

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)

Медицинская и фармацевтическая химия  
(направленность (профиль))

## ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Дизайн новых производных лапатиниба

Обучающийся

Д.А. Комарова

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

Р.Э. Гасанов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Тольятти 2023

## Аннотация

Целью данной выпускной квалификационной работы является разработка новых производных лапатиниба – ингибитора EGFR. Новые производные лапатиниба могут стать потенциальными клиническими кандидатами для борьбы с немелкоклеточным раком легкого, устойчивым к ингибиторам первого, второго, третьего поколений. Также, новые производные могут обладать улучшенными физико–химическими свойствами, что также повысит их эффективность.

В литературном обзоре описаны рецепторные тирозинкиназы, их строение, свойства, сигнальные пути, в которых принимают участие тирозинкиназы, а также семейство ErbB, к которому принадлежит EGFR. Описаны уже существующие ингибиторы EGFR, и направления в разработке новых скаффолдов.

В экспериментальной части описаны этапы проведения молекулярного докинга, методики синтеза исследуемых соединений, методики проведения биологических испытаний.

На основе проведенных испытаний было выявлено соединение–лидер, проявляющее наибольшую ингибирующую активность в отношении EGFR.

Данная выпускная работа изложена на 65 страницах, включает в себя 12 рисунков, 14 схем химических реакций, список литературы состоит из 49 источников, включая зарубежные источники.

## **Abstract**

The purpose of this final qualification work is the development of new derivatives of lapatinib, an EGFR inhibitor. New lapatinib derivatives may become potential clinical candidates for the treatment of non-small cell lung cancer resistant to first, second, and third generation inhibitors. Also, new derivatives may have improved physical and chemical properties, which will also increase their effectiveness.

The literature review describes receptor tyrosine kinases, their structure, properties, signaling pathways in which tyrosine kinases are involved, as well as the ErbB family, to which EGFR belongs. Already existing EGFR inhibitors are described, as well as directions in the development of the new scaffolds.

The experimental section contains a description the stages of molecular docking, the methods for the synthesis of target compounds, and the methods for conducting biological tests.

On the basis of the tests performed, a leader compound was identified that exhibited the highest inhibitory activity against EGFR.

The final qualifying work is presented on 65 pages, contains 13 figures, 14 schemes of chemical reactions, the list of 49 references including foreign sources.

## Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор .....	8
1.1 Рецепторные тирозинкиназы .....	8
1.2 Рецептор эпидермального фактора роста.....	13
1.3 Ингибиторы тирозинкиназы .....	14
1.4 Разработка низкомолекулярных ингибиторов EGFR четвертого поколения.....	18
2 Результаты и их обсуждение.....	33
2.1 Молекулярный дизайн новых производных лапатиниба .....	33
2.2 Синтез исследуемых соединений.....	41
2.3 Биологические испытания.....	46
3 Экспериментальная часть.....	50
3.1 Реагенты и оборудование .....	50
3.2 Синтез исходных соединений.....	50
3.3 Синтез целевых соединений .....	54
3.4 Биологические испытания.....	56
3.5 Компьютерное моделирование.....	57
Заключение .....	59
Список используемой литературы .....	60

## Определения, обозначения и сокращения

AKT	RAC-альфа серин/треонин-протеинкиназа
ALK	киназа анапластической лимфомы
EGF	эпидермальный фактор роста
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
ErbB	семейство белков эпидермального фактора роста
ERK 1/2	киназа регулируемая внеклеточным сигналом 1/2
FDA	управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
IGF-1R	рецептор инсулиноподобного фактора роста 1
InsR	рецептора инсулина
JAK	Янус киназа
MKK	киназа митоген–активируемой киназы
MKKK	киназа киназа митоген–активируемой киназы
mTOR	мишень рапамицина у млекопитающих
P2(PIP2)	фосфатидилинозитол дифосфат
P3(PIP3)	фосфатидилинозитол трифосфат
PDGF-R	рецептор тромбоцитарного фактора роста
PI3K	фосфатидилинозитол-3-киназа
RTK	рецепторные тирозинкиназы
STAT	преобразователь сигнала и активатор транскрипции
TKI	ингибитор тирозинкиназы
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR	рецептор фактора роста эндотелия сосудов
НМРЛ	немелкоклеточный рак легкого
ХМЛ	хронический миелоидный лейкоз

## Введение

Рак легких является наиболее распространенным видом рака и ведущей причиной смерти от рака в мире. Одним из подтипов рака легкого является немелкоклеточный рак, отличающийся видом клеток под микроскопом. Приблизительно у 10-50% пациентов с НМРЛ имеются мутации, активирующие рецептор эпидермального фактора роста. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, ErbB1, HER1) является одной из наиболее проверенных молекулярных мишеней для открытия противораковых лекарств. Существуют одобренные FDA препараты, представляющие собой конкурентные ингибиторы тирозинкиназы, нацеленные на EGFR и эффективно борющиеся с злокачественными новообразованиями, но у них есть весьма существенный недостаток: постоянное применение этих препаратов в качестве терапии неизбежно приводит к развитию резистентности.

В виду этого исследователями уже открыты три поколения ингибиторов, которые позволяют обходить мутации, обуславливающие лекарственную устойчивость, которые широко используются в клинической практике. Но и к последнему поколению уже возникла мутация, делающая терапию существующими препаратами неэффективной. Следовательно, разработка новых ингибиторов, которые позволили бы нацелиться на новую мутацию и были бы так же эффективны, как и предыдущие поколения, является первостепенной задачей для медицинских химиков [1].

Лапатиниб представляет собой ингибитор тирозинкиназы, обладающей селективностью к EGFR и его партнеру по связыванию – HER2. Этот препарат назначают при раке молочной железы, но он значительно уступает по своей противоопухолевой активности при монотерапии другому препарату моноклональному антителу – Трастузумабу, и поэтому чаще всего назначается в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами. Лапатиниб обладает также плохой растворимостью, которая требует

повышения терапевтической дозы препарата, что негативно впоследствии влияет на организм пациента. Суммируя последние данные о противоопухолевой активности лапатиниба можно заключить, что его скаффолд можно использовать как основу для дизайна новых ингибиторов EGFR с улучшенными физико–химическими свойствами.

Цель данной работы: Дизайн новых производных лапатиниба

Задачи работы:

– Проанализировать научную литературу с целью описания поколений ингибиторов EGFR и их скаффолдов;

– Проанализировать режимы связывания лапатиниба в активном сайте EGFR и предложить подходы к его модификации;

– Провести молекулярный докинг производных лапатиниба;

– Провести синтез производных лапатиниба;

– Провести *in vitro* тестирования синтезированных производных.

# 1 Литературный обзор

## 1.1 Рецепторные тирозинкиназы

Рецепторные тирозинкиназы (*англ.* – Receptor Tyrosin Kinases, RTK) являются метаболотропными рецепторами, и представляют собой трансмембранные белки, состоящие из нескольких доменов: внеклеточный домен, расположенный на поверхности клетки и участвующий в связывании лиганда, трансмембранный домен, внутриклеточный каталитический домен, обладающий тирозинкиназной активностью. Многие члены этого семейства играют критически важную роль в разнообразных клеточных процессах таких как пролиферация и дифференцировка, выживаемость и метаболизм, миграция клеток и контроль клеточного цикла [2].

Все RTK имеют сходное строение внеклеточного лиганд связывающего домена, трансмембранного домена, который представляет собой одиночную  $\alpha$ -спираль, а также цитоплазматического киназного домена. Было установлено, что сигнальный каскад, в который вовлечены RTK, высоко консервативен для многих живых организмов. Нарушения регуляции рецепторных тирозинкиназ, приводят к различным заболеваниям, в частности к раку, диабету, воспалениям, тяжелым заболеваниям костей, атеросклерозу и многим другим [3].

Важные сигнальные пути, в которых участвуют рецепторные тирозинкиназы, представлены на рисунке 1.

Активация RTK начинается со связывания лиганда внеклеточным доменом. Лигандами являются: гормоны (инсулин), цитокины, полипептидные факторы роста. Большинство человеческих RTK могут быть активированы более чем одним лигандом. Например, три из четырех рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR/HER) реагируют на семейство лигандов, экспрессируемых 13 генами. Некоторых из лигандов RTK являются тканеспецифичными, однако многие широко выражены



повсеместно, но различно модулируют степень активации рецептора при своем связывании [4].

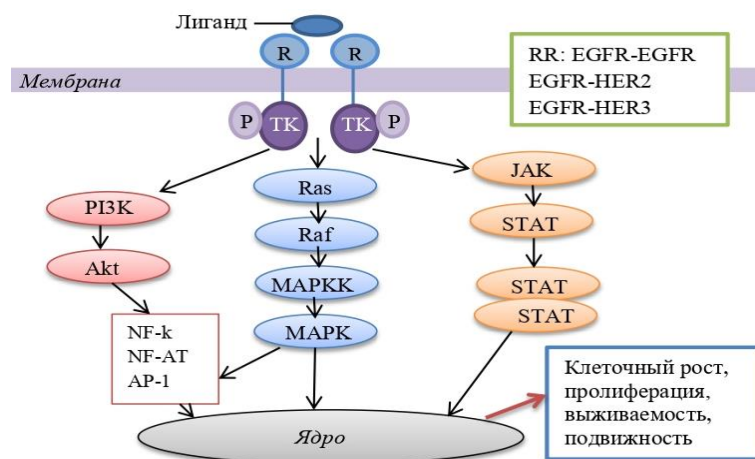


Рисунок 1 – Сигнальные пути RTK

Затем происходит димеризация внутриклеточного домена, это позволяет произвести трансфосфорилирование тирозина в цитоплазматической части каждого мономера его партнером. Фосфорилированный тирозин служит сайтом связывания для адаптерных белков, которые взаимодействуют с нижестоящими ферментами, передавая сигнал от активированного рецептора тирозинкиназы дальше внутрь клетки [5].

Одним из важных сигнальных каскадов, в которые вовлечены члены семейства RTK, является ERK сигнальный путь. Он состоит из ГТФазы Ras, протеинкиназы Raf, киназы киназы митоген–активируемой киназы МККК, киназы митоген–активируемой киназы МКК, самой митоген–активируемой киназы, киназы регулируемой внеклеточным сигналом 1/2 (ERK 1/2). В норме ERK сигнальный путь начинается с активации рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Затем происходит активация и вовлечение белков Ras, активация Raf (следует отметить, что активация

данной протеинкиназы служит главным пусковым механизмом для всего сигнального каскада ERK), которая в свою очередь активирует блок митоген-активируемых киназ, которые фосфорилируют ERK 1/2, далее сигнал передается в ядро, где запускается транскрипция необходимых белков. Каскады ERK представляют собой строго регулируемые каскады, которые отвечают за основные клеточные процессы, включая пролиферацию и дифференцировку клеток [6].

Еще одним немаловажным сигнальным каскадом является PI3K/AKT/mTOR. Этот сигнальный путь стимулируется различными онкогенами и рецепторами фактора роста, такими как тирозинкиназа рецептора инсулина (InsR), родственный рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R), рецептор эпидермального фактора роста (EGF), рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGF-R) [7]. После активации RTK, на фосфорилированных тирозинах заякоривается PI3K, что приводит в активации этой киназы. После активации, PI3K катализирует фосфорилирование P2(PIP2) с образованием P3(PIP3), вторичного мессенджера, который связывает и рекрутирует подмножество гомологии плекстрина (PH), FYVE, PX, и другие связывающие липиды домены нижестоящих мишеней. Различные сигнальные белки, такие как киназы AKT и PDK1, могут связываться с липидными продуктами PI3K и тем самым локализоваться на клеточной мембране, чтобы активировать пути роста и выживания клеток [8].

Рецепторные тирозинкиназы также запускают сигнальный путь JAK/STAT. Этот сигнальный каскад представляет собой модуль быстрой передачи сигналов от мембраны к ядру и индуцирует экспрессию различных критических медиаторов рака и воспаления. Связывание лиганда с рецепторной тирозинкиназой индуцирует её сближение с JAK. Активированный JAK вызывает фосфорилирование тирозин-связанного рецептора, образуя сайт стыковки для STAT. В этом месте стыковки JAK фосфорилирует STAT, а затем STAT диссоциирует от

рецептора и образует гомодимеры или гетеродимеры посредством взаимодействий с SH2-домен-фосфотирозина. Эти димеры транслоцируются на промоторы генов-мишеней, регулируя транскрипцию генов-мишеней [9].

В нормальных физиологических условиях уровень активности РТК жестко контролируется, одним из способов прекращения передачи сигнала является активация фермента тирозинфосфатазы. Нарушение регуляции в работе рецепторных тирозинкиназ связано с несколькими механизмами, но в конечном итоге это приводит к смещению баланса между ростом или пролиферацией клеток, что может привести к гибели клеток или к возникновению различных заболеваний. Конститутивная активация, как правило, может придавать нормальным клеткам онкогенные свойства и запускать процессы РТК-индуцированного онкогенеза. Выделяют четыре основных механизма, приводящих к конститутивной активации РТК при раке человека: мутации с усилением функции (активирующие мутации), геномная амплификация, хромосомные перестройки, аутокринная активация [10]. Рассмотрим каждый механизм подробнее.

Мутации, активирующие РТК, происходят во внутриклеточном каталитическом домене, при этом изменяется белковая архитектура и функции этого домена, что приводит к конститутивной активации РТК и постоянному сигналу для клеток к пролиферации. Например, соматические мутации в активном центре киназного домена EGFR встречается примерно в 16% случаев НМРЛ, при этом наиболее распространенной мутацией является миссенс-мутация L858R. Эта мутация наблюдается совместно с хромосомной перестройкой: делецией в 19 экзоне. И L858R, и делеция в 19 экзоне дестабилизируют ранее существовавшую неактивную конформацию киназного домена, что приводит к конститутивной активации EGFR [11].

Геномная амплификация приводит к сверхэкспрессии РТК на поверхности клеток. Увеличение количества РТК приводит к конститутивной активации киназы, а из-за кластеризации РТК на поверхности мембраны клеток наблюдается повышение чувствительности

рецепторных тирозинкиназ разных семейств к родственным лигандам, что также является причиной aberrантной передачи сигналов [12].

Независимо от уровня RTK, изменение в регуляции лигандов RTK может способствовать онкогенезу. Нарушения могут происходить по аутокринному (лиганд нацеливается на рецептор той же клетки, из которой он экспрессируется) или паракринному механизму (лиганд нацеливается на близлежащие клетки). Примеры аутокринной активации включают IGF1/IGF1R, который индуцирует пролиферацию клеток при меланоме. Микроокружение опухоли также отличается богатым разнообразием факторов роста, которые активируют RTK паракринным путем [13]. В качестве примера можно привести фактор роста VEGF, который индуцируется в условиях гипоксии опухоли и действует на рецепторы VEGFR, экспрессируемые на эндотелиальных клетках, для стимуляции ангиогенеза опухоли [14].

Хромосомные перестройки опосредуют появление гибридных белков, которые стимулируют онкогенез. В большинстве случаев киназный домен RTK слит с различными белками–партнерами, которые либо управляют олигомеризацией, либо изменяют субклеточную локализацию, экспрессию и/или стабильность. Слияние RTK с неверным белком вследствие хромосомных перестроек приводит к появлению лиганд–независимой конститутивной киназной активности. Например, в случае слияния NPM1–ALK, обнаруженного в анапластической крупноклеточной лимфоме, для aberrантной активации тирозинкиназа ALK подвергается олигомеризации, управляемой партнером по слиянию, что приводит к прогрессированию лимфомы [15].

Таким образом, рецепторные тирозинкиназы играют важную регулирующую роль почти во всех направлениях клеточной жизнедеятельности. Они управляют клеточным циклом, регулируют процессы запуска или ухода от апоптоза, реорганизацию цитоскелета, дифференцировку и рост, развитие клеток из стволовых предшественников,

иммунный ответ, передачу сигналов от нервной системы и транскрипцию генов. Рецепторные тирозинкиназы регулируют множество важных клеточных процессов, поддерживая гомеостаз и обеспечивая выживание всего организма в целом. Эти внутренние функции aberrантно используются во время прогрессирования рака и других заболеваний. Участие РТК в таких видах рака как: немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, лимфомы, глиобластома, аденокарцинома легкого, рак желудка и многих других, делает эти тирозинкиназы привлекательной терапевтической мишенью.

## **1.2 Рецептор эпидермального фактора роста**

Эпидермальный фактор роста (EGF) был одним из первых открытых факторов роста, а изучение его рецепторов определило многие основы передачи сигналов, опосредованной факторами роста. Рецепторные тирозинкиназы, которые активируются с помощью EGF, объединяют в семейство ErbB. Это семейство содержит четыре белка, структурно схожих с первоначально открытым рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), у человека это:

- ErbB1, также известный как EGFR и HER1
- ErbB2, также известный как HER2
- ErbB3, также известный как HER3
- ErbB4, также известный как HER4

Все белки имеют сходную структуру: внеклеточная область связывания лиганда (примерно 620 аминокислот), трансмембранной части (примерно 23 аминокислоты), внутриклеточный тирозинкиназный домен (примерно 540 аминокислот). Вся последовательность передачи сигнала для данного семейства аналогична описанной ранее для рецепторных тирозинкиназ [16].

Рак легкого является одним из самых распространенных злокачественных новообразований в 20 веке, со средней 5-летней

выживаемостью ниже 20%. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является подтипом рака легкого, на его долю приходится около 80-85% всех случаев рака во всем мире. Приблизительно у 10-50% пациентов с НМРЛ имеются мутации, активирующие рецептор фактора роста EGFR. К таким мутациям относятся: делеция в 19 экзоне (Ex19del) и миссенс-мутация в 21 экзоне, также известная как L858R. Лечение НМРЛ сложное и зависит от стадии развития рака, обычно классическая терапия включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию и/или химиотерапию. Установлено, что пациенты с активирующими мутациями EGFR более чувствительны к ингибиторам тирозинкиназы [17].

### **1.3 Ингибиторы тирозинкиназы**

Ингибиторы тирозинкиназы (ТКИ), в подавляющем большинстве одобренных FDA препаратов для таргетной терапии, представляют собой конкурентные ингибиторы, являющимися классическими миметиками АТФ, и лишь небольшая часть ингибиторов связывается с РТК в аллостерическом сайте. Пионером РКИ является иматиниб, он был одобрен в 2001 году для лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ).

Среди конкурентных ингибиторов известны обратимые (связывающиеся посредством нековалентной связи с аминокислотными остатками) и необратимые (связывающиеся посредством ковалентной связи с аминокислотными остатками) ингибиторы. Среди обратимых ингибиторов также есть разделение на ингибиторы I и II типа. Ингибиторы, которые связываются с активными конформациями киназы являются ингибиторами I типа. Сайты связывания АТФ обычно консервативны, поэтому селективность может быть достигнута путем нацеливания на плохо сохранившиеся аминокислотные остатки, особенно на остатки, фланкирующие шарнир. Ингибиторы II типа связываются с сайтом, прилегающим к сайту связывания

АТФ в неактивной конформации киназы, и сохраняют эту конформацию. Этот тип ингибиторов обычно неселективен.

Наконец, ковалентные ингибиторы киназы необратимо связываются с активным центром киназы, и имеют преимущество в том, что они эффективны и имеют уменьшенные побочные эффекты [18].

Таким образом, ингибиторы тирозинкиназ занимают важное место в прецизионной онкологии, и являются перспективным направлением в разработке таргетных препаратов.

Первыми ингибиторами EGFR, введенными в клиническую практику были gefitinib **1** и erlotinib **2**, они стали первым поколением лекарственных препаратов. На рисунке 2 представлены структурные формулы ингибиторов.

