

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ

(институт)

Химия, химические процессы и технологии

(кафедра)

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Кафедрой

_____ Остапенко Г.И.

«___» _____ 2017 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение бакалаврской работы

Студенту Буневу Александру Сиясатовичу

1. Тема «Структурно-ориентированный молекулярный дизайн и синтез ингибиторов мутантных форм киназного домена семейства рецепторов эпидермального фактора роста»

2. Срок сдачи студентом законченной бакалаврской работы июнь 2017

3. Исходные данные к бакалаврской работе литература по теме исследования

4. Содержание бакалаврской работы (перечень подлежащих разработке вопросов, разделов) Введение, литературный обзор, обсуждение результатов,

экспериментальная часть, заключение, список литературы.

5. Ориентировочный перечень графического и иллюстративного материала презентация

6. Консультанты по разделам не предусмотрены

7. Дата выдачи задания « 6 » февраля 2017 г.

Руководитель выпускной

квалификационной работы

(подпись)

Е.В. Сухоносова
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

(подпись)

А.С. Бунев
(И.О. Фамилия)

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ

(институт)

Химия, химические процессы и технологии

(кафедра)

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Кафедрой

_____ Остапенко Г.И.

«___» _____ 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

выполнения бакалаврской работы

Студента Булева Александра Сиясатовича

по теме: «Структурно-ориентированный молекулярный дизайн и синтез ингибиторов мутантных форм киназного домена семейства рецепторов эпидермального фактора роста»

Наименование раздела работы	Плановый срок выполнения раздела	Фактический срок выполнения раздела	Отметка о выполнении	Подпись руководителя
Подбор литературных источников и написание раздела «Литературный обзор»	1.03.2017	1.03.2017	Выполнено	
Выполнение экспериментальной части работы	10.04.2017	10.04.07	Выполнено	
Написание раздела «Экспериментальная часть»	22.05.2017	22.05.2017	Выполнено	

Написание разделов «Результаты и обсуждения», «Введение», «Заключение», «Литература»	29.05.2017	29.05.2017	Выполнено	
Верстка работы, проверка работы научным руководителем	05.06.2017	05.06.2017	Выполнено	
Проверка работы в системе «Антиплагиат.ВУЗ»	16.06.2017	16.06.2017	Выполнено	
Оформление демонстрационного материала и устного доклада	19.06.2017	19.06.2017	Выполнено	

Руководитель выпускной
квалификационной работы

(подпись)

Е.В. Сухоносова
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

(подпись)

А.С. Бунев
(И.О. Фамилия)

АННОТАЦИЯ

Представленная работа описывает результаты исследования по структурно-ориентированному молекулярному дизайну и разработке синтетических подходов к получению высокоаффинных ингибиторов мутатных форм киназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста.

ABSTRACT

Kinase activity deregulation became the main mechanism that makes cancer cells to avoid physical restrictions, which are connected with growth and survival. Despite of that now days the most of inhibitors EGFR received approval of FDA and as before essential efforts for development of selective low molecular inhibitors of kinases that involves in oncogenes are implemented by the leading world research centers, drug resistance became the main barrier for next success of using target preparations that are directed to EGFR-kinase. For example, progress of resistance while treatment of non-small cell lung cancer sharply reduces disease-free survival and is restriction for implementing of EGFR inhibitors series. Detailed research of EGFR-kinase mutants (L858R/T790M) detected one amino acid that is called gatekeeper amino acid, which induce resistance to preparations of first and second generation. More over quite recently extracted EGFR form (C797S) is sustainable to all known inhibitors including AZD9291 was proposed recently. Taking in consideration the facts there is urgent necessity of new chemical approaches to detecting and synthesis of perspective compounds that are able to inhibit mutant form of protein kinase of epidermal growth factor receptors family. Our long-term target is to develop chemical strategies of synthesis for selective EGFR inhibitors, which brings mutations to ATP site. As soon as kinase as usual exist in no active state as usual and demand structural recombination for ferment activity activation we assumed that compounds which prevent the activation can make strategy of selective kinase inhibition including sustainable to traditional ATP-competitive inhibitors due to existing mutations.

Presented project plans development of this research direction in chemical synthesis area and in area of extended specter of biological tests (studying of activity of synthesized EGFR inhibitors in terms EGF-induced proliferation of cells; studying of receptors EGFR (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4) expression and also VEGFR1, VEGFR2 and FGFR on tumor cells under influence of target inhibitors etc.)

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	9
ВВЕДЕНИЕ.....	10
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. Научное обоснование выбора протеинкиназы в качестве терапевтической мишени	13
1.1.1 Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR).....	14
1.1.2 Рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR)	15
1.1.3 Рецепторы васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGFR).....	16
1.1.4 Рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR).....	17
1.1.5 Митоген-активируемые протеинкиназы группы p38 (p38 MAPK) ..	19
1.1.6 Циклин-зависимые киназы (CDKs)	20
1.2. Химические остовы, используемые при дизайне и синтезе АТФ сайт- направленного конкурентного и необратимого ингибитора протеинкиназ	21
1.2.1 Хиназолины	21
1.2.2 Фениламино-пиримидины	26
1.2.3 Пиридо[d]пиримидины и пиримидо[d]пиримидины	27
1.2.4 Пирроло[d]пиримидины и пирроло[2,3-b]пиримидины	33
1.2.5 Пиразоло[d]пиримидины	36
1.2.6 Индолин-2-оны.....	38
1.2.7 Пурины.....	40
1.2.8 Пиридинилимидазолы, пиримидинилимидазолы и связанные соединения.....	42
1.3. Различные структурные классы	44
1.3.1 Баланол.....	44
1.3.2 Флавопиридол	46
1.3.3 Стауроспорин, индолокарбозол и связанные аналоги	46
1.3.4. Фталазин	48
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	49

