. Salomone, E. Potts et al. // *Journal Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2006. – Vol. 27. №5. – P. 998–1009.
20. J. Pan. Discovery of (S)-6-methoxy-chroman-3-carboxylic acid (4-pyridin-4-yl-phenyl)-amide as potent and isoform selective ROCK2 inhibitors / J. Pan, Y. Yin, L. Zhao, Y. Feng // *Bioorg. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 27. № 7. – P. 1382-1390.
21. A. P. Somlyo. Rhomantic interludes raise blood pressure / A. P. Somlyo // *Nature* – 1997. – Vol. 389. №6654. – P. 909–911.
22. Human Urotensin II-Induced Contraction and Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation Are Mediated by RhoA and Rho-Kinase / V. Sauzeau, E. Le Mellionec, J. Bertoglio et al. // *Circ. Res.* – 2001. – Vol. 88. №11. – P. 1102–1104.
23. Design and synthesis of Rho kinase inhibitors (I) / A. Takami, M. Iwakubo, Y. Okada et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 12. №9. – P. 2115–2137.
24. Substituted 2H-isoquinolin-1-one as potent Rho-Kinase inhibitors. Part 1: Hit-to-lead account / F. Wu, F. H. Büttner, R. Chen et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. №11. – P. 3235–3239.
25. Tetrahydroisoquinoline Derivatives As Highly Selective and Potent Rho Kinase Inhibitors / X. Fang, Y. Yin, Y. T. Chen et al. // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53. №15. – P. 5727–5737.
26. Benzothiazoles as Rho-associated kinase (ROCK-II) inhibitors / Y. Yin, L. Lin, C. Ruiz et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 19. №23. – P. 6686–6690.
27. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Aryl-5-aminoalkyl-thiazole-2-amines Derivatives as ROCK II Inhibitors / S. Ma, L. Wang, B. Ouyang et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 28. – P. 115683-115691.

28. Discovery of Substituted 4-(Pyrazol-4-yl)-phenylbenzodioxane-2-carboxamides as Potent and Highly Selective Rho Kinase (ROCK-II) Inhibitors / Y. Feng, Y. Yin, A. Weiser et al. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51. №21. – P. 6642–6645.

29. Detection of myosin light chain phosphorylation—A cell-based assay for screening Rho-kinase inhibitors / T. Schröter, E. Griffin, A. Weiser et al. // *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 374. №2. – P. 356–360.

30. Cardiovascular effects of a novel potent and highly selective azaindole-based inhibitor of Rho-kinase / R. Kast, H. Schirok, S. Figueroa-Pérez et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 152. №7. – P. 1070–1080.

31. Effects of Topical Administration of Y-39983, a Selective Rho-Associated Protein Kinase Inhibitor, on Ocular Tissues in Rabbits and Monkeys / H. Tokushige, M. Inatani, S. Nemoto et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2007. – Vol. 48. №7. – P. 3216–3222.

32. H. Tanihara. (2008). Intraocular Pressure–Lowering Effects and Safety of Topical Administration of a Selective ROCK Inhibitor, SNJ-1656, in Healthy Volunteers / H. Tanihara // *Arch. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 126. №3. – P. 309–315.

33. 3-[2-(Aminomethyl)-5-[(pyridin-4-yl)carbamoyl]phenyl] benzoates as soft ROCK inhibitors / S. Boland, O. Defert, J. Alen et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23. №23. – P. 6442–6446

34. P. Van Rompaey, P. Arzel, O. Defert, D. Leysen. WO/2007/042321, 2007.

35. Discovery of Thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one Derivatives as a New Class of ROCK Inhibitors / Z. Miao, Y. Sun, L. Zhao et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol.30. №6. – Art. 126966.

36. Discovery of a Phenylpyrazole Amide ROCK Inhibitor as a Tool Molecule for *in vivo* Studies / Z. Hu, C. Wang, P. W. Glunz et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 127495.

37. Discovery of Substituted 4-(Pyrazol-4-yl)-phenylbenzodioxane-2-carboxamides as Potent and Highly Selective Rho Kinase (ROCK-II) Inhibitors / Y. Feng, Y. Yin, A. Weiser et al. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51. №21. – P. 6642–6645.

38. Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer / T. Matsuoka, M. Yashiro // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. №38. - P 13756–13766.

39. Blockade of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibits the contractility and invasion potential of cancer stem like cells / S. Srinivasan, V. Ashok, S. Mohanty et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – P 2148–2158.

40. Rho Kinase Regulates the Survival and Transformation of Cells Bearing Oncogenic Forms of KIT, FLT3, and BCR-ABL / R. S. Mali, B. Ramdas, P. Ma et al. // *Cancer Cell.* – 2011. – Vol. 20. №3. – P. 357–369.

41. Combined Rho-kinase inhibition and immunogenic cell death triggers and propagates immunity against cancer / G.-H. Nam, E. J. Lee, Y. K. Kim et al. // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9. №1.

42. Potently inhibiting cancer cell migration with novel 3H-pyrazolo[4,3-f]quinoline boronic acid ROCK inhibitors / N. Dayal, C. G. Mikek, D. Hernandez et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 180. – P. 449–456.

43. Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma / B. A. Harrison, Z. Y. Almstead, H. Burgoon et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2014. – Vol. 6. №1. – P. 84–88.

44. Suppression of KRas-mutant cancer through the combined inhibition of KRAS with PLK1 and ROCK / J. Wang, K. Hu, J. Guo, et al. // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 11363.

45. F. S. Guerra. ROCK inhibition with Fasudil induces beta-catenin nuclear translocation and inhibits cell migration of MDA-MB 231 human breast cancer cells / F. S. Guerra, R. G. Oliveira, C. A. M. Fraga, C. dos S. Mermelstein, P. D. Fernandes // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. №1.

46. Rho Kinase Inhibitors Block Melanoma Cell Migration and Inhibit Metastasis / A. Sadok, A. McCarthy, Caldwell et al. // *J. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75. №11. – P. 2272–2284.

47. ROCK I Kinase Enzyme System [Электронный ресурс]: URL: <https://worldwide.promega.com/products/cell-signaling/kinase-assays-and-kinase-biology/rock1-kinase-enzyme-system/?catNum=V3411>

48. 4-phenylpiperazine-1-carbonithile / W. Scroth, H. Kluge, R. Frach et al. // *J. fur praktische Chem.* – 1983. – Vol. 325. №5. – P. 787 – 802.

49. 4-benzyl-piperazine-1-carbothioic acid amide // *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* – 1968. – Vol. 18. P. 1431 – 1432.

50. 4-(4-chloro-phenyl)-piperazine-1-carbothioicacid amide / Nagarajan et al. // *Ind. J. Chem.* – 1969. – Vol. 7. P. 1195.

51. 2-Bromo-1-(pyridine-4-yl)ethanone Hydrobromide / K. J. Ogawa / *Chem. Soc Perkin.* – 1985. – P. 2417.