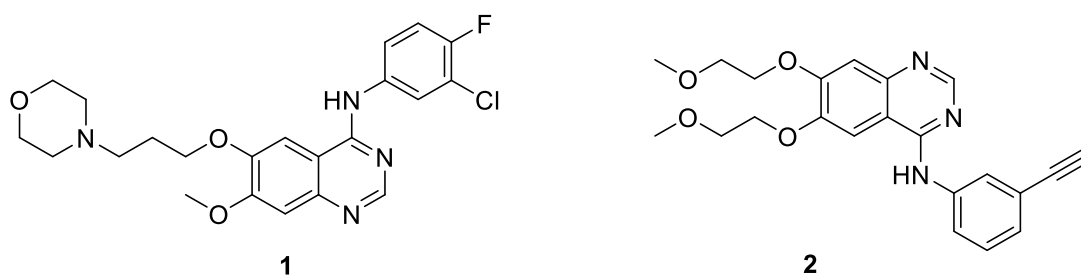


Рисунок 2 – Структурные формулы gefitinib и erlotinib

Оба соединения являются производными хинолины, и связываются с активным сайтом киназы и являются её обратимыми ингибиторами. Эти препараты обладали сильным противоопухолевыми эффектами при терапии первой линии, но вместе с тем они имели существенный недостаток: при их длительном применении неизбежно возникала резистентность, которая и ограничила их эффективность. Большинство механизмов устойчивости к TKI в основном связаны с мутациями, происходящими внутри самого RTK. Резистентность вынуждает исследователей создавать всё новые и новые поколения ингибиторов [19]. Еще одним недостатком этих препаратов

является то, что они ингибируют дикий тип EGFR, что нежелательно ввиду развития побочных эффектов [20].

Установлено, что наиболее общим механизмом устойчивости к TKI EGFR первого и второго поколения, является мутация T790M [21]. Появление новых типов лекарственной устойчивости дает начало необратимым ингибиторам второго и третьего поколений. Представителями таких препаратов являются ингибиторы афатиниб **3** и осимертиниб **4** (рисунок 3).

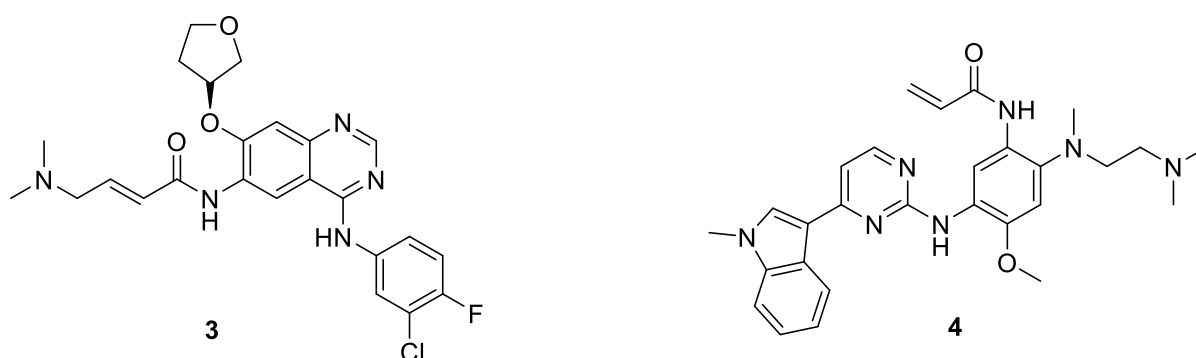


Рисунок 3 – Структурные формулы афатиниба и осимертиниба

Оба этих ингибитора за счет наличия акриламидного фрагмента ковалентно связываются с цистеином в активном сайте EGFR. Этот механизм действия помогает обойти резистентность, обусловленную мутацией T790M [22, 23].

Однако на сегодняшний день сообщается о новой мутации EGFR, которая делает неэффективным применение всех трех поколений ингибиторов. Это мутация C797S, при которой цистеин с которым связываются афатиниб и осимертиниб, заменяется на серин, соответственно связывания не происходит и EGFR не подвергается ингибированию. Это способствует разработке ингибиторов четвертого поколения [24]. В данный момент существуют некоторые разработки четвертого поколения



ингибиторов, но их эффективность *in vivo* и *in vitro* еще не выяснена, и некоторые соединения нуждаются в доработке.

Ингибитор EAI045 относят к четвертому поколению. Он представляет собой аллостерический ингибитор EGFR, и на его терапевтический эффект не влияет мутация C797S. Причина заключается в том, что он связывается с аллостерическим сайтом, который удален от активного сайта киназы. В целом, аллостерические ингибиторы являются альтернативной терапевтической стратегией АТФ-конкурентным ингибиторам из-за их различных сайтов связывания с мишенью [25]. Структурная формула EAI045 представлена на рисунке 4.

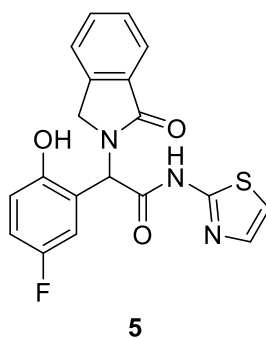


Рисунок 4 – Структурная формула EAI045

Разработка аллостерических ингибиторов сопряжена с определенными трудностями, это неизвестность строения и местонахождения аллостерического сайта фермента. Поэтому в данном контексте проще двигаться в направлении разработки классических АТФ-конкурентных ингибиторов. Что касается самого EAI045, его эффективность в качестве самостоятельного препарата ограничивается из-за того, что в активном состоянии киназы делают аллостерический сайт связывания становится недоступным. Также, EAI045 не допущен до клинических испытаний из-за проблем с безопасностью. Но этот скаффолд в принципе успешен для оптимизации и дизайна новых аллостерических ингибиторов EGFR [26].

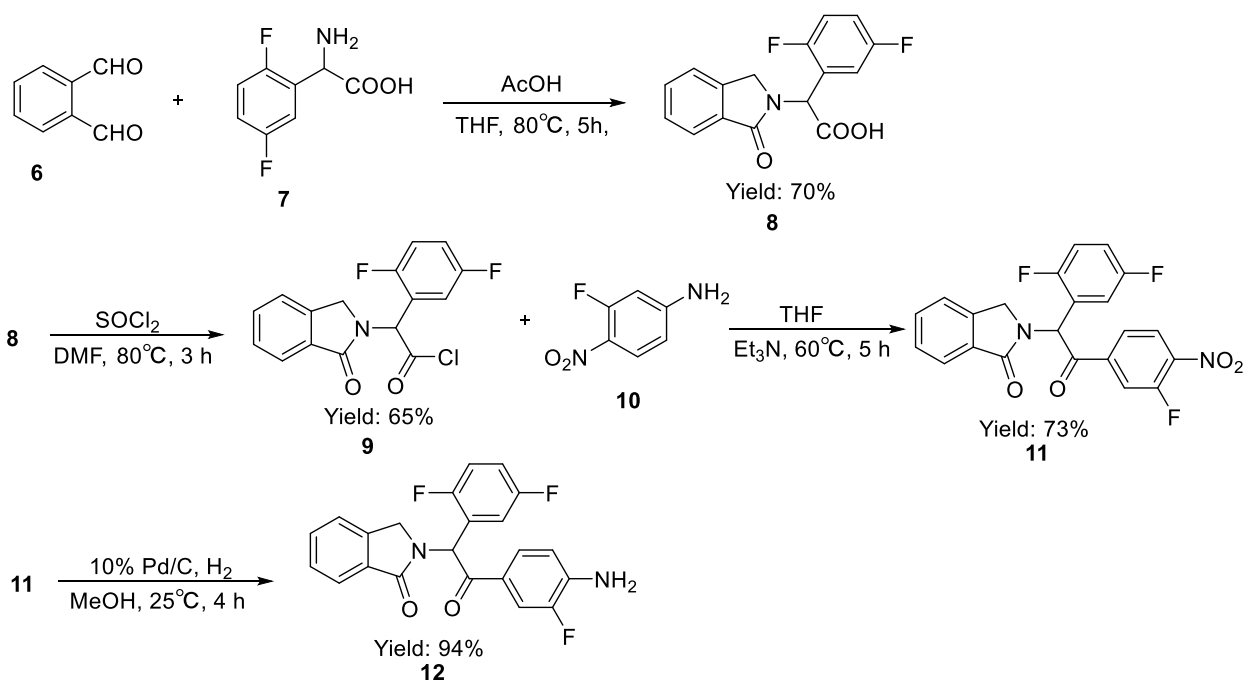
## 1.4 Разработка низкомолекулярных ингибиторов EGFR четвертого поколения

### 1.4.1 Производные

#### оксоизоиндолин–фенилацетамид–аминохиназолина

Авторы публикации [27] создали новый ингибитор на основе известного нековалентного EGFR ингибитора вандетиниба, который проявлял умеренную активность в отношении мутанта EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> (IC<sub>50</sub> = 369,2 нМ) и активность выше аллостерического ингибитора EAI045. Их ингибитор занимает как сайт связывания АТФ, так и аллостерический сайт, он активен в отношении EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> (IC<sub>50</sub> = 2,2 нМ). Анализы пролиферации на клеточных культурах ВаF3/EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> подтвердили, что соединение **22** эффективно и избирательно (в отношении других киназ) ингибирует рост этих клеток. Синтез соединения **22** представлен на схемах 1 и 2.

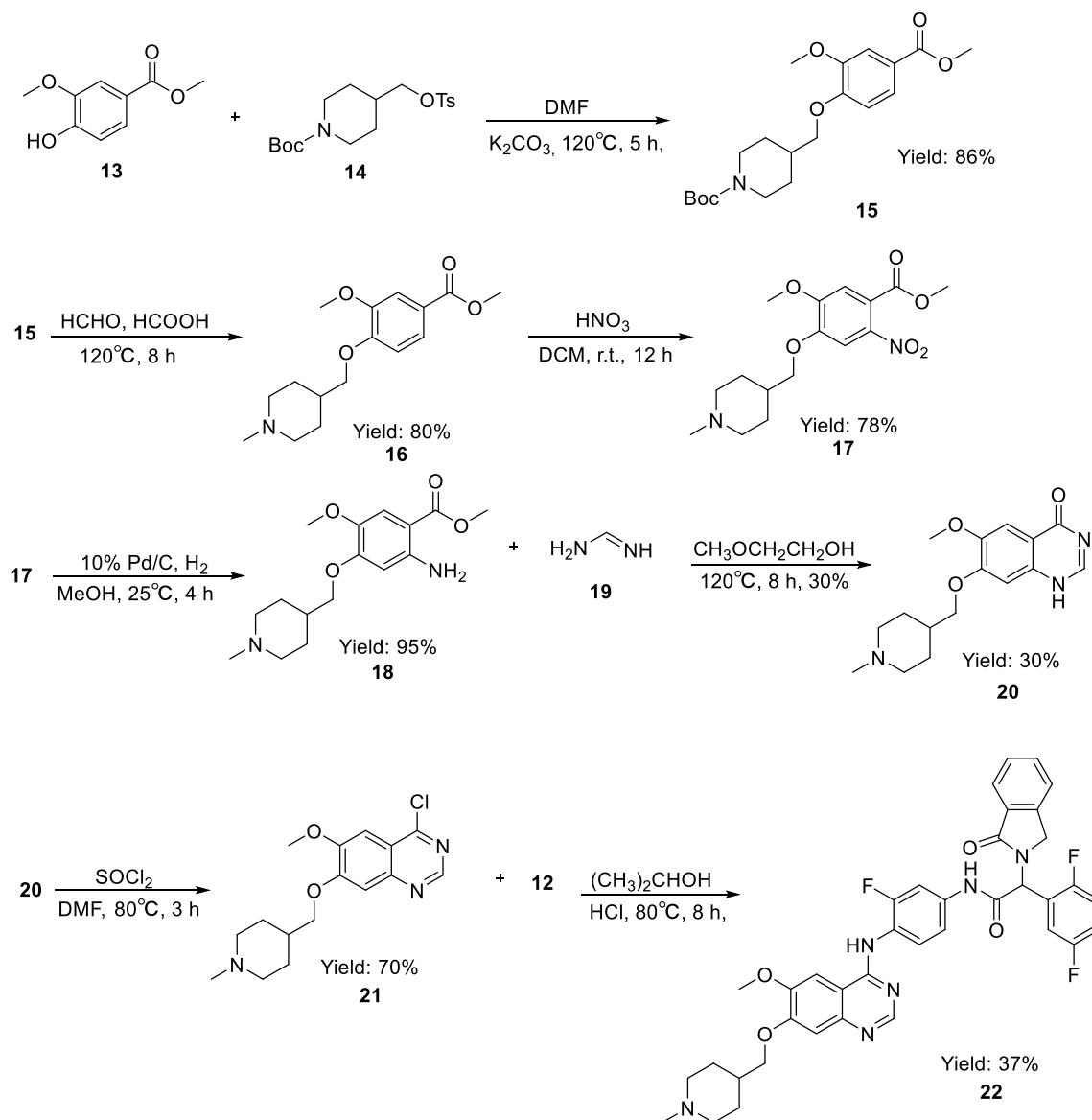
Схема 1



Для синтеза изоиндолинового фрагмента соединения **8** использовали реакцию между *орто*-фтальевым альдегидом **6** и 2-(2,4-дифторфенил)-аминоуксуной кислоты **7**. При реакции **8** с тионилхлоридом был получен хлорангидрид карбоновой кислоты **9**. Ацилирование анилина **10** привело к получению соединения **11**, которое восстановили до амина **12**. Это первый билдинг-блок для соединения **22** (фактически это производное ингибитора EAI045).

На схеме 2 показан синтез второго билдинг-блока и финальная реакция, приводящая к ингибитору **22**.

Схема 2



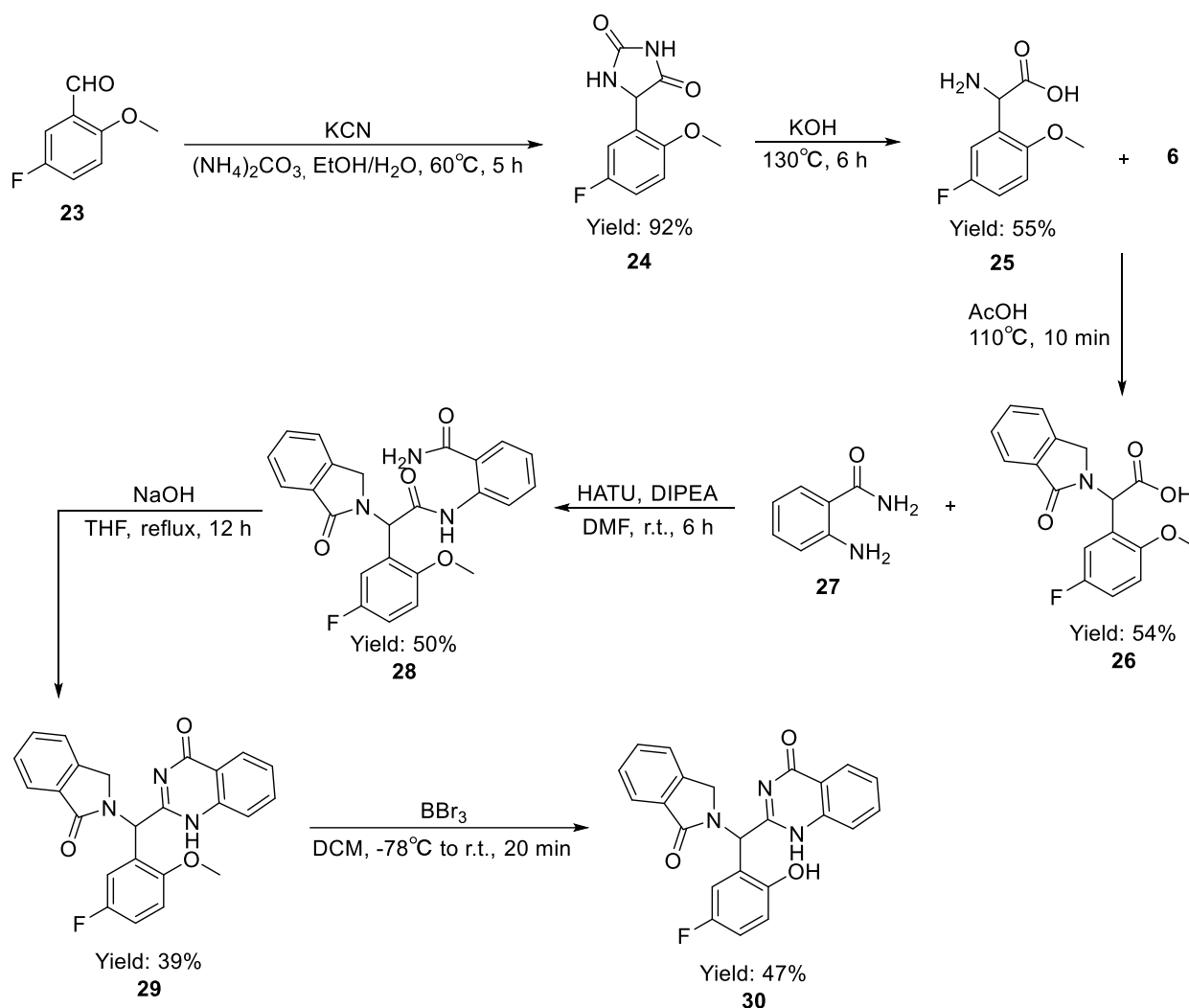
Соединение **15** получали реакцией Вильямсона, затем пиперазиновый азот подвергли метилированию с получением соединения **16**. Последовательность реакций нитрования и восстановления нитро–группы приводила к соединению **18**. Реакцией с формамидином получали хиназолинон **20**, который затем вводили в реакцию оксихлорирования с получением **21**. Завершающей стадией является аминирование с получением ингибитора **22** с выходом 37%.

#### **1.4.2 Производные**

##### **оксоизоиндолин–фенилацетамидхиназолин–4–она**

Еще один аллостерический ингибитор, полученный в результате модификации EAI045, представлен в публикации [28]. Модификация 2–аминотиазола на хиназолин–4–он была произведена с целью повышения метаболической стабильности соединения, что благоприятно повлияет на фармакокинетические и фармакодинамические свойства, а также на безопасность. Синтез разработанного ингибитора **30** представлен на схеме 3.

5–Фтор–2–метоксибензальдегид **23** конденсировали с цианидом калия и карбонатом аммония с получением диона **24**. Щелочной гидролиз приводил к соединению **25**, реакция с *орто*–фталевым альдегидом приводила к образованию изоиндолинового фрагмента в соединении **26**. При реакции **26** и 2–аминобензамида **27**, с последующим кипячением в гидроксиде натрия был получен хиназолиноновый цикл. Заключаящая стадия – деметилирование гидрокси–группы, приводила к получению ингибитора **30** с выходом 47%.