2.1. Молекулярный докинг	50
2.2. Синтез ингибиторов	50
2.3. Биологические испытания	55
2.3.1. Изучение цитотоксического действия соединения ASB1 на клетках линии MCF-7, A549 методом МТТ-теста.....	55
2.3.2. Исследование EGF-зависимой экспрессии EGFR/pEGFR, pАКТ, под действием ингибиторов EGFR	56
2.3.3. Изучение влияния ингибиторов EGFR на EGF-зависимое деление клеток	58
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	60
3.1. Реагенты и оборудование	60
3.2. Очистка и сушка растворителей	60
3.3. Получение исходных соединений.....	62
3.4. Синтез целевых соединений	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	76
ЛИТЕРАТУРА.....	77

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяют следующие сокращения и термины:

АТФ	аденозинтрифосфат
RPTKs	рецепторные белки тирозинкиназ
МАРК	митоген активируемая протеинкиназа
EGFR	рецепторы эпидермального фактора роста
TGF- α	трансформирующий фактор роста альфа
HB-EGF	гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста
PDGFR	рецепторы тромбоцитарного фактора роста
VEGFR	рецепторы васкулярного эндотелиального фактора роста
CDKs	циклин-зависимые киназы
ПЭТ	позитронно-эмиссионная томография
BTC	бетацеллюлин
CKLs	ингибиторы циклинзависимой киназы
CSBP	цитокин-подавляющий противовоспалительный белок
FGFR	рецептор фактора роста фибробластов
МАР	активированный митогеном белок
МАРК	митоген-активированная протеинкиназа
NGF	фактор роста нервов
SAR	отношение структура-активность
HUVEC	эндотелиальная клетка пупочной вены человека
PKA	цАМФ-зависимая протеинкиназа
PKC	протеинкиназа С

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени проблема лечения и предупреждения онкологических заболеваний наряду с сердечнососудистыми и нейродегенеративными заболеваниями, стала наиболее острой социальной, медицинской и финансовой проблемой в большинстве стран мира. Крайне актуальна эта проблема и для Российской Федерации. Так, проведенное исследование «Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году» МНИОИ им П.А. Герцена показало, что на конец отчетного 2012 года контингент больных со злокачественными новообразованиями, состоявших на учете в онкологических учреждениях, составил 2995566 человек или 2.1% населения страны. Показатель распространенности злокачественных новообразований в массиве населения России достиг в 2013 году 2095 случаев на 100000 населения, что выше уровня 2002 года (1548 случаев) на 37.2 %. К сожалению, на 2017 год данные показатели имеют тенденцию роста, что делает данную проблему серьезным вызовом не только системе здравоохранения страны, но и российской химико-фармацевтической отрасли в целом.

Несмотря на то, что на мировом фармацевтическом рынке существует уже более 30 инновационных противораковых таргетных препаратов (ингибиторов протеинкиназ), российские разработчики в этом сегменте практически не представлены. Учитывая выше сказанное, становится вполне очевидным, что для страны стимулирование исследований в области медицинской химии и адресной (таргетной) химиотерапии при тесной совместной работе с игроками отечественного фармацевтического рынка становится первостепенной стратегической задачей. Понимая тернистый путь создания принципиально новой структуры ингибитора протеинкиназы (в среднем 10-15 лет, существенное финансирование), представленное исследование нацелено на первичный этап этого сложного пути, который заключается в осуществлении молекулярного моделирования, синтеза и

биологических испытаний перспективных ингибиторов мутантных форм рецепторов эпидермального фактора роста.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Для выявления новых, перспективных путей и мишеней для терапевтического вмешательства было использовано описание процессов, участвующих в регуляции путей передачи отдельных сигналов и интеграции этих ответов. В данной работе наибольшее внимание уделяется протеинкиназам, которые представляют собой привлекательные мишени в исследованиях новых терапевтических агентов при многих заболеваниях. Среди всего разнообразия подходов к ингибированию протеинкиназ, описанных в фармацевтической литературе, опосредованно выделяется вклад в ингибирование рецепторных и нереперторных протеинкиназ АТФ сайт-направленными соединениями [1, 2]. Первоначально, данный подход казался маловероятным по причине консервативности сайта связывания АТФ. Первоначальные скепсис по поводу этой "авантюры" был не обоснованным, о чем свидетельствует то, что ряд высокоселективных сайт-направленных ингибиторов АТФ в настоящее время находятся в фазе клинических испытаний [3-8], а также то, что для доступных структур протеинкиназ в большинстве случаев предложены соответствующие комплексы. Использование структурной информации, полученной рентгеноструктурным анализом или компьютерным моделированием на основе гомологии доменов киназ, являлось ключевым фактором при разработке селективных ингибиторов протеинкиназ. Были получены фармакофорные модели для сайт-направленных конкурентных ингибиторов АТФ [10-13] путём совмещения трехмерной структуры и данных соотношения структура-свойство, это позволило выбрать направление для структурно-ориентированного дизайна лекарственных веществ [11, 14-16]. В рамках литературного обзора будут обсуждены ключевые достижения фармацевтической химии в дизайне и синтезе сайт-направленных ингибиторов протеинкиназ АТФ, а также современные разработки в данной области [3, 17-20].

1.1. Научное обоснование выбора протеинкиназы в качестве терапевтической мишени

Для поиска лекарственных веществ в качестве кандидатов были выбраны многие киназы тирозина и серин/треонина. Данный выбор основывался или на их сверхэкспрессии и/или дисфункции в конкретных органах или тканях, или же через их ассоциацию в пути передачи сигналов, что наблюдается во многих случаях заболеваниях. Предполагалось, что ингибирование этих определенных киназ должно привести к изменению функционального клеточного ответа и, в свою очередь, к изменению процесса заболевания.

Рецепторные белки тирозинкиназ (RPTKs) обычно активируется после связывания их лиганд фактора роста с рецептором. Они играют важные роли в передаче сигналов, регулируя такие функции клетки, как дифференциация, пролиферация, протекающие как в нормальных, так и больных клетках. Множество опухолей, как было показано, имеют дисфункцию RPTK либо вследствие избыточной продукции фактора роста, либо рецептора, а в некоторых случаях их обоих, а в ряде случаев из-за мутаций в структуре рецепторных белков тирозинкиназ. Независимо от причины, происходит чрезмерная активность системы RPTK и, в свою очередь, аномальная и неуместная пост-рецепторная клеточная сигнализация внутри клетки. Причем эти рецепторные белки являются привлекательным мишенями при поиске лекарственных веществ не только против рака, но и против других заболеваний. Избыточная экспрессия или действие нерецепторных тирозинкиназ также может привести к изменениям в путях передачи сигналов. Например, нерецепторные киназы семейства Src участвуют в патологиях различных типов рака, остеокласт-опосредованной резорбции костной ткани при остеопорозе и при нарушениях, связанных с распространением Т-клеток. Кроме различных тирозинкиназ в качестве молекулярных терапевтических мишеней рассматриваются серин/треонин

киназы. Впервые такой подход для серин/треонин киназ был описан для семейства протеинкиназ C (PKC), где происходило блокирование aberrантной передачи сигнала, ведущей к чрезмерной пролиферации клеток. Впоследствии интерес ученых в качестве терапевтических мишеней вызвало семейство митоген активируемых протеинкиназ (МАРК).

1.1.1 Рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR)

Примерно 10 лет назад, когда во многих фармацевтических компаниях по всему миру начались исследования в области поиска лекарственных веществ для случаев, связанных с передачей сигналов, в качестве прототипных лекарств для RPTK были выбраны рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) [21]. Эпидермальный фактор роста (EGF) являлся одним из первых подробно описанных факторов роста. EGFR – это тирозинкиназные рецепторы фактора роста, которые вызывают клеточную пролиферацию и дифференциацию в случае их связывания и активации одним из известных лигандов. EGFR состоит из единой полипептидной цепи, включающей 1186 аминокислот, и экспрессирует на клеточных мембранах различных типов клеток. Помимо EGF, и некоторые другие лиганды демонстрируют связывание с EGFR, включая трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α), бетацеллулин (BTC) и гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF). После связывания с лигандами, рецепторы EGFR потенциально димеризуются с образованием гомодимера или гетеродимера с другими членами семейства EGFR. Димеризация рецепторов приводит к изменению внутриклеточной части рецептора, ответственного за активацию тирозинкиназы и аутофосфорилирование цитоплазматических остатков тирозина, расположенных на EGFR, которые служат в качестве сайтов распознавания для взаимодействия с субстратом, содержащим SH2, что необходимо для дальнейшей передачи сигнала.

За последние годы было собрано множество доказательств того, что EGFR и члены этого семейства вовлечены в развитие и прогрессирование

различных видов раковых опухолей у человека. В большинстве случаев аберрантная активность EGFR изменяется в результате сверхэкспрессии или мутации. Кроме того увеличенная экспрессия лигандов EGFR или коэкспрессия как рецептора, так и лигандов внутри опухолевых клеток имеет потенциал для аутокринной регуляции и активации EGFR, приводящей к путям сверхактивного рецептора. Следовательно, аберрантная активность EGFR может привести к неконтролируемым клеточным процессам, включая клеточную пролиферацию, которая может служить причиной возникновения злокачественных состояний. Во множестве случаев опухолей наблюдалась также амплификация генов. Сверхэкспрессия EGFR обнаружена при раке молочной железы, яичников, мочевого пузыря, легких, глиобластомы и в случае плоскоклеточной карциномы. В практике EGFR часто используют при прогнозе развития опухолей, так как его сверхэкспрессия коррелирует с плохим прогнозом в ряде случаев рака. Клиническая эпидемиология и экономическая часть исследований показывает, что EGFR является идеальной мишенью для поиска лекарственных веществ, а также представляет собой одну из наиболее клинически изученных мишеней. Роль EGFR в пролиферации клеток делает его также привлекательной мишенью в других, гиперпролиферативных расстройствах, например в случае псориаза.