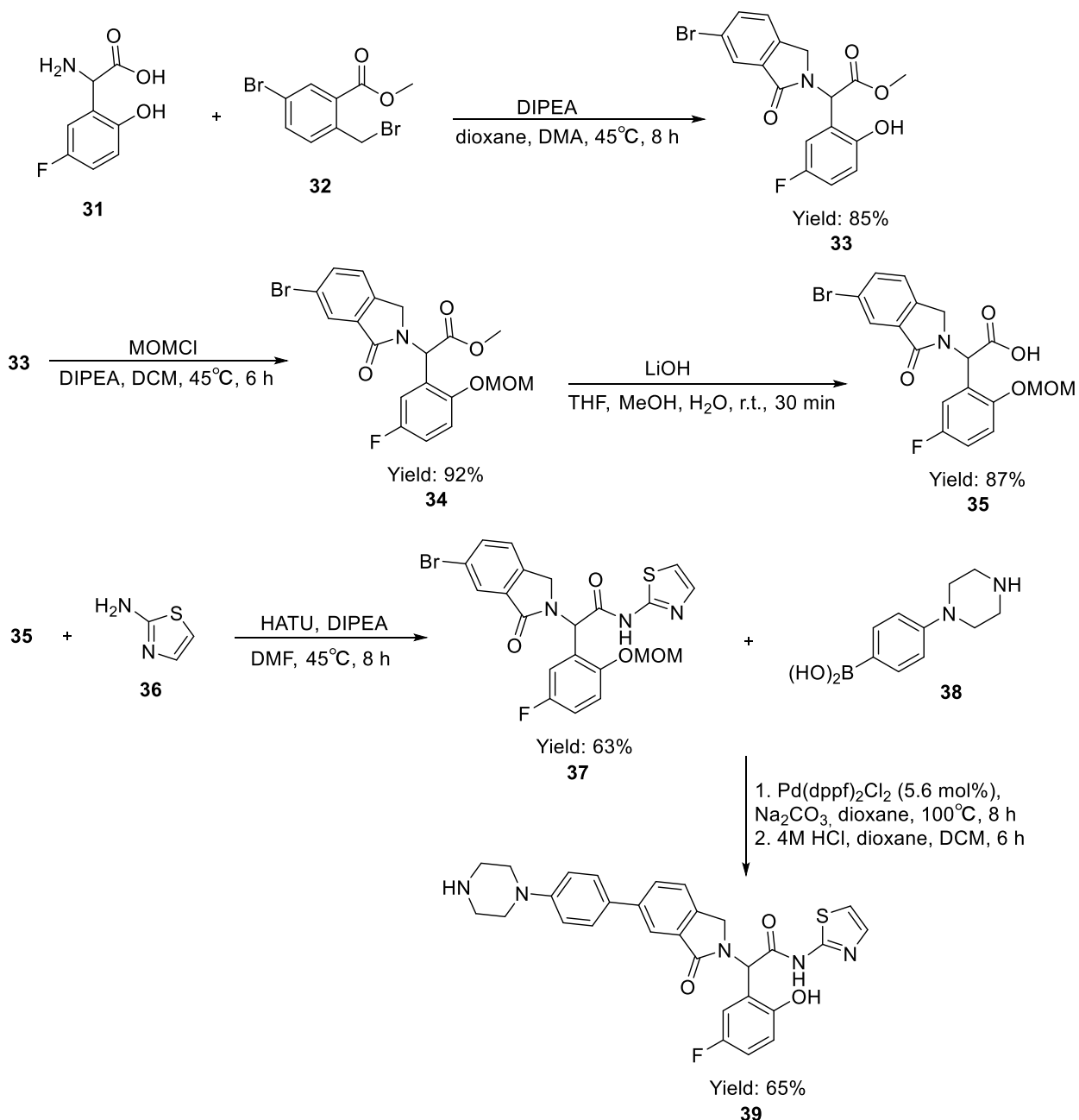


### 1.4.3 Производные оксоизоиндолин–фенилацетамид–пиперазина

Еще один способ модификации аллостерического ингибитора EAI045 представлен в публикации [29]. В своем исследовании авторы идентифицируем и изучают мутантно–селективный аллостерический ингибитор EGFR (соединение **39**), который ингибирует передачу сигналов EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> как *in vitro*, так и *in vivo* и проявляет антипролиферативное действие. Этот ингибитор может применяться как в качестве монотерапии, а так и в комбинации с осимертинибом, так как осимертиниб значительно усиливает связывание **39** с мутантным EGFR, что приводит к более эффективному ингибированию клеточного роста и к

апоптозу. Авторы за счет введения в молекулу фенил–пиперазинового заместителя повысили биодоступность ингибитора **39**. Синтез соединения **39** представлен на схеме 4.

Схема 4



Для синтеза изоиндолинового фрагмента в соединении **33** авторы проводили реакцию между 2-(2-(2-гидрокси-5-фторфенил)-аминоуксусной

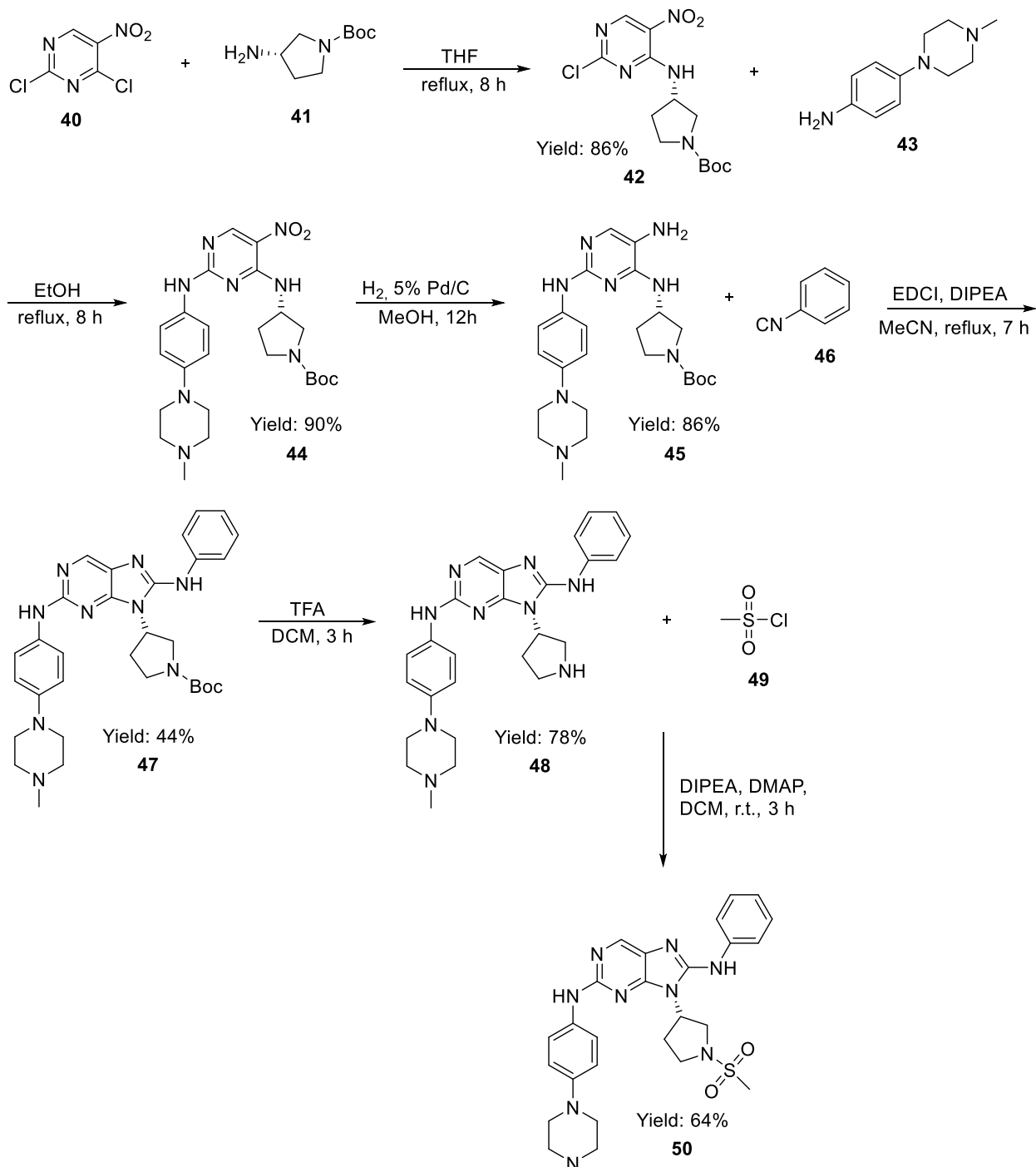
кислотой **31** и соединением **32**. Затем монометил ацеталем защитили гидроксигруппу, провели гидролиз сложного эфира с получением **35** соединения. Соединением **35** ацилировали 2-аминотиазол **36**, что привело к **37**. Завершающей реакцией кросс-сочетания Сузуки был получен целевой ингибитор **39** с выходом 65%.

#### 1.4.4 9-гетероциклилзамещенные производные 9H-пуринов

Соединение **50**, полученное авторами публикации [30], продемонстрировало не только мощное антипролиферативное действие в отношении клеточных линий HCC827 и H1975, но также значительно подавляло фосфорилирование EGFR, и индуцировало апоптоз. Также это соединение авторы описывали как необратимый конкурентный ингибитор. Авторы с помощью молекулярного докинга посмотрели связывание ингибитора с мишенью, и обнаружили, что помимо классического донорно-акцепторного киназного паттерна связывания, аффинность лиганда обусловлена также каскадом дополнительных водородных связей в сайте, чем и объяснили высокую ингибирующую способность ( $IC_{50} = 18$  нМ). Синтез соединения **50** изображен на схеме 5.

Последовательным нуклеофильным замещением хлора в 4-м и 2-м положениях пиримидина **40** было получено соединение **44**. Восстановление нитрогруппы водородом привело к получению **45**. При взаимодействии соединения **45** и фенилизонитрила **46** происходило образование имидазольного цикла для пуринового скаффолда в соединении **47**. Снятие Вос-защитной группы и последующая реакция пирролидона с метансульфонилхлоридом **49** давала целевое **50** соединение с выходом 64%.

# Cxema 5



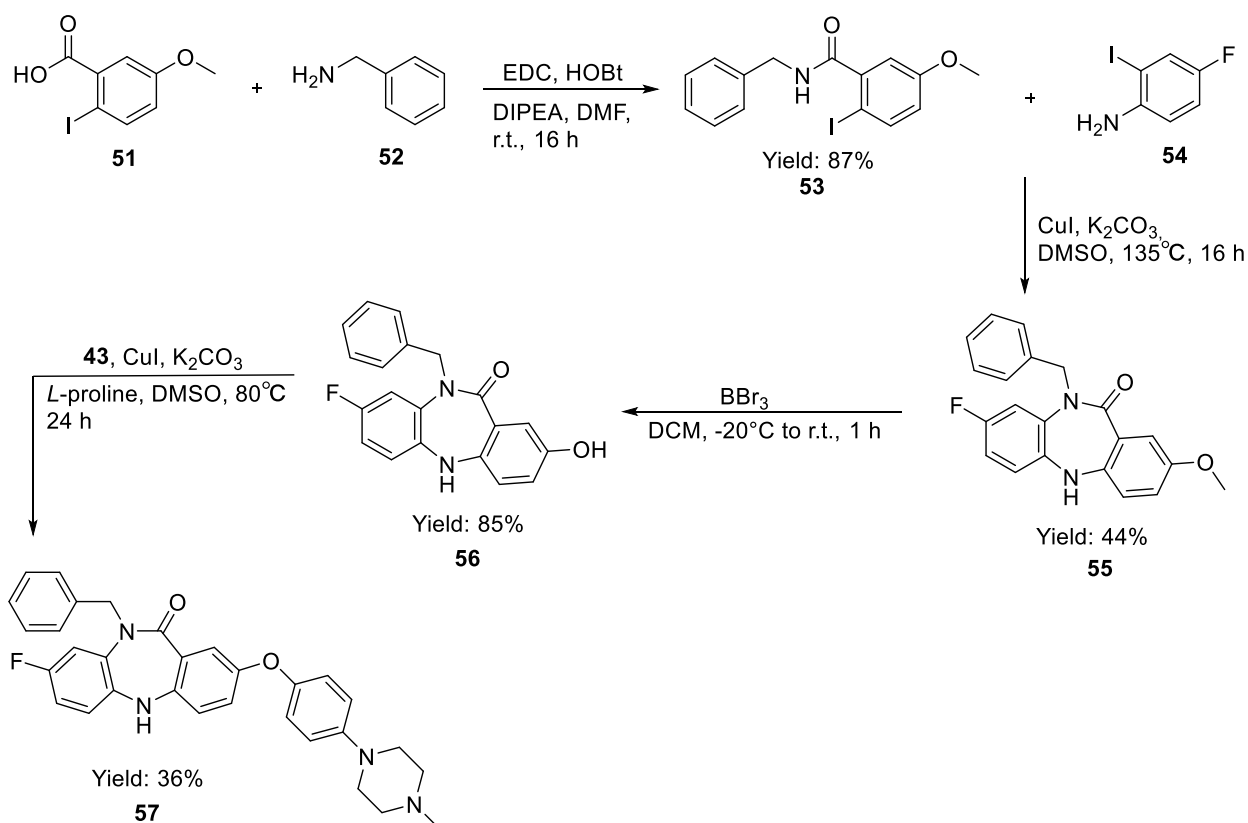


### 1.4.5. Производные 5,10-дигидро-11-*H*-дibenzo[*b,e*][1,4]дiazепин-11-она

В результате виртуального скрининга и последующей оптимизации структуры-лидера было найдено соединение **57** [31] с 5,10-дигидро-11-*H*-дibenzo[*b,e*][1,4]дiazепин-11-оновым scaффолдом.

Соединение **57** представляет собой аллостерический мутантно-селективный ингибитор, которое продемонстрировало высокую активность в отношении EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> ( $IC_{50} = 13$  нМ) и хорошую антипролиферативную активность при комбинированном лечении с цетуксимабом (препарат, содержащий моноклональное антитело к EGFR). Синтез ингибитора **57** изображен на схеме 6. Последовательность действий включает в себя образование амида **53**, внутримолекулярное нуклеофильное замещение по реакции Ульмана, привела к бензодиазепинону **55**. Снятие метильной группы и реакция Ульмана привели к целевому ингибитору **57** с выходом 36%.

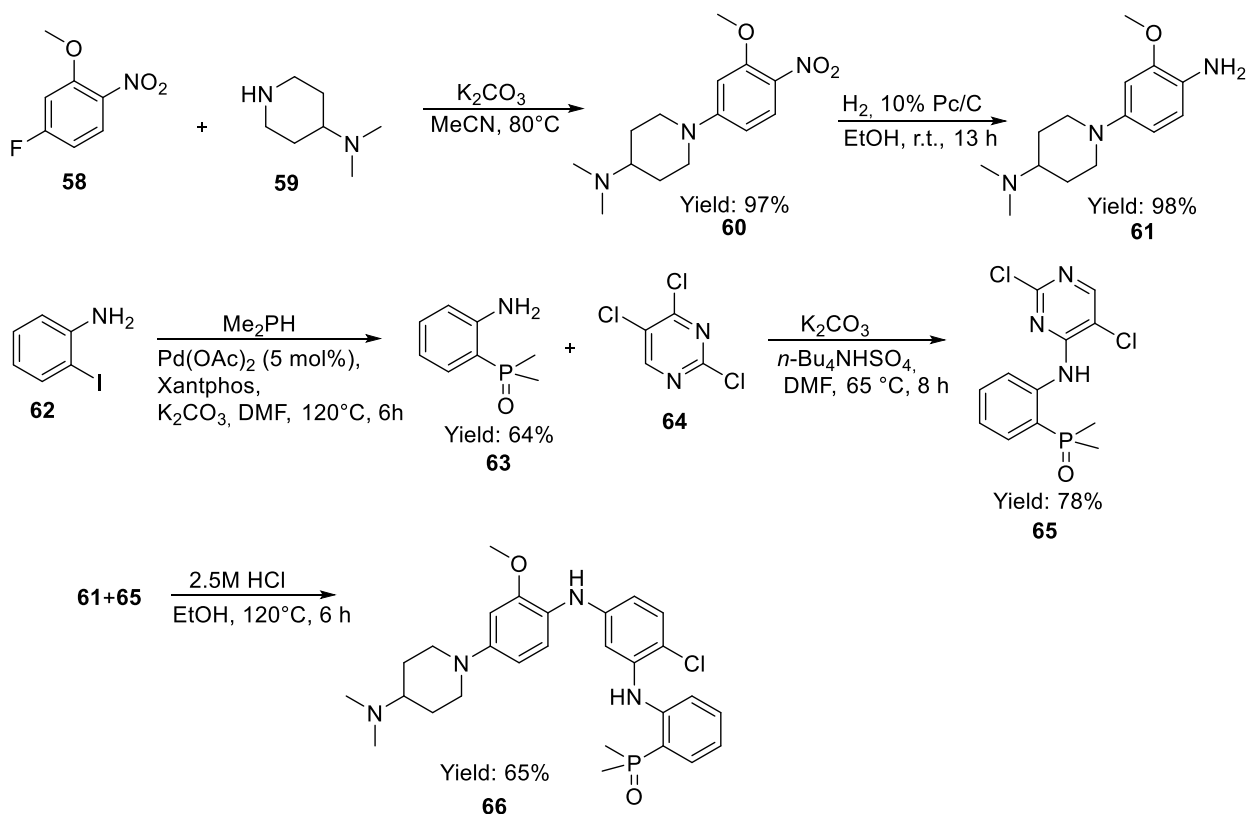
Схема 6



### 1.4.6 Диметилфосфиноксидзамещенные производные анилина и пиридина

Результаты скрининга, полученные в результате эксперимента показали, что клинически одобренный ингибитор ALK бригаитиниб обладает умеренным ингибирующим действием на EGFR<sup>C797S/T790M/del19</sup>. Это побудило авторов публикации [32] модифицировать бригаитиниб с целью повышения активности в отношении мутантной формы EGFR. В результате оптимизации авторы пришли к соединению **66**, и активность соединения возросла, его IC<sub>50</sub> = 59,1 нМ (бригаитиниб: IC<sub>50</sub> = 67,2 нМ). Синтетическая последовательность представлена на схеме 7.

Схема 7



Нуклеофильным замещением атома фтора в соединении **58** было получено соединение **60** с высоким выходом. Восстановление нитро-группы водородом палладием на угле привело к амину **61** к первому билдинг-блоку.

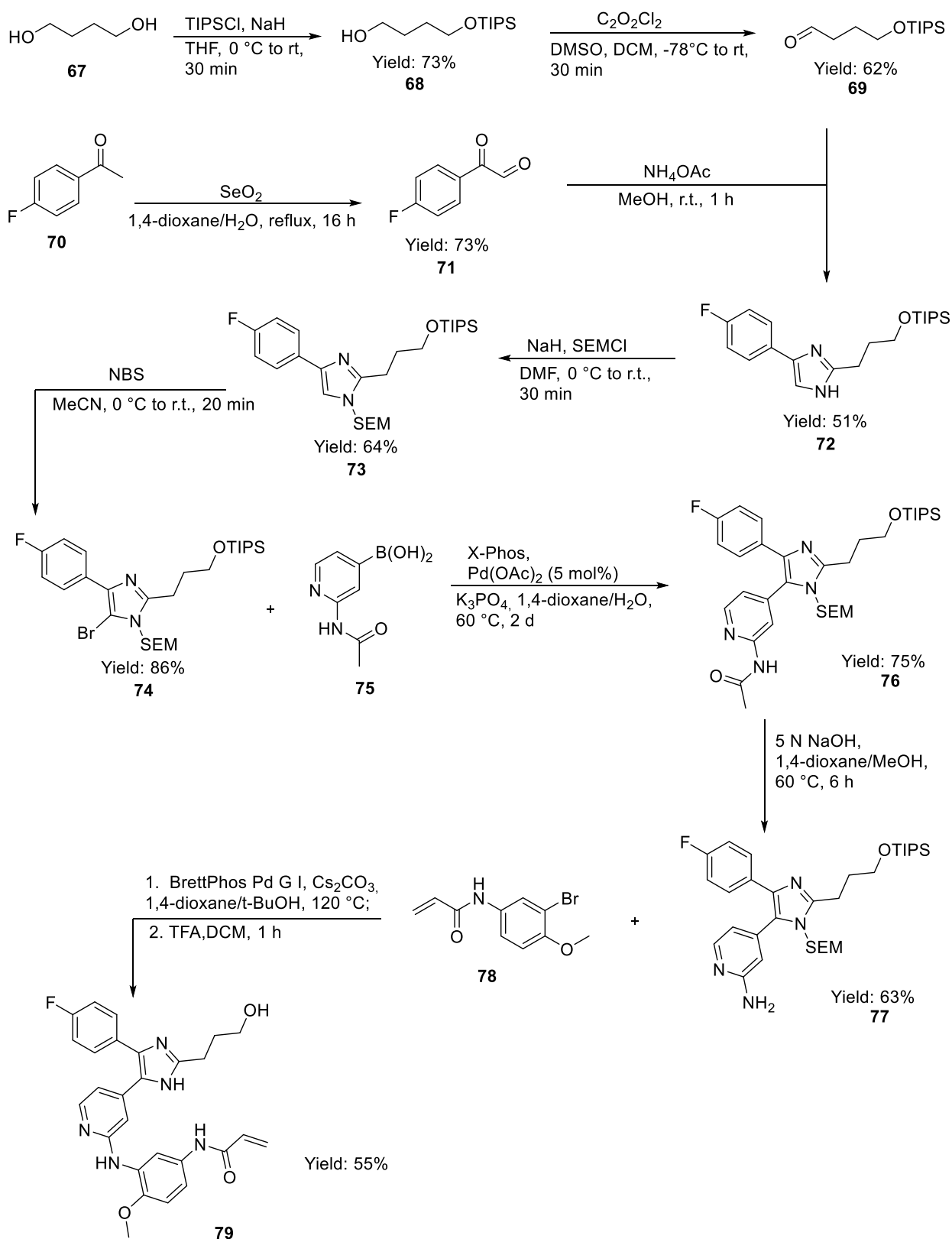
Реакция с диметилфосфином, катализируемая палладием, привела к **63** соединению, нуклеофильное замещение атома хлора в 4-м положении пиримидина **64** привела к второму билдинг-блоку **65**. Объединение двух билдинг-блоков реакцией аминирования при кипячении в спирте привело к получению целевого соединения **66**.