1.1.2 Рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR)

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) является сильным стимулятором клеточного роста и подвижности некоторых клеток [22]. Структурно, PDGF является димерным белком, состоящим из двух полипептидов А или В, связанных дисульфидными мостиками. Он может быть как в гомодимерной форме (АА или ВВ), так и в виде гетеродимера (АВ). Эти пептидные лиганды связываются с двумя структурно схожими рецепторами PDGF, обозначаемые α и β . Один пептид PDGF способен связываться с двумя рецепторами сразу. В связи с двумя разными типами лигандов и рецепторов возможны различные виды взаимодействий, а

именно: α/α PRGFR и A/A, A/B, B/B; α/β PRGFR с A/B и B/B; β/β взаимодействует лишь с B/B лигандами. PRGFR инициируют схожие, но слегка различные клеточные эффекты. PGDFR регулируют стимуляцию пролиферации клеток, перестройки нитей актина, хемотаксис, мобилизацию Ca^{2+} , защиту против апоптоза. Оба вида PRGFR содержат в своём составе пять иммуноглобулиновых доменов в межклеточной области, один трансмембранный домен и цитоплазматическую область, содержащую сплит-вставленный киназный домен. Лиганды PDGF связываются с тремя N-терминальными областями иммуноглобулина и вызывают димеризацию рецептора, которая, предположительно, протекает через четвертый иммуноглобулиновый домен. Выравнивание двух рецепторов затем позволяет протекать аутофосфорилированию остатков тирозина рецептора, регулируя киназную активность. Тирозин-857 является единственным аутофосфорилируемым сайтом внутри киназного домена β PRGFR и этот остаток сохраняется также в α PRGFR (Y-849), играя большую роль в рецепторной активности киназы. Остальные одиннадцать сайтов аутофосфорилирования в β PRGFR находятся за пределами домена киназы и представляют собой сайты для взаимодействия с SH2-содержащими белками, которые опосредуют различные клеточные реакции. Изменения в сигнализации PRGFR может привести к aberrантной регуляции различных путей передачи сигналов, задействованных в опухолеобразовании.

1.1.3 Рецепторы васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGFR)

Ангиогенез является важнейшим событием во многих физиологических и патологических процессах, включает в себя формирование новых кровеносных сосудов из существующей сосудистой системы [23]. При нормальных условиях ангиогенез – ограниченный процесс, протекающий при эмбриогенезе, овуляциях, заживлением ран. Однако, в случае патологии, ангиогенез сопровождает рост опухоли,

метастазов, воспаление, ревматоидный артрит, неоваскуляризация, псориаз. Было показано, что многие цитокины и факторы роста вызывают ангиогенную активность. Одним из самых главных белков, задействованном в этом, является васкулярный эндотелиальный фактора роста (VEGF), который представляет ключевой фактор в патологических ситуациях, связанных с неоваскуляризацией, а также при повышенной проницаемости сосудов. Семейство рецепторов VEGF включает VEGFR-1 (Flt-1, Fms-подобная тирозинкиназа) и VEGFR-2 (KDR), которые принадлежат к большому семейству, содержащему также PRGFR и рецепторы cKit, c-Fms, Flt-3, Flt-4. Экспрессия VEGFR обычно низка и возрастает в случае развития патологии, связанной с неоваскуляризацией. Рецепторы этого типа характеризуются наличием семи иммуноглобулин-подобных доменов во внеклеточной части, одной трансмембраной части и внутриклеточного тирозинкиназного сплит домена. Лиганды, которые связываются с VEGFR1 – VEGF-A, VEGF-B, а также связанные факторы роста плаценты (PlGF); с VEGFR2 связываются VEGF-A, VEGF-C и VEGF-D. VEGFR образуют димеры, которые подвергаются аутофосфорилированию на цитоплазматических остатках тирозина, что способствует связыванию и фосфорилированию адапторных белков Shc, Nyc, связыванию Grb2. Последующие эффекты, связанные с функцией VEGFR в ангиогенетических процессах, включают продукцию протеаз, выделение определенных интегринов и стимуляцию клеточной миграции и пролиферации.

1.1.4 Рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR)

Семейство белков FGF состоит из различных факторов, которые показывают 30-70% идентичность их первичной аминокислотной последовательности [24]. FGF являются мощными митогенами для широкого спектра различных типов клеток и связываются с четверкой структурно родственных рецепторов (FGFR), что приводит к внутриклеточной передачи сигнальных каскадов. Димеризация мономеров FGFR происходит после

связывания лигандов и необходима для активации тирозинкиназных доменов и трансфосфорилирования рецептора. Активация рецептора приводит к аутофосфорилированию цитоплазматических остатков тирозина, которые служат сайтами докинга для различных молекул сигнальной передачи, которые передают сигналы от рецепторов, приводя в конечном итоге к биологической реакции.

Четыре FGFR имеют схожую структуру. Внеклеточный домен состоит из двух или трех иммуноглобулино-подобных доменов. Внеклеточная часть связана через один трансмембранный домен с цитоплазматической частью, образованной С-концевым, киназным и околосмембранным доменами. Околосмембранный домен FGFR куда длиннее, чем у других тирозинкиназных рецепторов. В случае околосмембранного домена FGFR1 и FGFR2 наблюдается один сайт фосфорилирования, а у FGFR3 и FGFR4 такой участок отсутствует. Как и VEGFR, тирозинсодержащие домены GFGR разделены короткими некаталитическими вставками длиной примерно 15 аминокислот. В этом регионе у FGFR1 и FGFR2 находятся два тирозиновых остатка, которые могут быть фосфорилированы. В случае FGFR3 обнаружен один сайт фосфорилирования. В С-терминальном хвостовом регионе содержится несколько остатков тирозина, часть из которых находится в одинаковой позиции в этом классе рецепторов.