#### 1.4.7 Производные трехзамещенных пиридинимидазолов

Авторы публикации [33] сообщили о новом высокоэффективном, малотоксичном ингибиторе EGFR с наномолярной концентрацией на основе трехзамещенного имидазольного скаффолда. Авторы отталкивались от исследования, проведенного в статье [34], где был найден при помощи виртуального скрининга, а затем синтезирован и охарактеризован высокоактивный ингибитор р38. Изучив его скаффолд, авторы пришли к выводу, что заместитель в 4-м положении имидазола может обеспечить селективность к гейткиперской аминокислоте – треонину (при мутации T790M), а заместитель в 5-м положении обеспечит доступ к серину (при мутации C797S). Таким образом, проведя серию модификаций, авторы открыли ковалентный ингибитор EGFR **79**, который эффективен в отношении тройного мутанта EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup>. Синтез **79** соединения изображен на схеме 8. Селективная защита одной гидроксигруппы в 1,4-бутандиоле **67** проводилась для того, чтобы окислить вторую гидроксигруппу до альдегида **69**. Коммерчески доступный *para*-фторацетофенон был преобразован в кетоальдегид **71** с использованием диоксида селена в смеси диоксан/вода. Конденсацией соединений **71** и **69** с ацетатом аммония был получен замещенный имидазол **72**. *N*-защита имидазольного цикла с помощью SEM хлорида с последующим электрофильным бромированием с помощью NBS привело к ключевому промежуточному соединению **74**, которое затем вводили в реакцию Сузуки с 2-аминопиридин-4-бороновой кислотой **75**. Полученное в результате кросс-сочетания соединение **76** подвергали щелочному гидролизу для получения

амина **77**, который затем использовали для аминирования по Бухвальду–Хартвигу. Снятие всех защитных групп привело к ингибитору **79**.

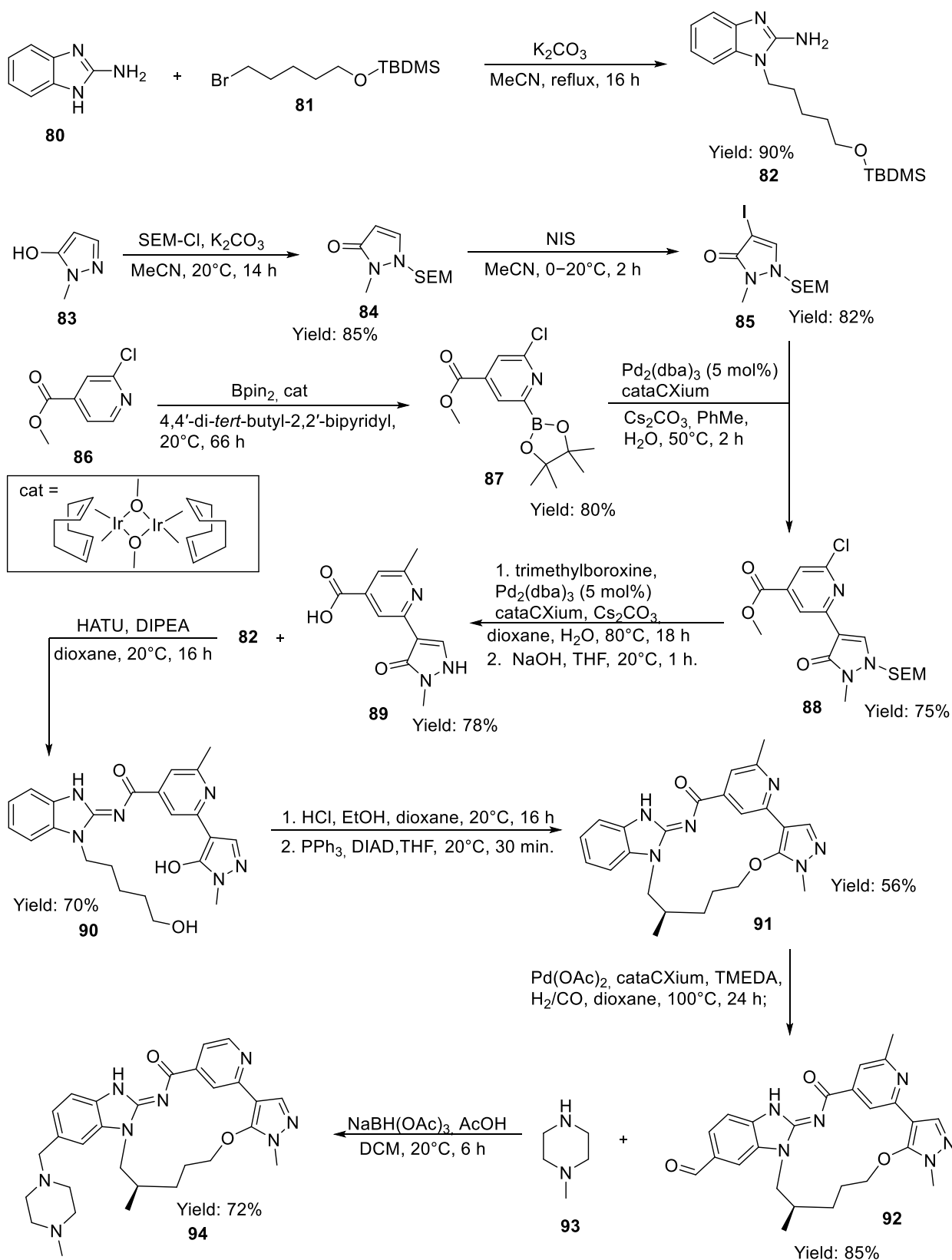
### Схема 8



### 1.4.8 Производные бензимидазола

При создании ингибиторов EGFR важно избегать нацеливания на дикий тип киназы. Авторы публикации [35] описывают открытие нековалентного макроциклического высокоселективного ингибитора **94**, нацеленного на EGFR<sup>C797S/T790M/del19</sup>, и в то же время имеющего низкую активность в отношении EGFR wt. Соединение **94** индуцирует регрессию опухоли в моделях ксенотрансплантата EGFR<sup>C797S/T790M/del19</sup>. В целом, макроциклизация целевых соединений делает их более конформационно жесткими, что увеличивает их аффинность в каталитическом сайте киназы, это приводит к значительному повышению эффективности *in vivo* и *in vitro*.

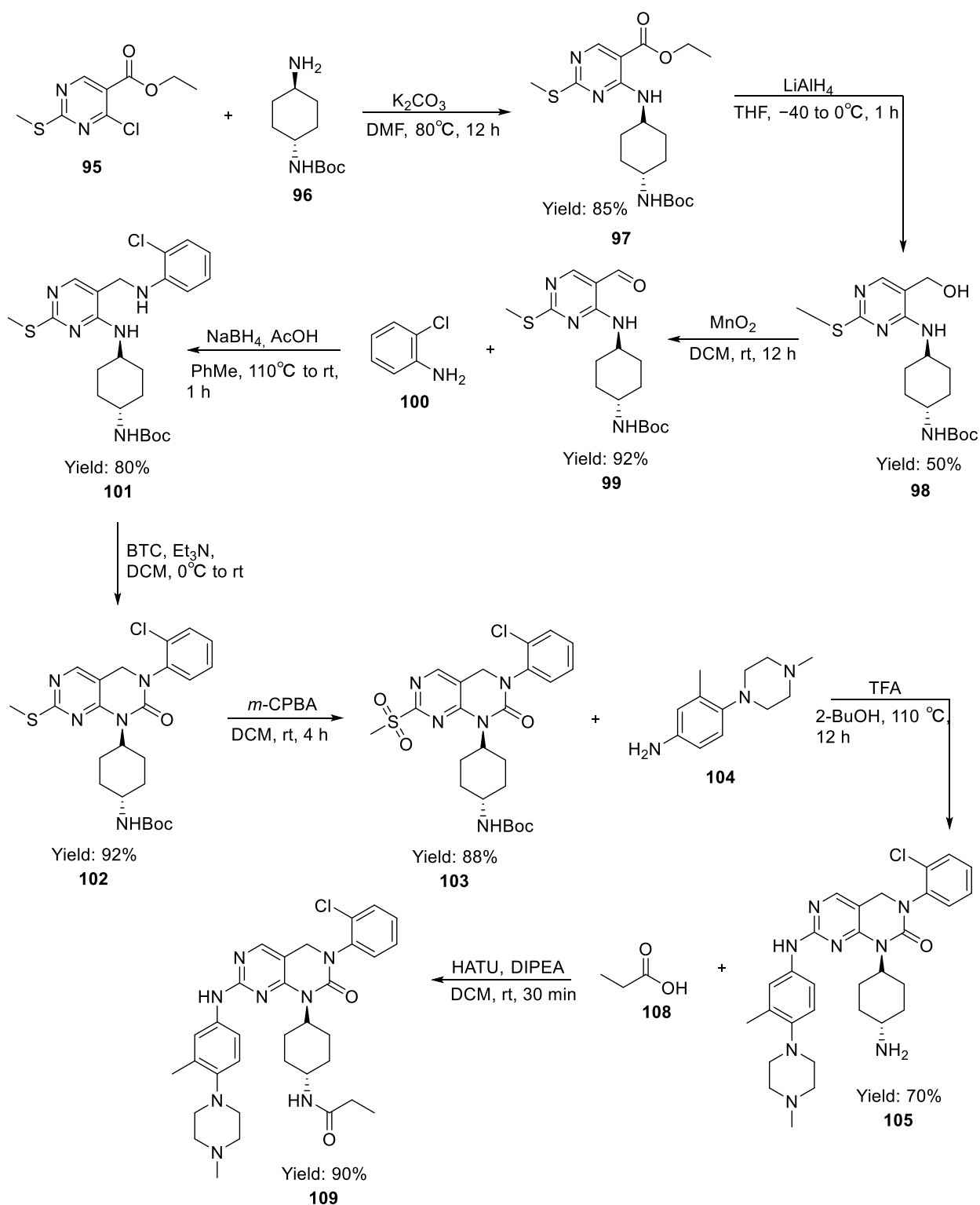
Синтез ингибитора **94** представлен на схеме 9. Алкилирование атома азота в бензимидазоле **80** защищенным по гидроксигруппе 5-бромпентанолом **81** приводит к соединению **82**, которое является первой частью будущего ингибитора. Затем по реакции Сузуки с синтезированным ранее метил изоникотинатом **87**, авторы получают соединение **88**, гидролизуют его сложноэфирную группу, получают карбоновую кислоту **89**. Соединение **89** под действием активатора карбоновой кислоты NATU подвергают реакции амидирования с полученным ранее соединением **82**. При действии соляной кислоты в этиловом спирте на ключевой интермедиате **90** происходит образование внутримолекулярной простоэфирной связи, а затем промежуточное соединение вводят в реакцию Мицунобу, что приводит к получению макроциклического соединения **91**. По реакции формилирования, катализируемой ацетатом палладия, получают альдегид **92**, который при реакции с *N*-метилпиперазином в условиях восстановительного аминирования дает целевой ингибитор **94** с выходом 72%.



### 1.4.9 Производные 5–метилпиримидопиридона

Авторы публикации [36] идентифицировали новый ингибитор с пиридо[2,3-*d*]пиримидин–7–оном в качестве скаффолда (соединение **109**). Соединение **109** сильно ингибировало EGFR<sup>C797S</sup> мутантную киназу со значением IC<sub>50</sub> = 5,8 нМ и сильно подавляло пролиферацию клеток ВаF3, несущих мутации EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> и EGFR<sup>19D/T790M/C797S</sup> со значениями IC<sub>50</sub> = 0,51 и 0,32 мкМ соответственно. Более того, ингибитор **109** также продемонстрировал молекарственное противоопухолевое действие *in vivo* в отношении мышинной модели ксенотрансплантата клеток ВаF3 с мутацией EGFR<sup>19D/T790M/C797S</sup>. Однако данное соединение нуждается в дополнительном изучении и оптимизации по повышению селективности, чтобы избежать нецелевого воздействия на некоторые другие киназы. Синтез соединения **109** показан на схеме 10.

Коммерчески доступный этил 4–хлор–2–(метилтио)–пиримидин–5 карбоксилат **95** прореагировал с 1–Вос–1,4–циклогександиамином **96**. Затем продукт **97** подвергали восстановлению с помощью литий алюмогидрида, окислению до альдегида **99**, который вводили с *орто*–хлоранилином в реакцию восстановительного аминирования с образованием **101**. Циклизация **101** с трифосгеном приводила к образованию ключевого пиримидопиримидинона **102**. Далее следовало окисление метилтиопиримидина под действием *мета*–хлорпербензойной кислоты до сульфона **103**. Реакция нуклеофильного замещения, а также снятие *трет*–бутоксикарбонильной группы, приводила к соединению **105**. Завершающей стадией является ацилирование амина **105** пропионовой кислотой **106** под действием активатора карбоновой кислоты NATU в присутствии основания Хюнига. Целевой продукт **107** был получен с высоким выходом 90%.





## **2 Результаты и их обсуждение**

Рецепторные тирозинкиназы занимают важное место в регуляции различных сигнальных каскадов. Связывание лиганда запускает активацию тирозинкиназного домена, который посредством фосфорилирования активирует нижележащие мишени, что в конечном итоге приводит к клеточному росту, пролиферации, выживаемости, подвижности.

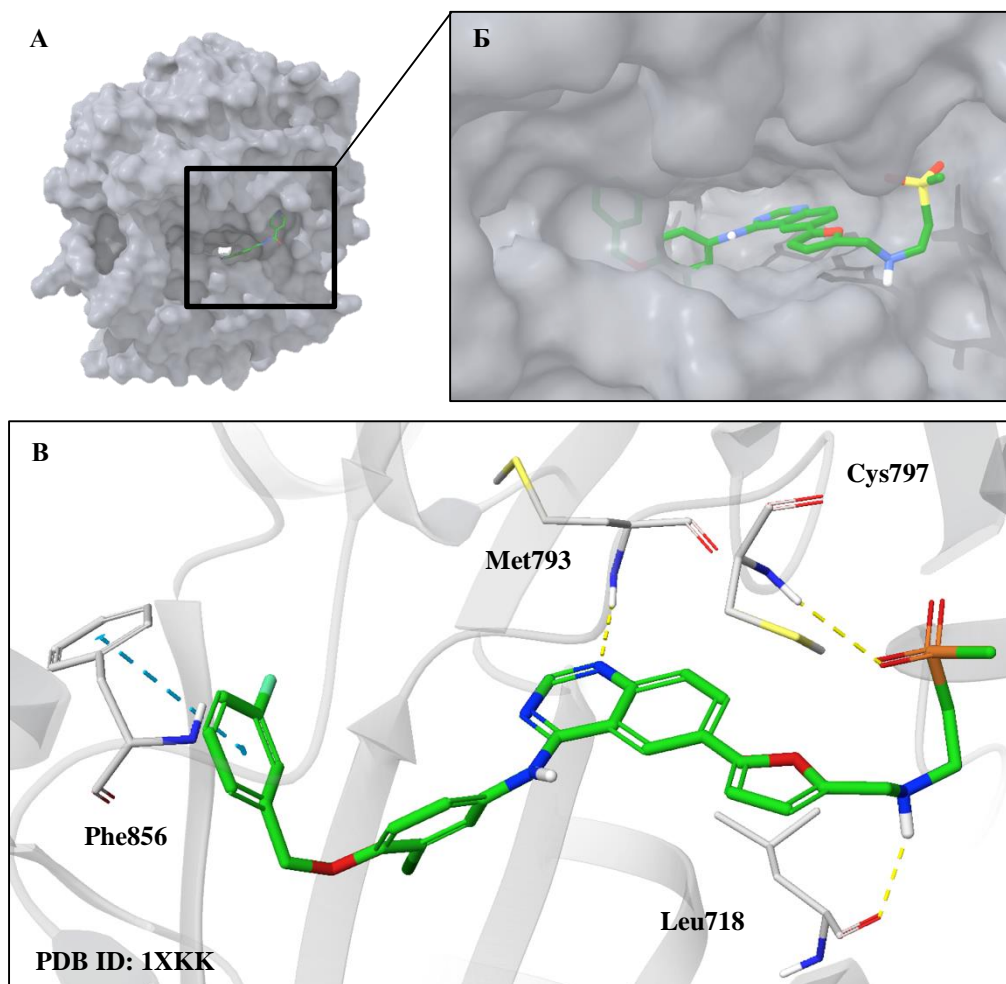
Гиперактивация рецептора эпидермального фактора роста приводит к развитию немелкоклеточного рака легкого. Существуют клинически одобренные ингибиторы тирозинкиназы, успешно применяемые в терапии рака. Но постоянное применение известных ингибиторов неизбежно приводит к развитию резистентности, что вынуждает исследователей разрабатывать всё новые низкомолекулярные препараты. Также всё еще существует потребность в модификации уже существующих ингибиторов для улучшения их физико-химических свойств и их эффективности.

Лапатиниб является двойным ингибитором EGFR/HER2, обладающим низкой растворимостью, что ограничивает его терапевтическую дозу. Модифицированный лапатиниб может стать отправной точкой для дизайна новых ингибиторов EGFR. Наше исследование было направлено на разработку новых производных лапатиниба.

### **2.1 Молекулярный дизайн новых производных лапатиниба**

#### **2.1.1 Молекулярное моделирование**

В рамках части работы, посвященной молекулярному моделированию, был проведен анализ режима связывания лапатиниба в активном сайте киназного домена EGFR (PDB ID: 1XKK) [37] (рисунок 4).



А – Структура киназного домена EGFR (PDB ID: 1XKK); Б, В – режим связывания лапатиниба в активном сайте киназного домена EGFR.

Рисунок 4 – Режим связывания лапатиниба в активном сайте киназного домена EGFR; желтый пунктир – водородные связи, голубой пунктир –  $\pi$ - $\pi$  стэкинг.

Можно обратить внимание, что данное соединение простирается далеко вглубь сайта связывания, где имеет место быть  $\pi$ -стэкиновое взаимодействие между ароматической системой Phe856 и фторзамещенным фенилом кристаллического лиганда. Связь с остатком Met793 осуществляется за счет акцепторного азота 4-амино-хиназолинового ядра, а 2-(метилсульфонил)этан-1-аминный фрагмент, ориентирующийся в область, доступную для растворителя и соединенный с хиназолином через фурановое кольцо, демонстрирует взаимодействия с остатками Leu718 и Cys797.

На рисунке 5 представлена схема модификации лапатиниба, а в качестве исследуемых соединений рассматриваются различные гидразоны и оксим.

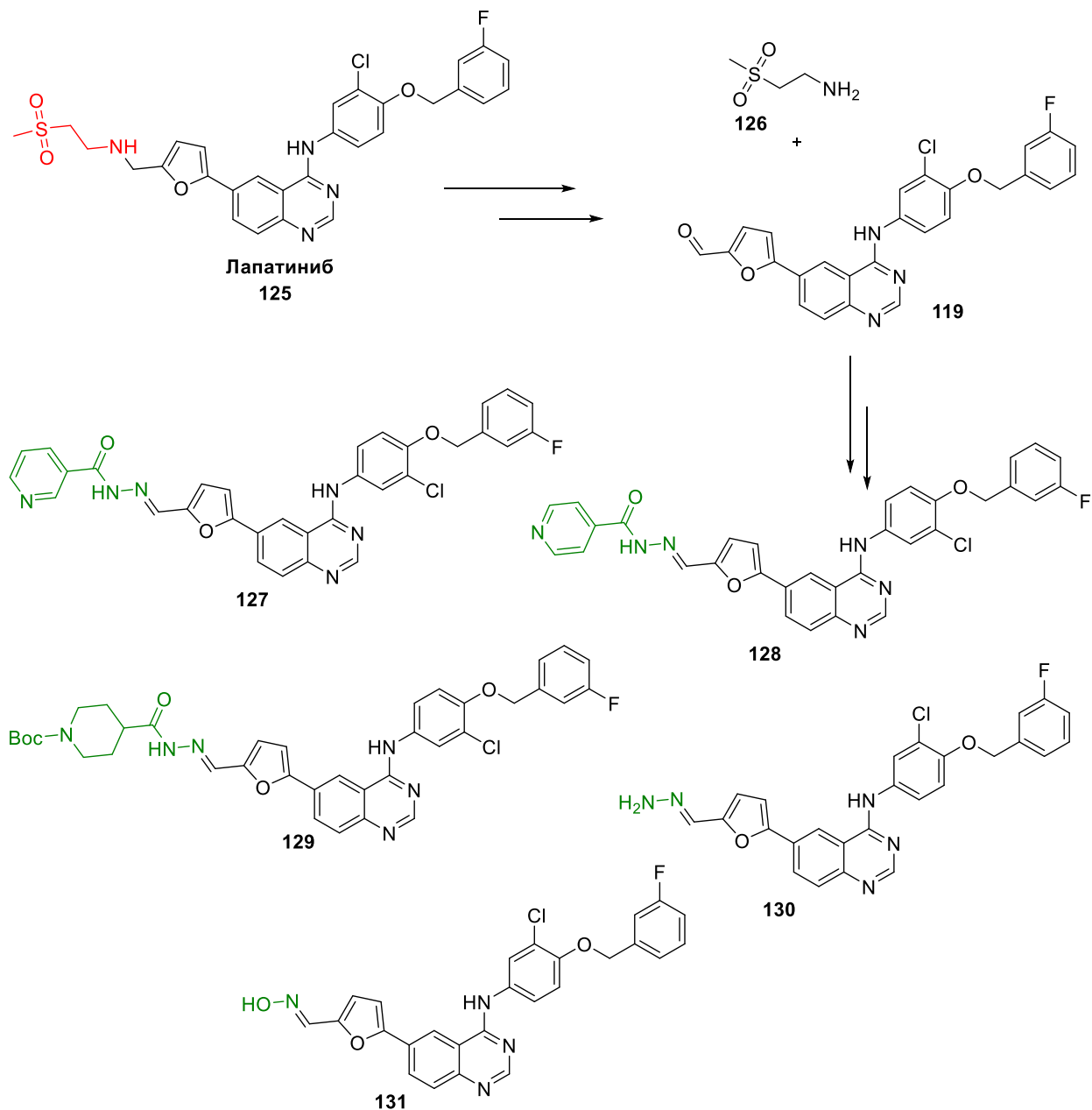


Рисунок 5 – Схема модификации лапатиниба

Предваряя синтетические усилия, нами был выполнен молекулярный докинг серии из пяти аналогов лапатиниба с целью определить возможные режимы и энергетику связывания исследуемых соединений. Часть молекулы

кристаллического лиганда, расположенная в зоне сольватации была идентифицирована как удобный мотив для модификаций.

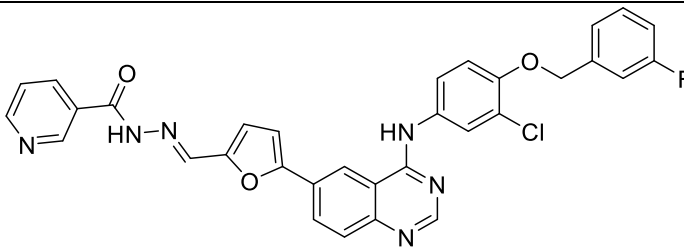
Кристаллическая структура киназного домена EGFR (PDB ID: 1XKK [37]), депонированная в RCSB PDB [38] с разрешением 2.40 Å, была загружена и подготовлена с использованием модуля Protein Preparation Wizard [39] пакета Schrodinger Suite: добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи аминокислот, уточнены порядки связей. Кристаллизационная вода удалена.

Лиганды были подготовлены с помощью модуля LigPrep: определены трехмерные структуры и состояния протонирования в диапазоне pH 7±2 с помощью алгоритма Epik [40].

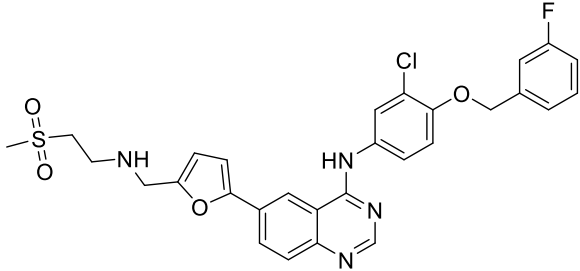
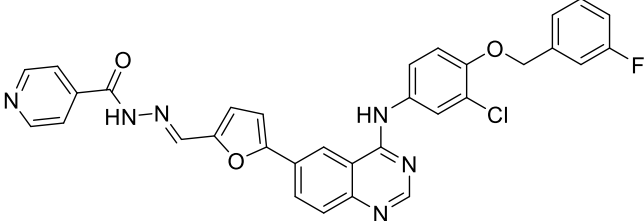
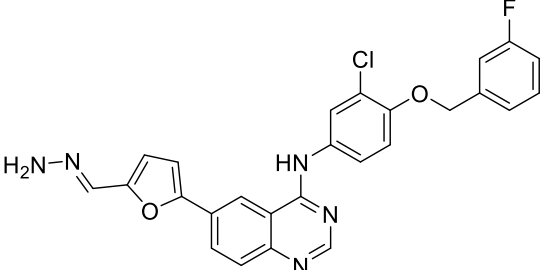
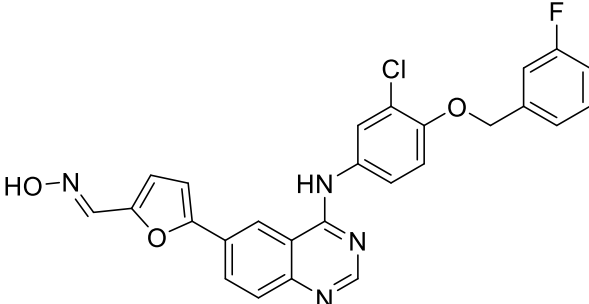
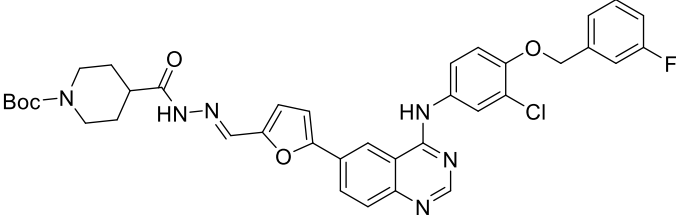
Модуль Receptor Grid Generation использовался для построения сетки потенциалов. Область стыковки определялась как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с центром масс лапатиниба. Докинг осуществлялся с помощью алгоритма Glide [41] в режиме точности Glide XP [42] с подвижным лигандом. Лапатиниб был предварительно удален из структуры комплекса и также пристыкован. Дополнительно модулем Prime были рассчитаны значения свободных энергий связывания методом MM GBSA.

Результаты стыковки, подвергнутые ранжированию по значению XP GScore, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты молекулярного докинга

Код соединения	Структура	XP GScore, ккал/моль	$\Delta G_{\text{bind}}$ MMGBSA, ккал/моль
1	2	3	4
RSF-44		-14.112	-106.33

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Лапатиниб		-13.313	-97.56
RSF-45		-13.295	-86.85
RSF-31		-13.016	-103.28
RSF-32		-12.678	-98.84
RSF-46		-12.635	-104.23

Можно обратить внимание, что все соединения показали сходный диапазон значений как XP GScore, так и  $\Delta G$  MM GBSA (в меньшей степени). Данный факт можно связать с внушительным вкладом в связывание части молекулы, стыкующийся в глубине сайта; геометрия данного фрагмента всех

структур практически полностью совпадает с таковой для нативного лиганда (рисунок 7).

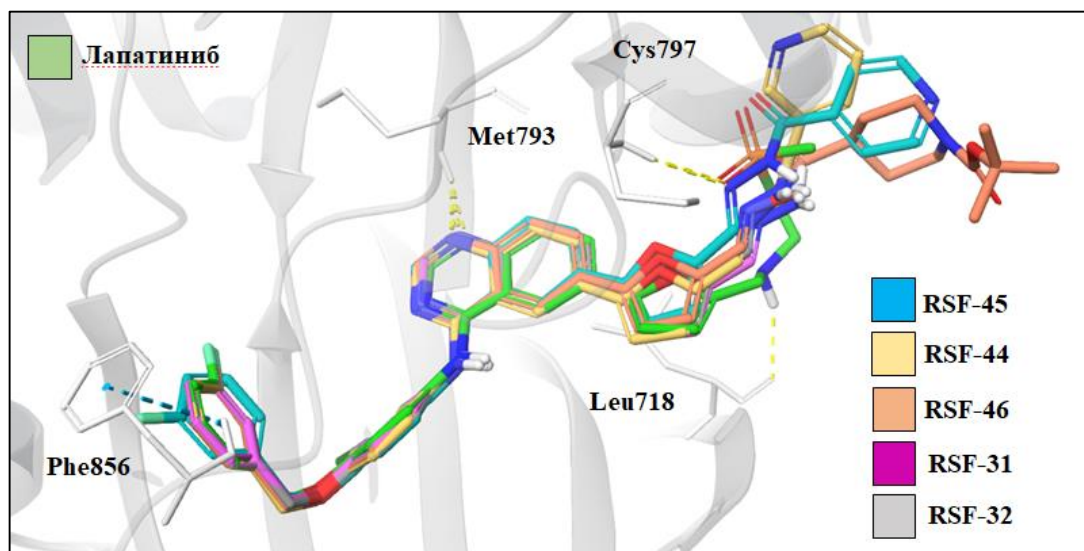


Рисунок 7 – Наложение структур исследуемых соединений и лапатиниба в связывающих конформациях в активном сайте EGFR; желтый пунктир – водородные связи, голубой пунктир –  $\pi$ - $\pi$  стэкинг.

На рисунке 8 представлен режим связывания абсолютного лидера–соединения **127** (с кодом RSF-44). Сравнивая между собой паттерны взаимодействий данной структуры и лапатиниба, стоит отметить, что водородные связи с Phe856 и Met793 сохраняются, однако фрагмент гидразида никотиновой кислоты, простирающийся за пределы сайта не связывается ни с Cys797, ни с Leu718. Протон гидразинного азота является донором водородной связи с Asp800, а 3–пиримидиновое кольцо удачно укладывается в локальный карман на поверхности EGFR, где имеет место быть  $\pi$ -стэкиновое взаимодействие с Tyr998.

Интересно, что несмотря на меньшее количество водородных связей по сравнению с нативным лигандом, значение дескриптора функции XP GScore, кодирующего вклад этого типа взаимодействий, у соединения RSF-44 лучше:

XP HBond = -0.998 ккал/моль и -0.700 ккал/моль для RSF-44 и лапатиниба, соответственно.

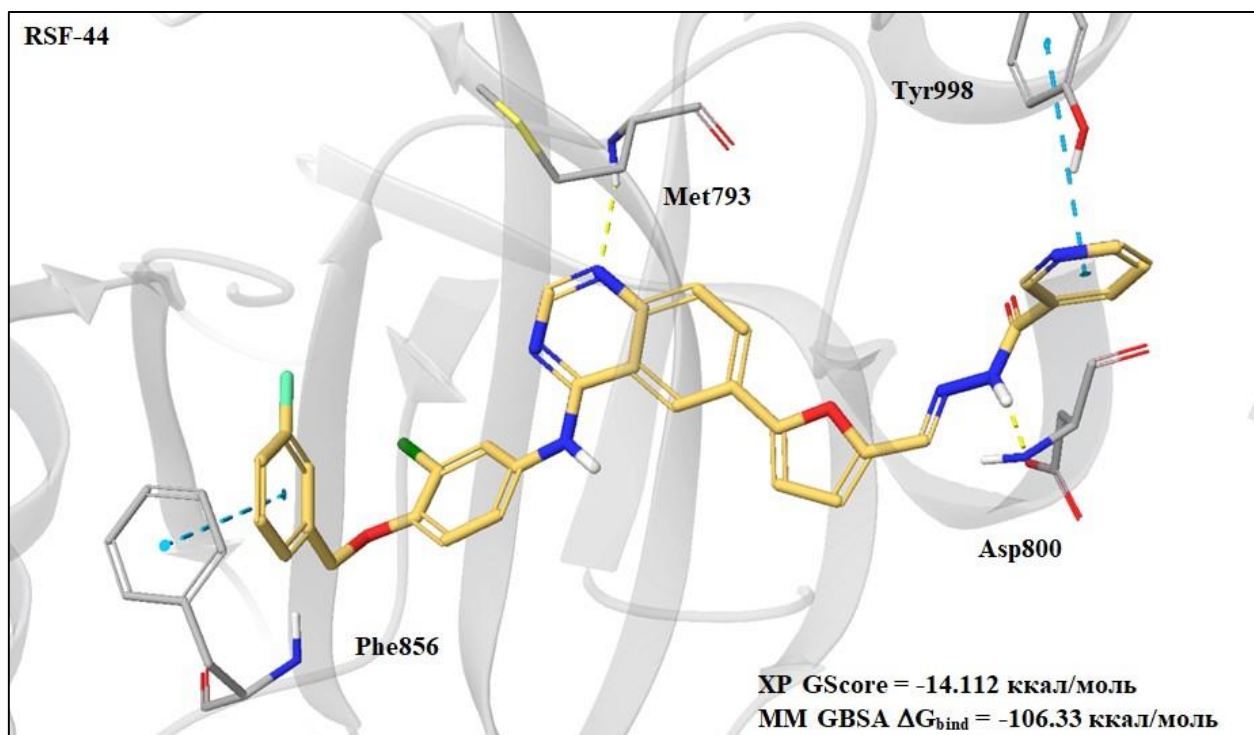
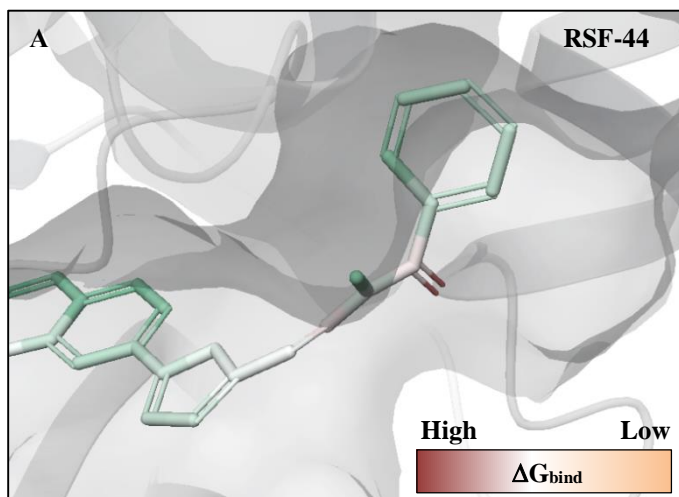
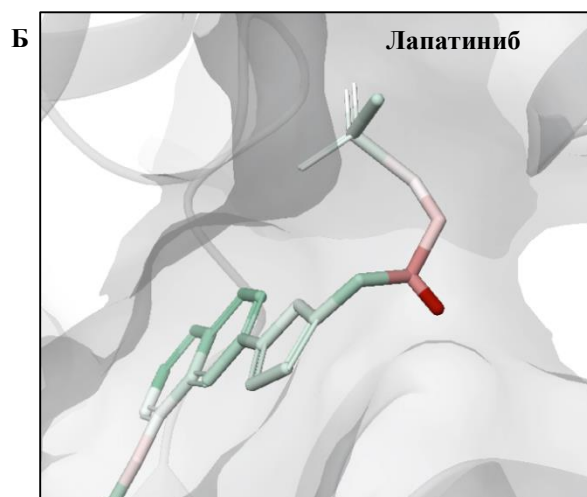


Рисунок 8 – Режим связывания соединения RFS-44 в активном сайте EGFR; желтый пунктир – водородные связи, голубой пунктир –  $\pi$ - $\pi$  стэкинг.

Обращаясь к значениям свободной энергии Prime, можно сказать, что связывание фрагмента гидразида является гораздо более выгодным событием, чем связывания аминоксодержащего сульфона, с точки зрения сольватации ( $\Delta G_{\text{bind}} \text{ SolvGB}$ ), липофильности ( $\Delta G_{\text{bind}} \text{ Lipo}$ ) и электростатики ( $\Delta G_{\text{bind}} \text{ Coulomb}$ ) (рисунок 9).



MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{Lipo}} = -43.80$  ккал/моль  
 MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{Coulomb}} = -21.60$  ккал/моль  
 MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{SolvGB}} = 35.55$  ккал/моль



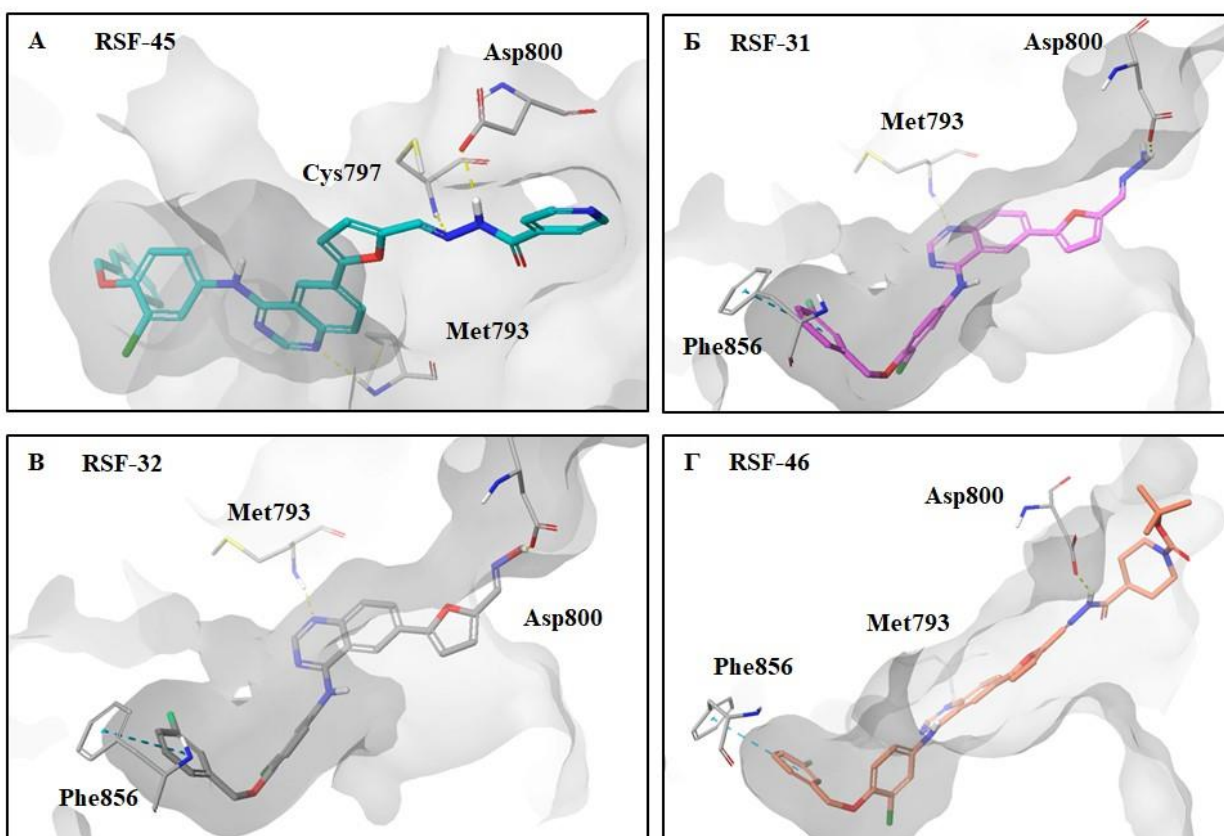
MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{Lipo}} = -36.82$  ккал/моль  
 MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{Coulomb}} = -20.60$  ккал/моль  
 MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{SolvGB}} = 38.07$  ккал/моль

А – RSF-44; Б – лопатиниб.

Рисунок 9 – Визуализация атомных вкладов в свободную энергию связывания MM GBSA  $\Delta G_{\text{bind}}$  для RSF-44 и лопатиниба, а также значения некоторых энергетических терминов Prime.

Остальные представители серии исследуемых соединений показывают не такие аффинные режимы связывания. Ближайший аналог RSF-44 – производное гидразида изоникотиновой кислоты образует одно дополнительное взаимодействие с остатком Cys797, однако теряет выгодную упаковку пиримидинового цикла; кроме того в случае данного соединения наблюдается инверсия ориентации фторзамещенного бензольного фрагмента в глубине сайте, ведущее к потере стэкинга. RSF-31 и -32 связываются с Asp800, но не показывают каких-либо дополнительных контактов (особенно – гидрофобных взаимодействий) на внешней поверхности EGFR. Ориентация Вос-группы RSF-46 в полярную область растворителя также не является выгодной с точки зрения энергии (рисунок 10).





А – Режим связывания RSF-45; Б – режим связывания RSF-31; В – режим связывания RSF-32; Г – режим связывания RSF-46.

Рисунок 10 – Режимы связывания исследуемых соединений в активном сайте EGFR; желтый пунктир – водородные связи, голубой пунктир –  $\pi$ - $\pi$  стэкинг.

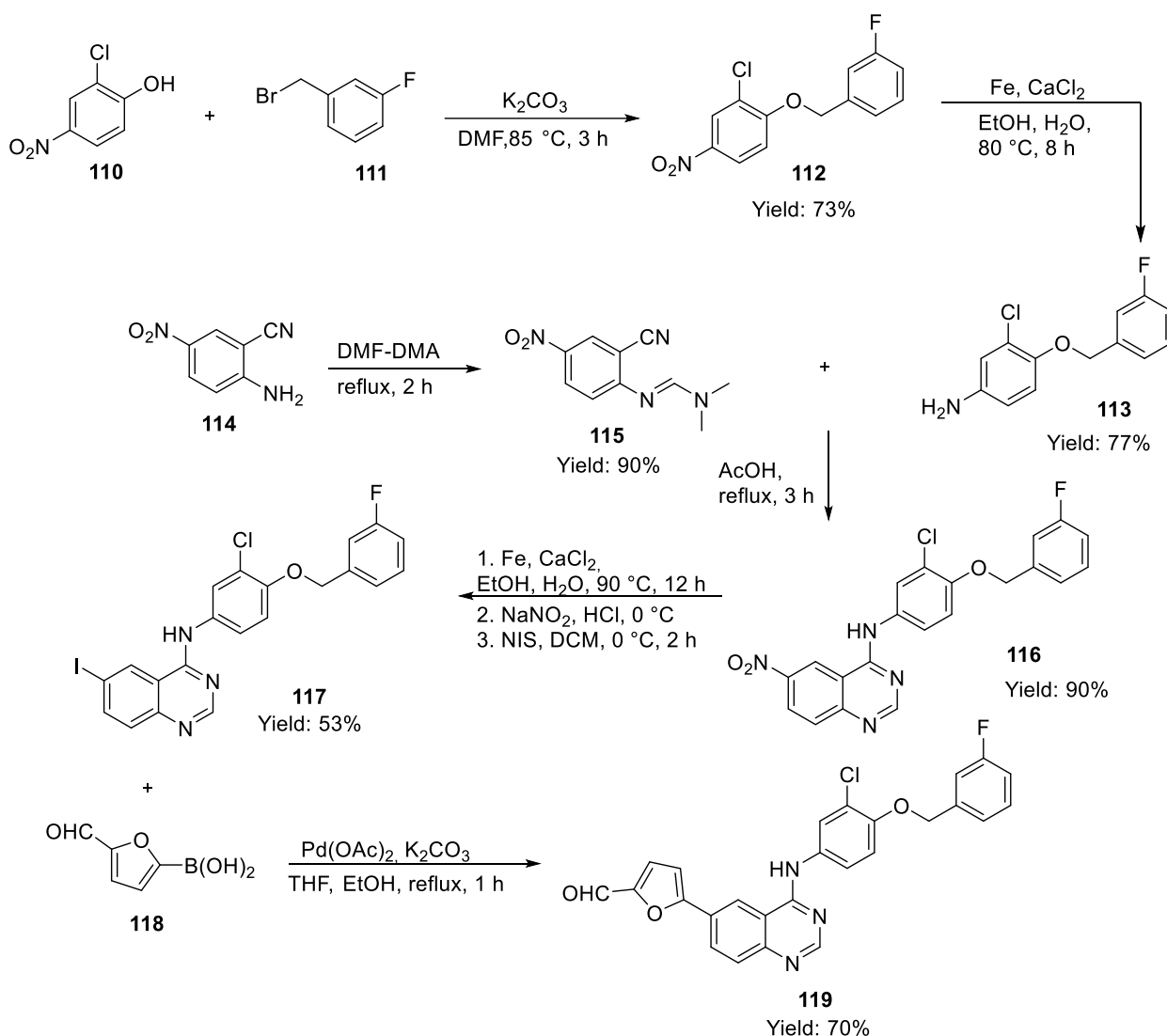
## 2.2 Синтез исследуемых соединений

Исходным соединением для синтеза всей молекулы лапатиниба является замещенный фурфурол. Для получения самого лапатиниба ключевой стадией синтеза является реакция восстановительного аминирования между замещенным фурфуролом и сульфонамином. В ходе данной работы для синтеза различных производных также был предварительно получен данный альдегид (схема 11). Полный синтез лапатиниба представлен в публикации [43].

Реакция Вильямсона между фенолом **110** и галоген бензолом **111** при нагревании в ДМФ в течение 3 часов привела к образованию простого эфира

**112.** Нитро–группа соединения **112** была восстановлена под действием железа до amino–группы соединения **113**. Параллельно анилин **114** был превращен в синтетический эквивалент имина со скрытой карбонильной группой соединение **115** при кипячении его в ДМФ–ДМА. При кипячении в уксусной кислоте соединений **113** и **115** при их конденсации был получен хиназолиновый цикл соединения **116**. Нитро–группа соединения **116** была восстановлена также под действием железа, а полученная amino–группа подвергалась реакции диазотирования, с последующим замещением диазогруппы на атом йода при помощи *N*–йодсукцинимиды, вышеописанная трехстадийная последовательность привела к соединению содинению **117**. Заключительной стадией была проведена реакция кросс-сочетания между коммерчески доступной бороновой кислотой **118** и ранее полученным соединением **117** (реакция Сузуки). Целевой альдегид **119** был получен в виде желтого порошка с высоким выходом 70% .

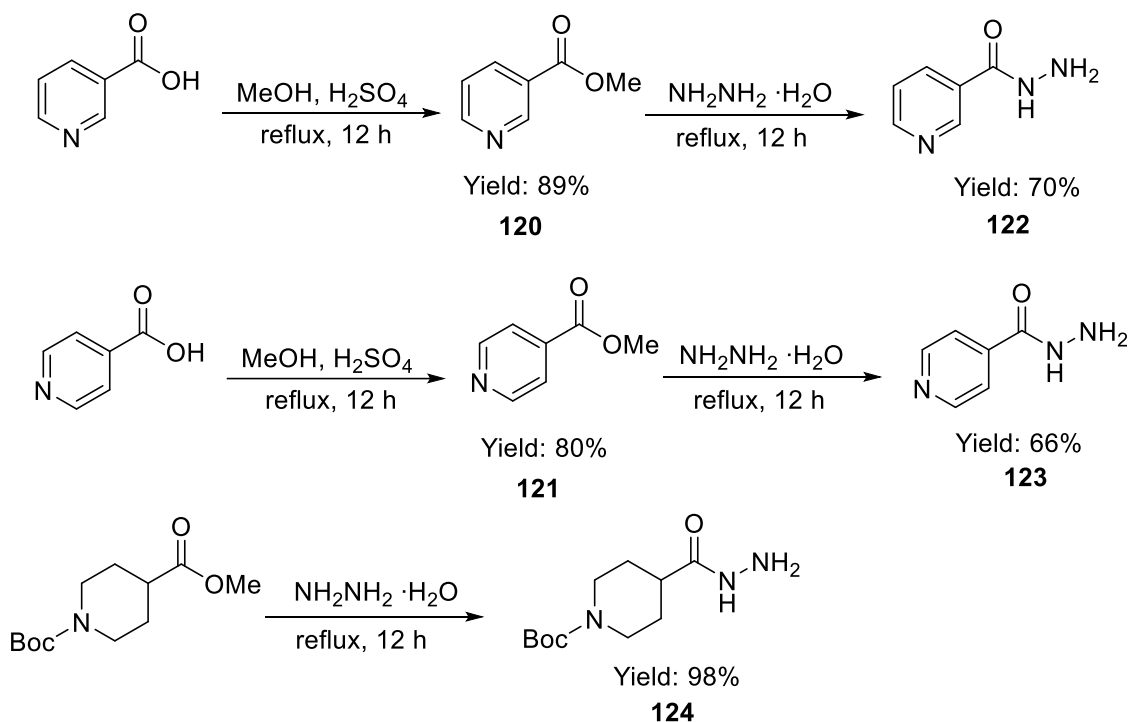
## Схема 11



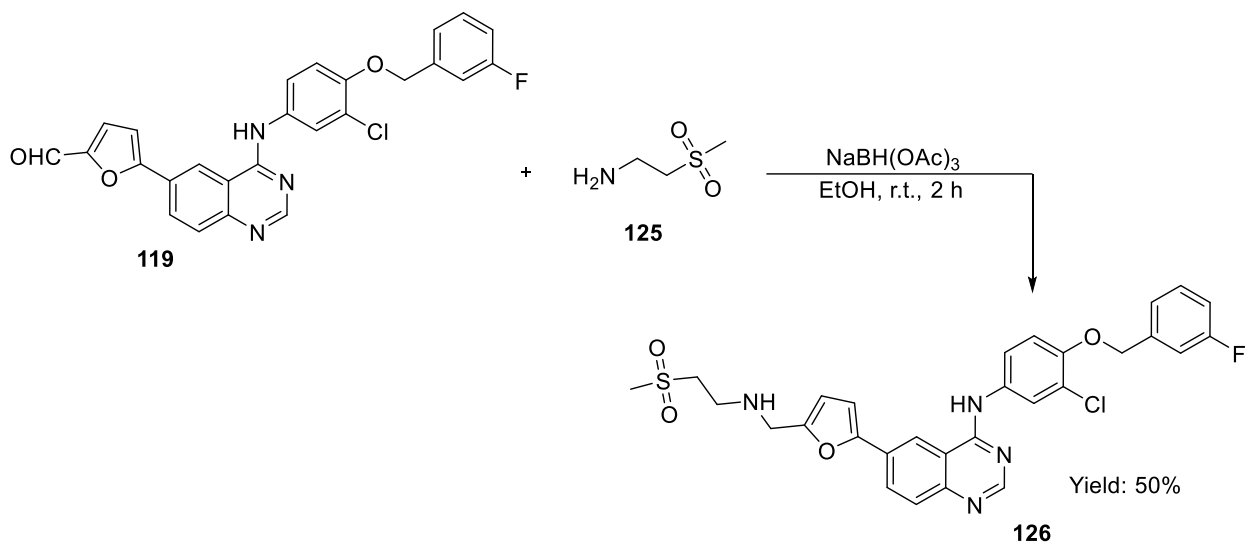
Для получения целевых гидразонов необходимо было получить исходные гидразиды карбоновых кислот. Исходя из изомерных карбоновых кислот (никотиновой и изоникотиновой), по реакции этерификации с метиловым спиртом при кипячении в серной кислоте, были получены их метиловые эфиры. Метиловый эфир Вос–пиперазин карбоновой кислоты коммерчески доступен, поэтому с ним была проведена только реакция аммонолиза, и при действии гидразин–гидрата после 12 часов кипячения был получен гидразид **124**. Гидразиды никотиновой **122** и изоникотиновой **123**

кислот были получены по сходной методике: кипячением их метиловых эфиров в гидразин-гидрате. Синтезы гидразидов представлены на схеме 12.

### Схема 12

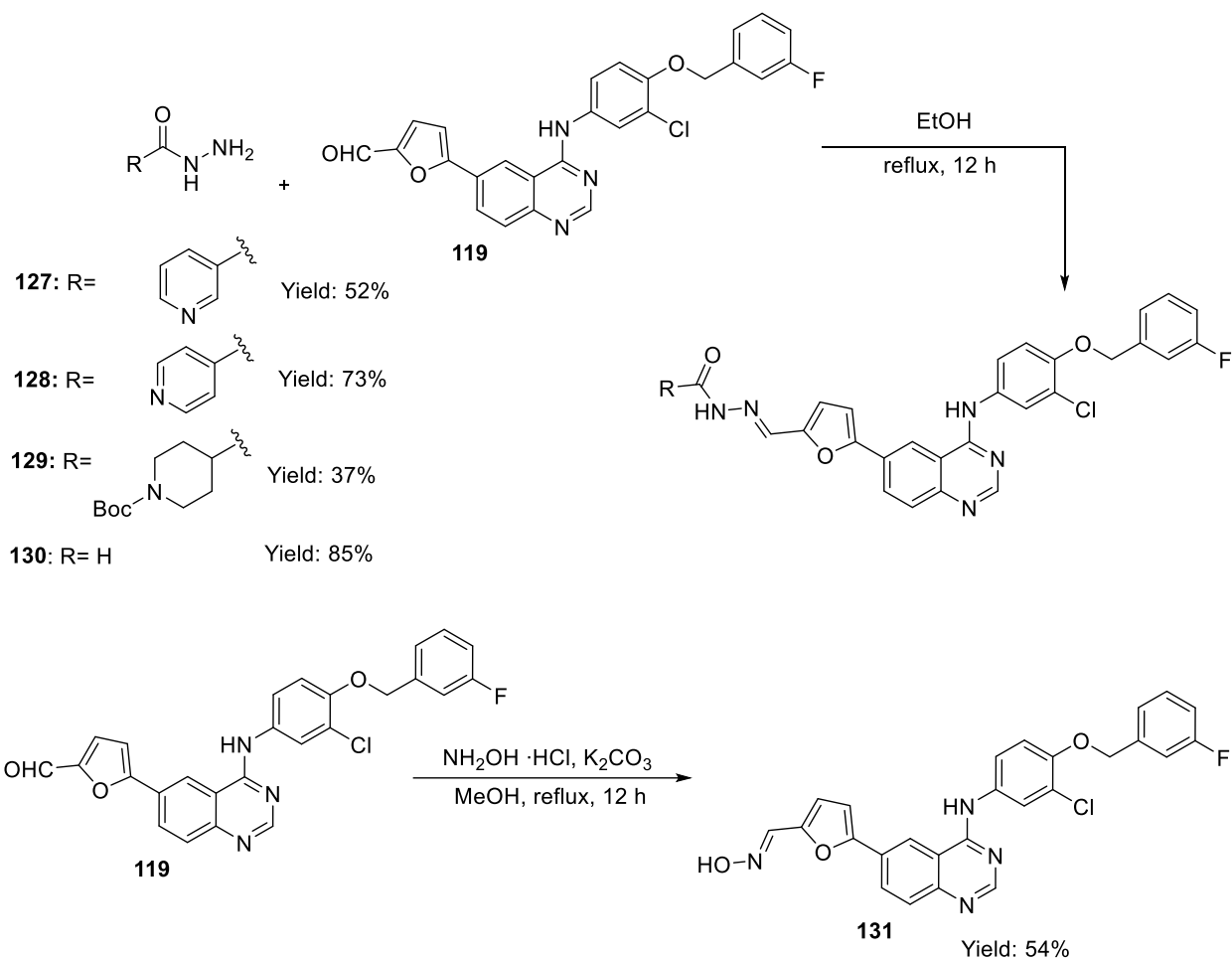


Также для положительного контроля в биологических испытаниях был проведен синтез самого лапатиниба. В этом случае ключевой стадией являлась реакция восстановительного аминирования между альдегидом **119** и сульфонамина **125**. В качестве восстановителя использовался триацетоксиборгидрид натрия, полученный предварительно при взаимодействии боргидрида натрия и ледяной уксусной кислоты. Реакция восстановительного аминирования проводилась при комнатной температуре, целевой лапатиниб **126** был получен с выходом 50% (схема 13).



Все гидразоны (**127–129**) были получены по сходной методике: смесь синтезированного ранее альдегида **119** и необходимый гидразон кипятили в течение 12 часов в этаноле. Выходы варьируются от 37% (в случае гидразона Вос–пиперазин карбоновой кислоты) до 73% (в случае гидразона изоникотиновой кислоты). Незамещенный гидразон **130** получали иначе: к альдегиду **119** добавляли смесь гидразин–гидрохлорида и основания (ацетат калия) для связывания гидрохлорида, кипятили в течение 12 ч в метаноле, выход данной реакции составил 85% (схема 14).

Оксим **131** с умеренным выходом 54% был получен в результате нуклеофильного присоединения гидроксилamina к альдегиду **119**, реакционную смесь кипятили в метаноле в течение 12 часов (схема 14).