За связыванием FGF следует гомо или гетеродимеризация FGFR. Как и для многих других RPTK, димеризация сопровождается конформационными изменениями, что, как видно, является важным требованием для активации тирозинкиназы. Кроме киназного домена имеется пять цитоплазматических остатков тирозина в FGFR1. Y463, Y583, Y585, Y766 потенциально фосфорилируются и являются сайтами для докинга SH2, в то время как Y776 – нет. В случае фосфорилирования Y766 взаимодействует с SH2-содержащими белками, связывая фосфолипазу C α . В домене киназы FGFR1 были определены три сайта фосфорилирования тирозина, а именно: Y653, Y654, Y730. Y563 Y654 участвуют в регуляции активности киназы,

поскольку их мутации приводят к потере активности. FGF, как известно, способствует эндотелиальной миграции, пролиферации и дифференциации. Как и VEGF, FGF играет важную роль в регуляции ангиогенеза.

1.1.5 Митоген-активируемые протеинкиназы группы p38 (p38 MAPK)

Было показано, что митоген-активируемые протеинкиназы играют важную роль в качестве промежуточных передатчиков сигналов между внеклеточными источниками и клеточным ответом на них [25]. Некоторые группы MAPK идентифицированы в клетках млекопитающих и характеризуются каноническим двойным сайтом фосфорилирования (ТХУ) или другими последовательностями аминокислот. Группа p38 MAPK состоит из множества членов, которые содержат фрагмент TGY, обладают схожей последовательностью аминокислот на 60% и представлены p38 α , p38 β , p38 γ , p38 σ . Киназы этого типа играют важную роль в случае ответов на стресс, воспаление, активируют противовоспалительные реакции, фактор некроза опухолей, интерлейкин-1 и другие, стимулируют определенные генные продукты, например, индуцибельную синтазу оксида азота и циклогексеназу-2 (COX-2), которые вовлечены в провоспалительные цитокин-опосредованные заболевания. Например, ревматоидный артрит – это системное заболевание иммуновоспалительной системы, характеризующееся эрозивным, воспалительным заболеванием суставов. Был выявлен широкий спектр провоспалительных медиаторов при этой болезни, наиболее важными среди них являются цитокины. Хотя различные цитокины могут быть обнаружены в тканях синовиальной оболочки, наиболее важными являются IL-1 β , TNF- α . Каскад p38 MAP участвует в выработке TNF- α и IL-1. Кроме того, TNF- α и IL-1 активируют каскады p38 MAP в фибробластах и других клетках, отвечающих за патологические процессы при ревматоидном артрите. Ингибирование киназ p38 MAP в макрофагах может замедлить производство TNF- α и IL-1, тем самым снижая основные цитокины, участвующие в активации пролиферации синовиоцитов и фибробластов.

Ожидается, что подавление p38 α в синовиоцитах и фибробластах приведет к подавлению COX-2, уменьшая воспаление и замедляя разрушение хряща [26-28].

1.1.6 Циклин-зависимые киназы (CDKs)

В многоклеточных организмах существует баланс между клеточной пролиферацией и гибелью клеток, за счет чего поддерживается гомеостатическое равновесие; поэтому, независимо от того, делится клетка или умирает, это событие связано с деятельностью клеточного цикла [29]. Следовательно, точное регулирование клеточного цикла имеет решающее значение для нормального развития, в то время как опухолевые процессы могут рассматриваться как нарушение данного цикла. Митоген-индуцируемая прогрессия через первую фазу (G1) и иницирование синтеза ДНК (S-фаза) в течение клеточного цикла млекопитающих регулируется серией серин/треонинкиназ циклин-зависимыми киназами (CDKs), чья активность в свою очередь регулируется ингибиторами CDK (CKIs). Пролиферирующие клетки проходят четыре фазы клеточного цикла: G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M (сегрегация удвоенных хромосом в дочерние клетки), при этом каждая фаза контролируется различными CDKs. Инициация клеточного цикла в нормальных клетках требует факторов стимуляции роста и его развитие зависит от различных CDKs, чья движущая сила уравнивается молекулами-супрессорами (например, такими супрессорами роста опухолей, как p53, pRb, CKIs). Критические события в клеточном цикле, такие как репликация ДНК и сегрегация хромосом, строго контролируются рядом факторов, в том числе совместным действием p53, pRb, CDK1, CDK2. Обычные клетки могут остановиться на фазе G1, в тех случаях, когда требуется процесс репарации ДНК. Для этого выделяется ингибитор CDK2 – p21. Роль некоторых CDK в клеточном цикле делает их идеальными мишенями для ингибирования молекулами-ингибиторами киназ для лечения опухолей.

1.2. Химические остовы, используемые при дизайне и синтезе АТФ сайт-направленного конкурентного и необратимого ингибитора протеинкиназ

1.2.1 Хиназолины

Хиназолиновый скаффолд претерпел различные исследования зависимости структура-активность и биологической активности и в настоящий момент, по крайней мере, три хиназолина проходят клинические испытания (соединения **1-3** на рисунке 1).

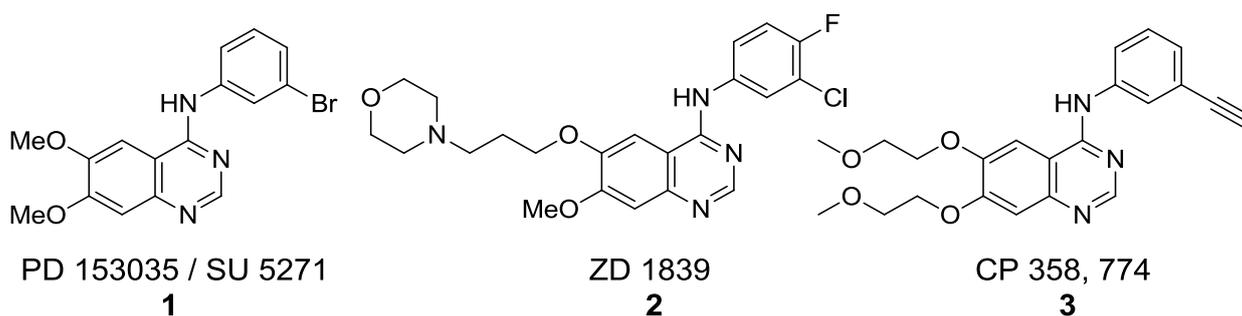


Рисунок 1 – Структуры производных хиназолина, проходящие клинические испытания

Молекула PD 153035 **1** первоначально была опубликована Parke-Davis [30], но на данный момент она проходит клинические испытания первой фазы Sugen (SU 5271) при лечении псориаза [31]. Данное вещество является сильным ($k_i = 6$ pM) и селективным ингибитором EGFR тирозинкиназы, подавляющим аутофосфорилирование EGFR в клетках A431 при наномолярных концентрациях [32]. При испытаниях *in vitro* наблюдалось ингибирование роста клеток и индуцирование апоптоза в различных клеточных линиях рака [33-34]. Противоопухолевая активность соединения **1** в клетках увеличивается, в случае совместного лечения с моноклональными антителами C225 [35]. Для исследования характеристик *in vivo* PD 153035 позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ), было получено [метокси- ^{11}C]PD 153035 с помощью *O*-алкилирования *O*-десметила иодистым метилом [^{11}C] (точно положение моно-деметиляции неизвестно) [36]. Полный синтез, включая дериватизацию, очистку, формирование и стерильное фильтрование, занял 45-50 минут, при этом радиохимическая чистота

составляла более 99% (радио-ВЭЖХ). Распределение маркированного соединения оценивалось *in vivo* у здоровых и больных раком крыс с помощью ПЭТ. Соединение показало обнадеживающее биораспределение, но наблюдалась проблема с доставкой PD153035 в ксенотрансплантаты A431 у иммунодефицитных мышей, которая повлияла на развитие этого вещества в качестве противоракового агента [32].

Одним из наиболее перспективных производных 4-фениламинохиназолина является ZD 1839 2 [37-38], разработанный Astra-Zeneca для лечения рака и в данный момент проходит фазы Ib/II клинических исследований. Данное соединение является сильным АТФ сайт-направленным ингибитором EGFR ($k_i = 2.1$ нМ на очищенном рецепторе, $IC_{50} = 23-79$ нМ) и демонстрирует отличную активность относительно ксенотрансплантов солидных опухолей человека у голых мышей. В случае перорального введения 10 мг/кг/день наблюдается 50% снижение роста опухолевых клеток A431 (эпидермоидная карцинома), а в случае приема 200 мг/кг/день в течение двух недель наблюдается полная регрессия крупных опухолей. Рост опухоли был подавлен за четыре месяца, но при приостановлении лечения наблюдался повторный рост. Также активность наблюдалась против A549 (аденомокарцинома легких), KB (эпидермоидная карцинома), HT29 (карцинома толстой кишки), HX62 (рак яичников), MCF-7 (карцинома молочной железы) и Du145 (карцинома предстательной железы).

Соединение CP 358,774 3 является соединением от Pfizer [39-41], которое проходит фазу II клинических исследований лечения рака. Оно также является сильным АТФ сайт-направленным ингибитором EGFR тирозинкиназы ($IC_{50} = 1-2$ нМ) и высокоселективным (более чем тысячекратная селективность) относительно других тирозинкиназ (например, pp60^{v-src}, pp145^{c-abl}, IGF-IR или InsR). В случае голых мышей, содержащих ксенотрансплант HN5 (рак шеи и мозга), при пероральном приеме 10 мг/кг/день наблюдалось 50% ингибирование. Ингибирование A431 потребовало более высокую дозу – 200 мг/кг/день. Равномерное

распределение в раковых образованиях HN5 наблюдалось с помощью радио-меченных соединений.

Помимо описанных выше клинических кандидатов, была проделана колоссальная работа в синтезе и оценке биологической активности целого ряда хиназолиновых производных, включая 4-, 6- и 7-замещенные хиназолины (например, соединения **4-6**, рисунок 2) и трициклические аналоги хиназолина (например, **7-9**, рисунок 2) [42-52].