### 2.3 Биологические испытания

Ингибирующую активность полученных соединений оценивали путем обработки клеточной линии Ва/Ф3 EGFR wt. Данная клеточная линия была выбрана из-за их особенности: Ва/Ф3 представляет собой мышиную про-В-клеточную линию, выживаемость и пролиферация которой зависят от IL-3. При трансдукции драйверного гена, такого как киназные гены или их мутанты, клетки Ва/Ф3 становятся не IL3-зависимыми, а зависимыми только от драйверных генов. При действии ингибиторов на клетки, оценить эффективность соединений можно по количеству живых клеток, не прибегая к использованию каких-либо иных биологических тестов. Это делает клетки Ва/Ф3 мощным инструментом для открытия новых ингибиторов киназ [44].

Анализ жизнеспособности клеток был осуществлен при помощи CellTiter–Glo. Данный анализ жизнеспособности клеток является люминесцентным гомогенным методом определения количества жизнеспособных клеток на основе количественного измерения присутствующего в лунках с клеточной линией АТФ – индикатора метаболически активных клеток [45].

Кривые доза–эффект для всех соединений представлены на рисунке 11.

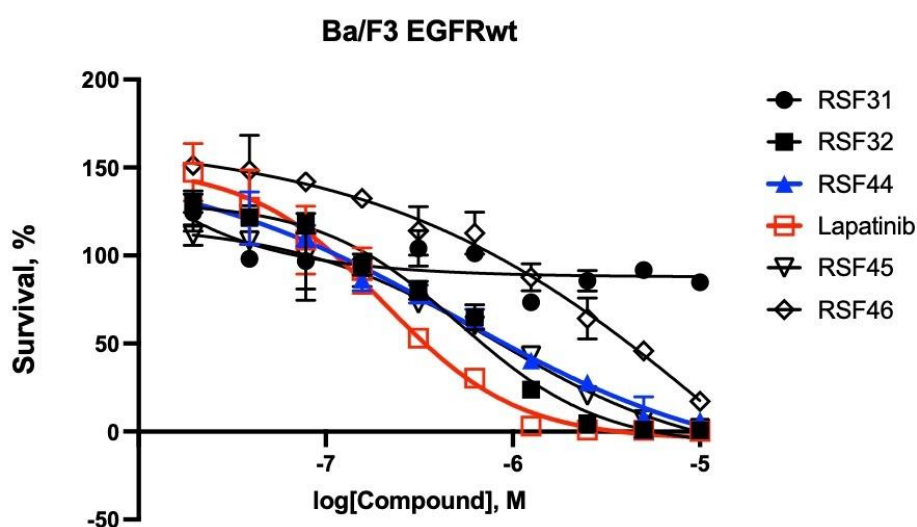


Рисунок 11 – Кривые доза–эффект

На рисунке 12 представлены кривые доза–эффект для каждого соединения.

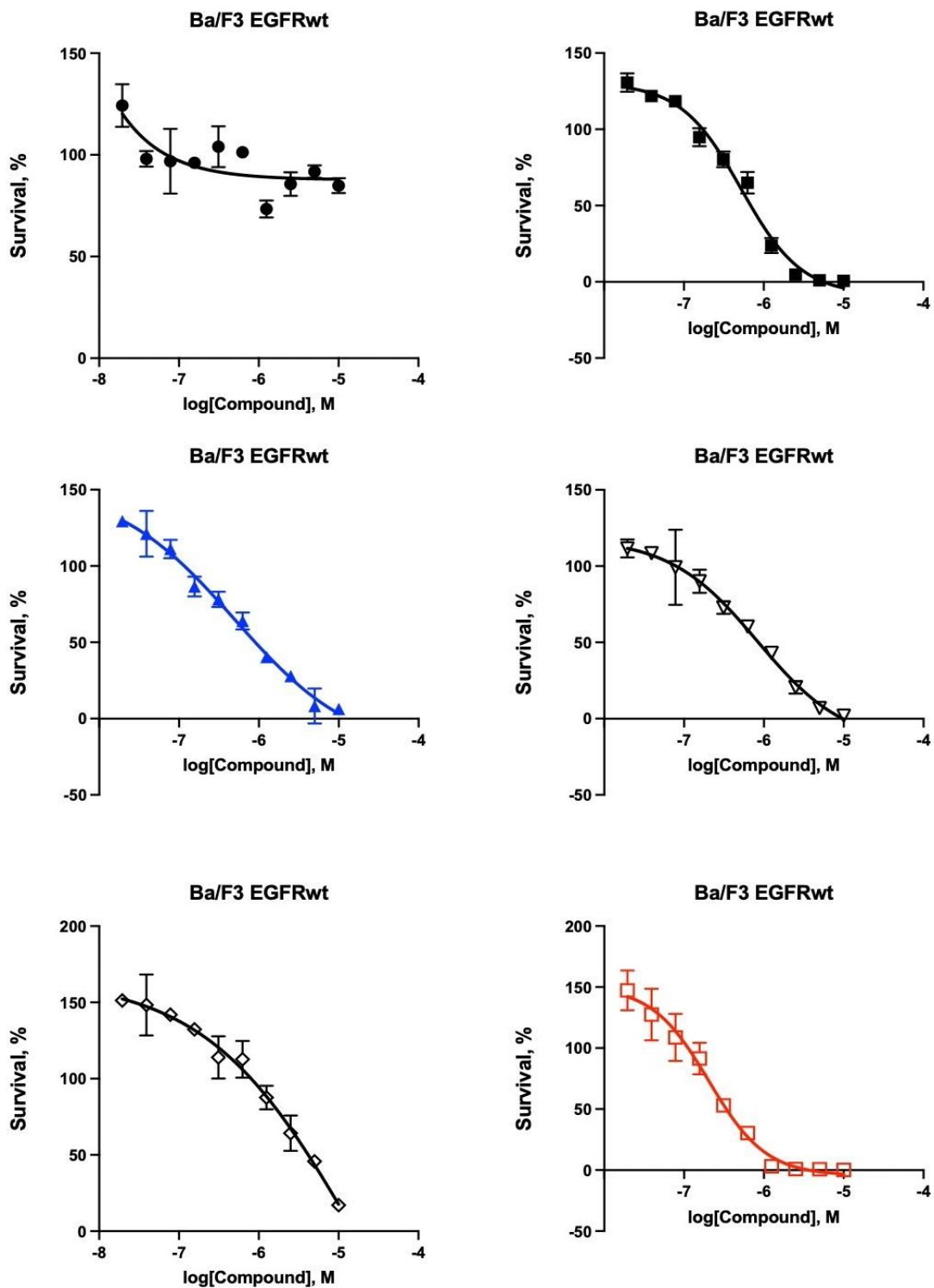
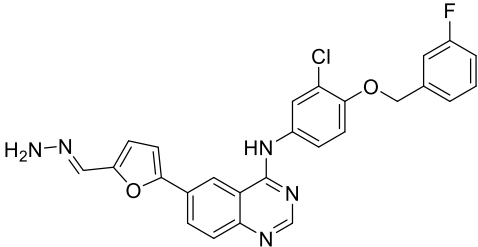
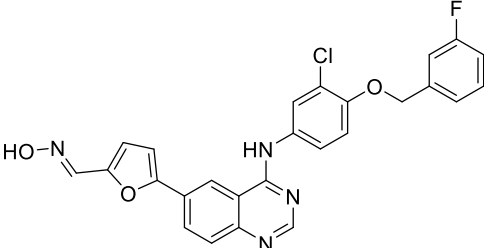
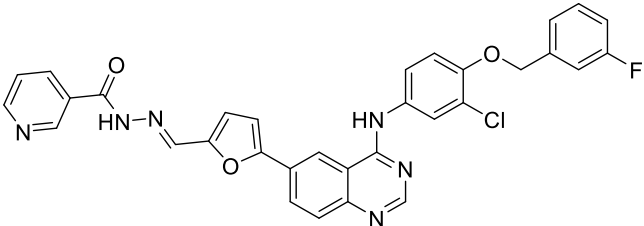
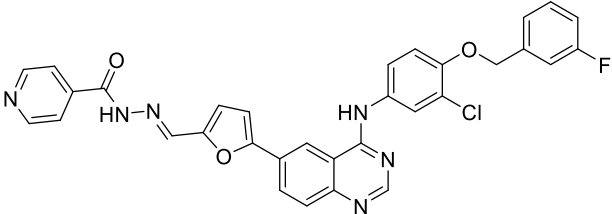
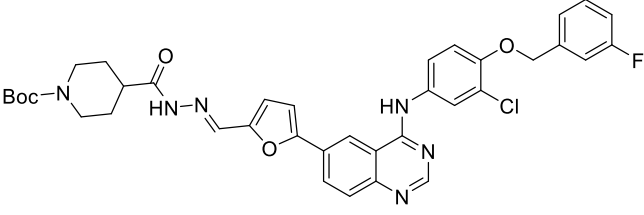


Рисунок 12 – Кривые доза–эффект

В таблице 2 представлены концентрации исследуемых соединений.



Таблица 2 – Концентрации соединений

Код соединения	Структура	Концентрация, нМ
1	2	3
RSF-31		н.о.
RSF-32		529
RSF-44		495
RSF-45		834
RSF-46		14820

н.о. – не определено

По результатам анализа жизнеспособности самым активным соединением стало соединение **125** (код RSF-44), тест *in vitro* также согласуется с результатами проведенного ранее молекулярного докинга.

## 3 Экспериментальная часть

### 3.1 Реагенты и оборудование

Контроль за ходом реакций синтеза исследуемых соединений осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии с использованием пластинок с закрепленным слоем марки «Силуфол». В качестве элюента применялась смесь растворителей: дихлорметан:метанол 20:0,5. Проявление пятен (обнаружение веществ) проводили в концентрированном растворе перманганата калия.

Контроль за ходом реакций и чистоту полученных соединений оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent1220м» с спектрофотометрическим детектором. Колонка ZORBAX C-18, элюент MeCN:H<sub>2</sub>O 8:2, скорость потока элюента 1 мл/мин. Обработка данных проводилась в программе OpenLab (фирма – Agilent).

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H зарегистрированы на приборе Bruker Avance (500 МГц соответственно) в ДМСО-d<sub>6</sub>, внутренний стандарт ТМС.

Температуры плавления определяли при помощи нагревательного столика Voetius.

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

### 3.2 Синтез исходных соединений

#### 3.2.1 Синтез альдегида 119 [43]

*Синтез 2-хлор-1-((3-фторбензил)окси)-4-нитробензола (112)*

К смеси 2-хлор-4-нитрофенола (**110**) (20 г) и карбоната калия (17 г) в 30 мл ДМФА добавили г 3-фторбензилбромид (**111**) (15 мл). Перемешивали при 85°C в течение 3 ч. После реакционную смесь разбавляли водой (50 мл),

экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали раствором BRINE (30 мл), сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отгоняли в вакууме с получением **112**. Выход: 14.6 г, 73%, светло-желтый порошок, т. пл. 94–96°C [46]. <sup>1</sup>H-NMR (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.35 (д, J=2.8 Гц, 1H), 8.25 (дд, J<sub>1</sub>=9.6 Гц, J<sub>2</sub>=2.8 Гц, 1H), 7.49-7.45 (м, 2H), 7.31-7.34 (м, 2H), 7.20-7.21 (м, 1H), 3.32 (с, 2H).

*Синтез 3-Хлор-4-((3-фторбензил)окси)анилина (113)*

К 13 г соединения **112** добавили суспензию восстановленного железа (7,8 г) в 50 мл этилового спирта, раствор хлорида кальция (5.4 г). Смесь перемешивали при 85 °С в течение 8 часов. Осадок фильтровали, фильтрат центрифугировали 30 мин и снова фильтровали. Прозрачный фильтрат концентрировали в вакууме. Полученный осадок промывали водой, сушили на фильтре при комнатной температуре. Выход: 10.1 г, 77%, желтовато-белые кристаллы, т. пл. 82–84°C [47]. <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 7.44-7.40 (м, 1H), 7.23-7.14 (м, 1H), 6.90 (д, J=8.8 Гц, 1H), 6.64 (д, J=2.4 Гц, 1H), 6.46 (дд, J<sub>1</sub>=8.8 Гц, J<sub>2</sub>=2.4 Гц, 1H), 5.03 (м, 2H), 4.94 (с, 2H).

*Синтез N'-(2-циано-4-нитрофенил) -N,N-диметилформимидамида (115)*

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником и якорьком магнитной мешалки, поместили смесь 10 г 2-амино-5-нитробензонитрила **114** и 20 мл диметилацеталь N,N-диметилформамида. Кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, осадок фильтровали, промывали этиловым эфиром (3 × 30 мл), сушили на фильтре при комнатной температуре до постоянной массы. Выход: 9 г, 90%, желтый порошок, т. пл. 152–153°C [48].

*Синтез*

*4-(3-хлор-4-(3-фторбензилокси)-фениламино)-6-нитрохиназолина (116)*

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 8 г соединения **115**, 8 г соединения **113**, 20 мл ледяной уксусной кислоты. Кипятили в течение 3 часов. Осадок отфильтровывали, промывали горячим диэтиловым эфиром (3×15 мл). Выход: 7.2 г, 90%, желто–оранжевый порошок, т. пл. 279–281°C [49].

*Синтез* *N*–(3–хлор–4–((3–фторбензил)окси)фенил)–6–йодхиназолин–4–амина (**117**)

К соединению **116** добавили суспензию восстановленного 2.77 г железа в 50 мл этилового спирта, раствор хлорида кальция (2 г). Смесь перемешивали при 90°C в течение 12 часов. Осадок фильтровали, фильтрат центрифугировали 30 мин и снова фильтровали. Прозрачный фильтрат концентрировали в вакууме. Полученный осадок промывали водой, сушили на фильтре при комнатной температуре. Выход: 6.79 г, 97%, желтый порошок, т. пл. 190–192°C [49].

Раствор соединения, полученного в результате предыдущей реакции, и концентрированной соляной кислоты охлаждали на ледяной бане до 0°C, добавляли нитрит натрия. При перемешивании с помощью капельной воронки медленно прикапывали *N*–иодсукцинимид в дихлорметане. Реакционную смесь перемешивали при 0°C еще 2 часа. Продукт отфильтровывали, промывали холодным раствором соляной кислоты, перекристаллизовывали из этанола. Выход: 53%, желтые кристаллы, т. пл. 221–224°C [49].

*Синтез* 5–(4–((3–хлор–4–((3–фторбензил)окси)фенил)амино)хиназолин–6–ил)фуран–2–карбальдегида (**119**)

Смесь соединения **117** (3 г), 5–формилфуран–2–илборной кислоты **118** (1.12 г), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0.12 г) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.28 г) растворяли в ТГФ (50 мл) и этиловом спирте (50 мл). Кипятили с обратным холодильником при перемешивании в атмосфере аргона в течение 1 ч. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, разбавляли ТГФ и этиловым спиртом.

Осадок отфильтровывали и промывали ТГФ, сушили в вакуумной печи при комнатной температуре. Выход: 2 г, 70%, желтый порошок, т. пл. 224–228°C [49]. <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.04 (с, 1H), 9.64 (с, 1H), 8.98 (с, 1H), 8.56 (с, 1H), 8.23 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.97 (д, J=2.5 Hz, 1H), 7.80 (д, J=8.0 Hz, 1H), 7.68-7.72 (м, 2H), 7.43-7.48 (м, 1H), 7.35 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.24-7.33 (м, 3H), 7.17 (м, 1H), 5.23 (с, 2H).

### **3.2.2 Синтез метиловых эфиров карбоновых кислот**

#### *Типовая методика синтеза*

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 20 г карбоновой кислоты, 340 мл метилового спирта. При помощи капельной воронки медленно прикапывали 70 мл 96% серной кислоты. Кипятили в течение 12 часов. Реакционную смесь остудили до комнатной температуры, разбавили водой, нейтрализовали 300 мл насыщенного раствора NaHCO<sub>3</sub>, провели экстракцию с дихлорметаном (3×150 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упаривали под вакуумом.

#### *Синтез метилового эфира никотиновой кислоты (120)*

Выход: 10 г, 89%, желтое масло.

#### *Синтез метилового эфира изоникотиновой кислоты (121)*

Выход: 10 г, 80%, желтые кристаллы, т. пл. 100–102°C.

### **3.2.3 Синтез гидразидов**

#### *Типовая методика синтеза*

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли навески эфиров (5.35 г), 10 мл этилового спирта, 15.17 мл гидразин–гидрата. Кипятили в течение 12 часов. Продукт сушили на фильтре при комнатной температуре до постоянной массы.

#### *Синтез никотингидразида (122)*

Выход: 3.75 г, 70%, белый порошок, т. пл. 160–163°C.

#### *Синтез изоникотингидразида (123)*

Выход: 3.75 г, 68%, белый порошок, т. пл. 167–170°C.

### *Синтез трет-бутил-4-*

*(гидразинкарбонил)пиперидин-1-карбоксилата (124)*

Выход: 4.28 г, 98%, белый порошок, т. пл. 98–100°C.

## **3.3 Синтез целевых соединений**

### **3.3.1 Синтез лапатиниба 125**

В грушевидную колбу внесли 200 мг альдегида **119**, 224 мг 2-(метилтио)этанамин **126**, 50 мл этилового спирта, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Провели экстракцию с дихлорметаном (3×40 мл), объединенные органические слои сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали под вакуумом. Продукт очищали на колонке с силикагелем, элюент DCM:MeOH (20:1). Выход: 100 мг, 50%, желтый порошок, т. пл. 300–302°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 9.60 (уш. с, 1H); 9.32 (уш. с, 1H); 8.82 (уш. с, 1H); 8.34 (д, 1H); 8.0 (с, 1H); 7.88 (д, 1H); 7.74 (д, 1H); 7.45 (м, 1H); 7.34-7.23 (м, 4H); 7.17-7.09(м, 1H); 6.83 (д, 1H); 5.27 (с, 2H); 4.42 (с, 2H); 3.59 (м, 2H); 3.40 (м, 2H, obscured by waterpeak); 3.12 (с, 3H).

### **3.3.2 Синтез гидразонов**

#### *Типовая методика синтеза*

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 200 мг альдегида **119**, необходимый гидразид, 30 мл этилового спирта. Кипятили в течение 12 часов. Продукт сушили на фильтре при комнатной температуре до постоянной массы.

#### *Синтез*

*(E)-N'-((5-(4-((3-хлор-4-((3-фторбензил)окси)фенил)амино)хиназолин-6-ил)фуран-2-ил)метил)енил)никотиногидразида (127)*

Выход: 130 мг, 52%, желтый порошок, т. пл. 250–251°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.09 (с, 1H), 9.62 (с, 1H), 9.05 (д, J = 1.2 Гц, 1H), 8.91 (с, 1H), 8.76 (д, J = 4.2 Гц, 1H), 8.53 (с, 1H), 8.42 (с, 1H), 8.25 (д, J = 8.0 Гц,

1H, ), 8.24 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.97 (д, J=2.5 Гц, 1H), 7.80 (д, J=8.0 Гц, 1H), 7.68-7.72 (м, 2H), 7.58 (м, 1H), 7.41-7.46 (м, 1H), 7.29 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.18-7.27(м, 3H), 7.09 (м, 1H), 5.22(с, 2H).

#### *Синтез*

*(E)-N'-((5-(4-((3-хлор-4-((3-фторбензил)окси)фенил)амино)хиназолин-6-ил)фуран-2-ил)метиленизоникотиногидразида (128)*

Выход: 182 мг, 73%, желтый порошок, т. пл. 170–172°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.10 (с, 1H), 9.69 (с, 1H), 8.93 (с, 1H), 8.78 (д, J = 6.0 Hz, 2H), 8.54 (с, 1H), 8.45 (с, 1H), 8.26 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.94(д, J=2.5 Гц, 1H), 7.81 (д, J = 6.0 Гц, 2H) 7.81 (д, J=8.0 Гц, 1H), 7.78-7.81 (м, 2H), 7.41-7.51 (м, 1H), 7.33(д, J=9.0 Гц, 1H), 7.19-7.29 (м, 3H), 7.15-7.07 (м, 1H), 5.26 (с, 2H).