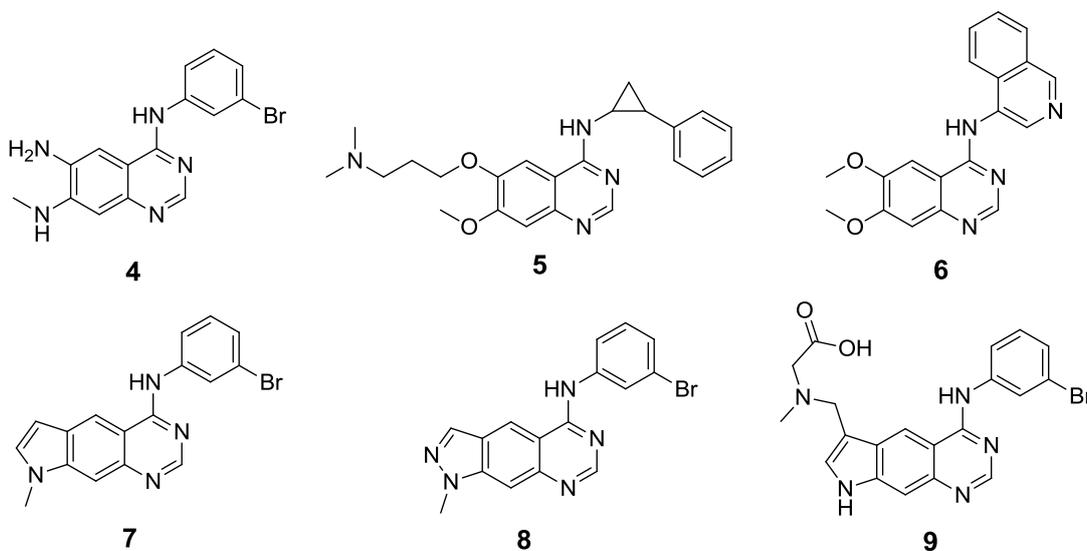


Рисунок 2 – Примеры 4-,6- и 7-замещенных хиназолинов и трициклических аналогов хиназолина

Не так давно было сообщено о новом классе селективных и необратимых ингибиторов с субнаномолярной активностью относительно рецепторов EGF и erbB-2 [53-55]. Суицидные ингибиторы (например, соединения **10-14**, рисунок 3) содержат акцепторы Михаэля в 6 или 7 положении хиназолинового скаффолда и используют наличие цистеинового остатка в сайте связывания АТФ для создания продукта присоединения при связывании с ферментом. Цистеин-773, который расположен на удлиненной растяжке EGFR, является уникальным для семейства EGFR, тем самым обеспечивая селективность (примерно стократную) относительно других рецепторов или внутриклеточных киназ (например, InsR, PDGFR, bFGFR и PKC). Специфическое алкилирование цистеина-773 с помощью PD 168393 **12**

было подтверждено набором экспериментальных данных, включая масс-спектр и сайт-направленный мутагенез (Cys773Ser) [54]. Молекулярное моделирование показало, что β -углерод 6-акриламидного фрагмента оптимально расположен для реакции с цистеином-733 ($d = 3.5 \text{ \AA}$), в то время, как 7-акриламидная боковая цепь недостаточно близка для индуцирования быстрого алкилирования ($d = 8 \text{ \AA}$). PD 183805 **13** [56-57] является сильным ингибитором EGFR киназ ($IC_{50} = 1.5 \text{ нМ}$, изолированный фермент), а также ингибирует херегулин-вызванную клеточную пролиферацию ($IC_{50} = 9 \text{ нМ}$). Это соединение практически на пороге первой фазы клинических испытаний.

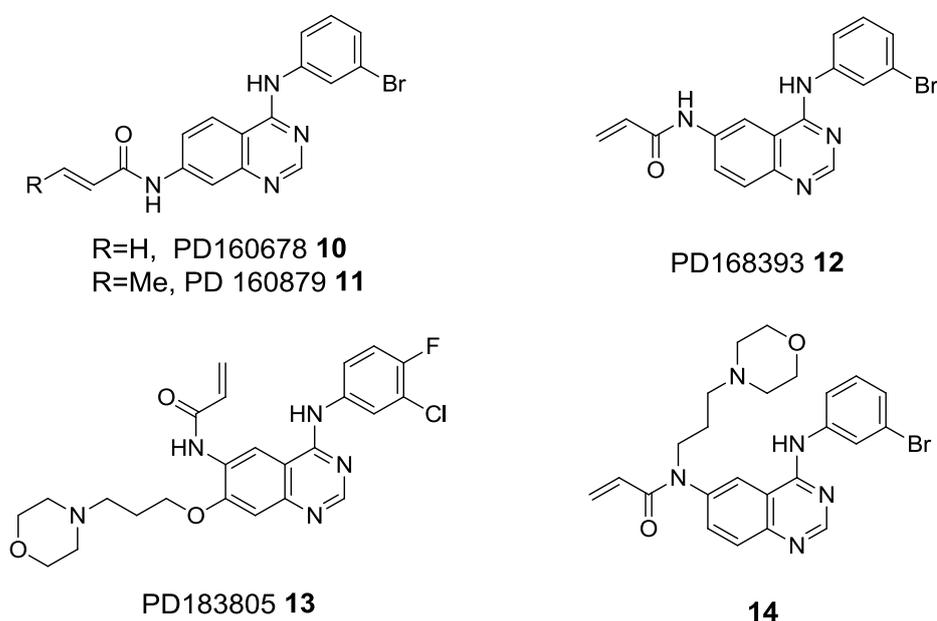


Рисунок 3 – Некоторые 4-фениламинохиназолины, выступающие в роли необратимых ингибиторов