#### *Синтез*

*(E)-N'-((5-(4-((3-хлор-4-((3-фторбензил)окси)фенил)амино)хиназолин-6-ил)фуран-2-ил)метилени-1-метилпиперидин-4-карбогидразида (129)*

Выход: 110 мг, 37%, желтый порошок, т. пл. 235–237°C.

### **3.3.3 Синтез гидразона 130**

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 200 мг альдегида **119**, 25 мл метилового спирта, смесь 34.6 мг гидрохлорида гидразина и 54 мг ацетата калия. Поставили кипятиться на 12 часов. Продукт сушили на фильтре при комнатной температуре до постоянной массы. Выход: 176 мг, 85%, оранжевый порошок, не плавится выше 300°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 8.74 (с, 1H), 8.11 (с, 1H), 8.32 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.97 (д, J=2.5 Гц, 1H), 7.78 (д, J=8.0 Гц, 1H), 7.69-7.64 (м, 2H), 7.44-7.42 (м, 1H), 7.40 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.19-7.29 (м, 3H), 7.15-7.11 (м, 1H), 5.65 (уш.с, 2H) 5.25 (с, 2H).

### **3.3.4 Синтез оксима 131**

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли 200 мг альдегида **119**, 25 мл метилового спирта, смесь 35 мг гидрохлорида гидроксилamina и 73 мг карбоната калия. Поставили кипятиться на 12 часов. Продукт сушили на фильтре при комнатной температуре до постоянной массы. Выход: 113 мг, 54%, желтый порошок, т. пл. 234–235°C. <sup>1</sup>H-ЯМР (500

МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.43 (с, 1H), 9.68 (с, 1H), 8.88 (с, 1H), 8.34 (с, 1H), 8.23 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.94(д, J=2.5 Гц, 1H), 7.75 (д, J=8.0 Гц, 1H), 7.66-7.73 (м, 2H), 7.41-7.46 (м, 1H), 7.37 (д, J=9.0 Гц, 1H), 7.19-7.29 (м, 3H), 7.15-7.11 (м, 1H), 5.25 (с, 2H).

### **3.4 Биологические испытания**

#### **3.4.1 Реагенты и оборудование**

Для проведения биологических испытаний использовалось следующее оборудование: ламинарный шкаф II класса защиты (SafeFast, Italy), инвертированный микроскоп (ZEISS Primovert, Germany), CO<sub>2</sub> – инкубатор (Binder, Germany), автоматический счетчик клеток (TC20, Bio–Rad, USA), автоматическая раскапывающая станция (epMotion 5070, Germany), планшетный ридер (Promega, USA), криохранилище (Thermo Fisher Scientific, USA), центрифуга (Elmi centrifuge CM–75, Latvia), механический дозатор на 300 мкЛ (Eppendorf Research Plus, Germany), механический дозатор на 1000 мкЛ (Eppendorf, Germany), непрозрачный 96–луночный планшет (Eppendorf, Germany), резервуар 100 мл (Eppendorf, Germany), центрифужные пробирки (Eppendorf, Germany), криопробирка (Cryofreeze, USA), серологические пипетки на 5 мл, 10 мл, 25 мл, 50 мл (Eppendorf, Germany).

Для проведения биологических испытаний использовались следующие реагенты: питательная среда RPMI (Gibco, UK), фетальная бычья сыворотка (FBS) (Capricorn Scientific, USA), трипановый синий (0.4%) (сGMP, USA), раствор антибиотиков пенициллин–стрептомицина (Capricorn Scientific, USA), клеточная культура Ba/F3 EGFR wt (ATCC, USA), реагент CellTiter–Glo<sup>®</sup>, культуральный флакон 75 см<sup>2</sup> (Eppendorf, Germany).

#### **3.4.2 Культивирование клеток**

Клеточная линия Ba/F3 EGFR wt была получена из ATCC, Клетки поддерживали в питательной среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, смеси пенициллина–стрептомицина (100 мкг/мл) и



GlutaMax (2 mM). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95% воздуха, 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

### **3.4.3 Анализ жизнеспособности CellTiter–Glo**

Ресуспендировали и производили расчет клеточной линии согласно методике культивирования.

Подготовили непрозрачные 96–луночные планшеты с клетками Ва/F3 EGFR wt и культуральной средой, количество клеток в лунке – 20 000. Добавили тестируемые соединения, начиная с концентрации 10 мкМ, провели раститровку, инкубировали клетки в соответствии с протоколом культивирования. Проводили инкубацию в течение 48 часов при комнатной температуре. После инкубации в лунки внесли объем реагента CellTiter–Glo<sup>®</sup>, равный объему среды для культивирования клеток. Смешали содержимое лунок планшета на орбитальном шейкере в течение 2 минут, для инициации лизиса клеток. Для стабилизации люминесцентного сигнала, планшет с клетками инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Измерили сигнал люминесценции при помощи планшетного ридера.

Измерение проводили в двух повторах. Кривые зависимости доза–эффект строили в программе GraphPad Prism.

## **3.5 Компьютерное моделирование**

Все расчеты в рамках выполненной выпускной квалификационной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2023-1 на рабочей станции Mac Pro 2013, снабженной процессором Intel Xeon E5 (6 ядер, тактовая частота 3.5 ГГц) под управлением ОС Ubuntu 22.04.

### **3.5.1 Подготовка структур белка**

Кристаллическая структура киназного домена EGFR (PDB ID: 1XKK [37]) была загружена из Protein Data Bank [38]. Подготовка осуществлялась с

помощью модуля Protein Preparation Wizard [39]. Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, уточнены порядки связей, состояние протонирования предсказано с использованием алгоритма Epik [40] в диапазоне  $\text{pH} = 7 \pm 2$ . Кристаллическая вода удалена.

### **3.5.2 Генерация грид-сетки**

Грид-бокс рассчитан с помощью модуля Receptor Grid Generation. Область стыковки определялась как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с центром масс нативного лиганда. Параметры масштабирования радиусов Ван-дер-Ваальса и отсечки значений частичных зарядов были установлены по умолчанию и не изменялись. Дополнительно были указаны остатки, с которыми нативный лиганд образовывал водородные связи. Всем тиольным или гидроксильным группам аминокислот сайта было позволено вращение.

### **3.5.3 Нативный докинг**

Структура лапатиниба была удалена из сайта, а затем подвергнута гибкой стыковке с помощью модуля Ligand Docking в режиме точности Glide XP [42] с расчетом RMSD. Дополнительно с помощью модуля Prime был проведен расчет свободной энергии связывания методом MM GBSA, все параметры были установлены по умолчанию.

### **3.5.4 Подготовка виртуальной библиотеки**

Структуры исследуемых соединений были подготовлены с помощью модуля LigPrep; хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования предсказывалось с использованием алгоритма Epik [40] в диапазоне  $\text{pH} = 7 \pm 2$ .

### **3.5.5 Молекулярный докинг**

После подготовки все структуры были подвергнуты процедуре докинга с помощью модуля Ligand Docking в грид-бокс 1XKK так, как описано в 3.1.3.

## Заключение

По результатам данной работы можно сделать выводы:

1. Было проведено описание возможных скаффолдов разных хемотипов для новых ингибиторов для мутантных форм EGFR, устойчивых к первому, второму, третьему поколению клинически одобренных ингибиторов и освещены их синтетические схемы получения;

2. Был проведен молекулярный докинг, который определил ориентацию и ключевые взаимодействия лапатиниба в активном сайте EGFR, что позволило выбрать вектор направления его модификации с целью получения новых производных;

3. Был проведен молекулярный докинг вариации производных лапатиниба с целью предварительной проверки их ингибирующей активности в отношении EGFR и выявлено предварительное соединение–лидер;

4. Был проведен синтез предшественника лапатиниба – замещенного фуранового альдегида;

5. Проведен синтез ряда производных лапатиниба с различными заместителями, строение всех полученных соединений подтверждено спектрами ЯМР  $^1\text{H}$ ;

6. Осуществлена оценка ингибирующей активности исследуемых соединений на клеточной линии Ва/Ф3 EGFR wt, получены соответствующие графические зависимости доза–эффект;

7. По результатам *in vitro* исследования полученные соединения **125**, **126**, **127**, **128**, **129**, **131** проявляли дозо–зависимую ингибирующую активность в наномолярном диапазоне концентраций (529–14820 нМ) в отношении EGFR wt, самым активным соединением стало **125** (529 нМ), что также согласуется с результатами проведенного ранее молекулярного докинга для данной серии соединений.

## Список используемой литературы

1. He J. The New Opportunities in Medicinal Chemistry of Fourth-Generation EGFR Inhibitors to Overcome C797S Mutation / J. He, Z. Zhou, X. Sun et al // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 210. – №. 15. – P. 1–36.
2. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases / J. Schlessinger, M. A. Lemmon // *Cell*. – 2010. – Vol. 103. – №. 2. – P. 11–225.
3. Li E. Role of Receptor Tyrosine Kinase Transmembrane Domains in Cell Signaling and Human Pathologies / E. Li, K. Hristova // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45. – №. 20. – P. 6241–6251.
4. Trenker R. Receptor Tyrosine Kinase Activation: From the Ligand Perspective / R. Trenker, N. Jura // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2020. – Vol. 63. – P. 174–185.
5. Ahmed F. Dimerization of the Trk Receptors in the Plasma Membrane: Effects of Their Cognate Ligands / F. Ahmed, K. Hristova // *Biochemical Journal*. – 2018. – Vol. 475. – №. 22. – P. 3669–3685.
6. Guo Y. J. ERK/MAPK Signaling Pathway and Tumorigenesis / Y. J. Guo, W. W. Pan, S. B. Liu et al // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2020. – Vol. 19. – №. 3. – P. 1997–2007.
7. Noorolyai S. The Relation Between PI3K/AKT Signalling Pathway and Cancer / S. Noorolyai, N. Shajari, E. Baghbani et al // *Gene*. – 2019. – Vol. 698. – №. 25. – P. 120–128.
8. Ersahin T. The PI3K/AKT/mTOR Interactive Pathway / T. Ersahin, N. Tuncbag, R. Cetin-Atalay // *Molecular BioSystems*. – 2015. – Vol. 11. – №. 7. – P. 1946–1954.
9. Hu X. The JAK/STAT Signaling Pathway: From Bench to Clinic / X. Hu, J. Li, M. Fu et al // *Signal Transduction and Target Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – №. 402. – P. 1–36.

10. Du Z. Mechanisms of Receptor Tyrosine Kinase Activation in Cancer / Z. Du, C. M. Lovly // *Molecular Cancer*. – 2018. – Vol. 17. – № 58. – P. 1–25.
11. Saraon P. Receptor Tyrosine Kinases and Cancer: Oncogenic Mechanisms and Therapeutic Approaches / P. Saraon, S. Pathmanathan, J. Snider et al // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40. – №. 24. – P. 4079–4093.
12. Carrot-Zhang J. Whole-genome Characterization of Lung Adenocarcinomas Lacking Alterations in the RTK/RAS/RAF Pathway / J. Carrot-Zhang, X. Yao, S. Devarakonda // *Cell Reports*. – 2021. – Vol. 34. – №. 5. – P. 358–373.
13. Mancarella C. Novel Regulators of the IGF System in Cancer / C. Mancarella, A. Morrione, K. Scotlandi // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – №.2. – P. 273–285.
14. Jiang X. The Role of Microenvironment in Tumor Angiogenesis / X. Jiang, J. Wang, X. Deng et al. // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 39. – №. 204. – P. 200–215.
15. Ducray S. P. The Transcriptional Roles of ALK Fusion Proteins in Tumorigenesis / S. P. Ducray, K. Natarajan, G. D. Garland // *Cancers*. 2019. Vol. 11. №. 8. P. 1047–1058.
16. Leahy D. J. Structure and Function of the Epidermal Growth Factor (EGF/ErbB) Family of Receptors / D. J. Leahy // *Advances in Protein Chemistry*. – 2004. – Vol. 68. – P. 1–27.
17. Uribe M. L. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance / M. L. Uribe, I. Marrocco, Y. Yarden // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – №. 11. – P. 1–21.
18. Pottier C. Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy / C. Pottier, M. Fresnais, M. Gilon et al. // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – №. 3. – P. 847–868.
19. Lee C. K. Gefitinib or Erlotinib vs Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Cancer: Individual Patient Data Meta-Analysis of Overall Survival /

C. K. Lee, L. Davies, Y. L. Wu et al. // Journal of the National Cancer Institute. – 2017. – Vol. 109. – №. 6. – P. 1–9.

20. Yoshida T. Comparison of Adverse Events and Efficacy Between Gefitinib and Erlotinib in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer: a Retrospective Analysis. / T. Yoshida, K. Yamada, K. Azuma et al. // Medical Oncology. – 2012. – Vol. 30. – №. 1. – P. 52–67.

21. Kim Y. The EGFR T790M Mutation in Acquired Resistance to an Irreversible Second-Generation EGFR Inhibitor / Y. Kim, J. Ko, Z. Cui // Molecular Cancer Therapeutics. – 2012. – Vol. 11. – №. 3. – P. 784–791.

22. Wecker H. Afatinib / H. Wecker, C. F. Waller // Small Molecules in Oncology. – 2018. – Vol. 8. – P. 199–215.

23. Malapelle U. Osimertinib / U. Malapelle, B. Ricciuti, S. Baglivo et al. // Small Molecules in Oncology. – 2018. – Vol. 10. – P. 257–276.

24. Wang S. EGFR C797S Mutation Mediates Resistance to Third-generation Inhibitors in T790M-positive Non-Small Cell Lung Cancer / S. Wang, S. T. Tsui, C. Liu et al. // Journal of Hematology & Oncology. – 2016. – Vol. 93. – №. 1. – P. 1–10.

25. Wang S. EAI045: The Fourth-generation EGFR Inhibitor Overcoming T790M and C797S Resistance / S. Wang, Y. Song, D. Liu, // Cancer Letters. – 2017. – Vol. 385. – P. 51–54.

26. Jia Y. Overcoming EGFR (T790M) and EGFR (C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors / Y. Jia, C.-H. Yun, E. Park // Nature. – 2016. – Vol. 534. – №. 7605. – P. 129–132.

27. Li Q. Discovery of Potent and Noncovalent Reversible EGFR Kinase Inhibitors of EGFR L858R/T790M/C797S / Q. Li, T. Zhang, S. Li et al. // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2019. – Vol. 10. – №. 6. – P. 869–873.

28. Lee S. Allosteric Inhibitor TREA-0236 Containing Non-hydrolysable Quinazoline-4-one for EGFR T790M/C797S Mutants Inhibition / S. Lee, J. Kim, K. B. Duggirala et al. // Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2018. – Vol. 39. – №. 7. – P. 895–898.

29. To C. Single and Dual Targeting of Mutant EGFR with an Allosteric Inhibitor / C. To, J. Jang, T. Chen, // *Cancer Discovery*. – 2019. – Vol. 9. – №. 7. – P. 926–943.

30. Lei H. Discovery of novel 9-heterocyclyl substituted 9H-purines as L858R/T790M/C797S mutant EGFR tyrosine kinase inhibitors / Lei, H., Fan, S., Zhang, H., // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 168. – №. 15. – P. 1–46.

31. De Clercq D. J. H. Discovery and Optimization of Dibenzodiazepinones as Allosteric Mutant-Selective EGFR Inhibitors / D. J. H. De Clercq, D. E. Heppner, C. To et al. // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 10. – №. 11. – P. 1549–1553.

32. Duong-Ly K. C. Kinase Inhibitor Profiling Reveals Unexpected Opportunities to Inhibit Disease-Associated Mutant Kinases / K. C. Duong-Ly, K. Devarajan, S. Liang et al. // *Cell Reports*. – 2016. – Vol. 14. – №. 4. – P. 772–781.

33. Günther M., Trisubstituted Pyridinylimidazoles as Potent Inhibitors of the Clinically Resistant L858R/T790M/C797S EGFR Mutant: Targeting of Both Hydrophobic Regions and the Phosphate Binding Site / M. Günther, J. Lategahn, M. Juchum et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 60. – №. 13. – P. 5613–5637.

34. Selig R. A Frozen Analogue Approach to Aminopyridinylimidazoles Leading to Novel and Promising p38 MAP Kinase Inhibitors / R. Selig, M. Goettert, V. Schattel et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – №. 19. – P. 8429–8439.

35. Engelhardt H. Start Selective and Rigidify: The Discovery Path Towards a Next Generation of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors / H. Engelhardt, D. Böse, M. Petronczki et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62. – №. 22. – P. 10272–10293.

36. Lu X. Discovery of JND3229 as a New EGFR C797S Mutant Inhibitor with *In Vivo* Mono-drug Efficacy / X. Lu, T. Zhang, S. Zhu et al. // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 9. – №. 11. – P. 1123–1127.

37. Wood E. R. A Unique Structure for Epidermal Growth Factor Receptor Bound to GW572016 (Lapatinib) / E. R. Wood, A. T. Truesdale, O. B. McDonald et al. // *Cancer Research*. – 2004 – Vol. 64. – №. 18. – P. 6652–6659.

38. Protein Data Bank. URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 06.06.2023)

39. Madhavi Sastry G. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments / G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day et al. // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2013. – Vol. 27. – №. 3. – P. 221–234.

40. Shelley, J. C. Epik: a software program for pK<sub>a</sub> prediction and protonation state generation for drug-like molecules / J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye et al. // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2007. – Vol. 21. – №. 12. P. 681–691.

41. Friesner, R. A. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy / R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 47. – №. 7. – P. 1739–1749.

42. Friesner R. A. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes / R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49. – №. 21. – P. 6177–6196.

43. Elwaie T. A. HER2 Kinase-Targeted Breast Cancer Therapy: Design, Synthesis, and In Vitro and In Vivo Evaluation of Novel Lapatinib Congeners as Selective and Potent HER2 Inhibitors with Favorable Metabolic Stability / T. A. Elwaie, S. E. Abbas, E. I. Aly et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 55. – №. 43. – P. 6007–6010.

44. Lui T. *In vivo* screening platform based on Ba/F3 kinase engineered cell lines for discovery of next-generation kinase inhibitors / T. Lui, F. He, X. Duan et al. // *Cancer Research*. – 2023. – Vol. 83. – №. 7. – P. 258–290.



45. Gilbert D. F. A Protocol for a High-Throughput Multiplex Cell Viability Assay / D. F. Gilbert, M. Boutros // High-Throughput RNAi Screening. – 2016. – Vol. 1470. – P. 75–84.

46. Li M.C. Development of Furanopyrimidine-Based Orally Active Third-Generation EGFR Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer / M. C. Li, M.S. Coumar, S. Y. Lin et al. // The Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – Vol. 66. – №. 4. – P. 2566–2588.

47. Elkamhawy A. Targeting EGFR/HER2 tyrosine kinases with a new potent series of 6-substituted 4-anilinoquinazoline hybrids: Design, synthesis, kinase assay, cell-based assay, and molecular docking / A. Elkamhawy, A. K. Farag, A. Viswanath et al. // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2015. – Vol. 25. – №. 22. – P. 5147–5154.

48. Saad S. M. 4-Arylamino-6-nitroquinazolines: Synthesis and their activities against neglected disease leishmaniasis / S. M. Saad, N. Ghouri, S. Perveen et al. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 108. – P. 13–20.

49. Lin S. Design, synthesis and biological evaluation of quinazoline–phosphoramidate mustard conjugates as anticancer drugs / S. Lin, Y. Li, Y. Zhend et al. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 127. – P. 442–458.