Дополнительные исследования структура-свойство 6- и 7-замещенных акриламидохиназолинов и акриламидопиридо[*d*]пиримидинов показали, что пиридо[3,2-*d*]пиримидиновые производные были несколько менее мощнее (в 2-6 раз) в клеточном аутофосфорилировании EGFR с использованием клеток A431 [53]. Кроме того, аналоги хиназолинов как правило менее действенны в клеточных испытаниях против erbB-2, нежели EGFR, в то время как пиридо[*d*]пиримидины были одинаково эффективны в обоих случаях. Некоторые соединения показали хорошую активность *in vivo* против ксенотранспланты A431, H125, но имели довольно слабую растворимость в

воде, в связи с чем, требовалась их оформление в виде тонкодисперсных эмульсий. Более растворимые производные (например, **14**) были получены Warner Lambert для улучшения фармакокинетики данного класса ингибиторов [58-60].

Также имеются сообщения о производных хиназолина в качестве ингибиторов киназ RAF (например, соединение **15** $IC_{50} = 100$ нМ в испытаниях фосфорилирования MEK) [61], c-erbB2/c-erbB4/EGFR (например, для соединения **16** $IC_{50}^{c-erbB2} = 16$ нМ, $B4 = 30$ нМ, $IC = 1$) [42,45,62], CSF-1R (например, **17**, $IC_{50} = 0.5 \mu M$) [47,51] и VEGFR (например, **18**, $IC_{50}^{KDR} = 30$ нМ $IC_{50}^{Flt} = 30 \mu M$; соединение **18** вступает в фазу 1 клинических испытаний) [63-72]. Описанные соединения (**15-18**, рисунок 4) представляют собой пример того, как медицинские химики придали эффективность и селективность хиназолиновому скаффолду моделированием и оптимизацией взаимодействия с выбранными протеинкиназами.

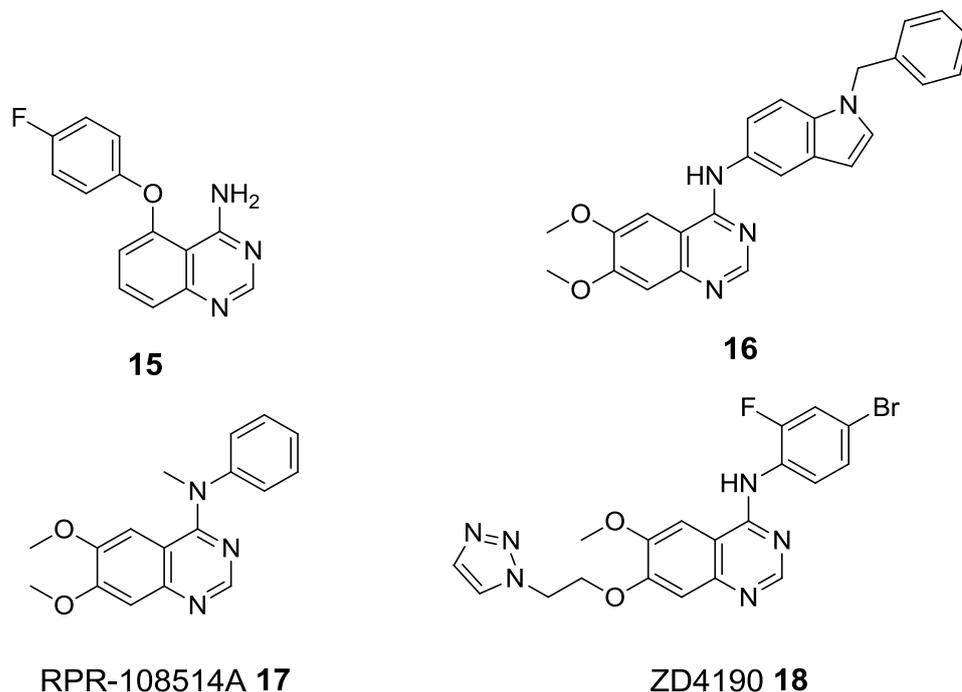


Рисунок 4 – Другие примеры хиназолиновых производных

Помимо классических подходов к синтезу в растворах, имеются сообщения о синтезе 4-анилинозамещенных хиназолинов и оксоиндольных хиназолинов в твердой фазе [73]. 2-Карбоксихиназолины получают в две стадии на гидроксиметилполистирольной смоле и подвергаются

функционализации по положению С-4 с использованием описанных ранее подходов в растворах [74]. Положение С-7 хиназолина связанного с полимером модифицируется реакцией Митсуноби, а введение оксоиндольного заместителя в положении С-4 достигается нуклеофильным замещением тиозфирной связи. Очистка финальных соединений достигается твердофазной экстракцией с использованием сульфоновой кислоты [73].

1.2.2 Фениламино-пиримидины

Показательным примером этого данного класса соединений является STI 571 (CGP 57148) **19**, двойной ингибитор тирозинкиназ v-Abl ($IC_{50} = 0.5$ нМ) и PDGFR ($IC_{50} = 50$ нМ) [75], который в данный момент проходит первую фазу клинических испытаний Novartis на пациентках с хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Это соединение показывает высокую селективность против группы других протеин-тирозин и серин/треонин киназ [75-76] и ингибирует аутофосфорилирование V-Abl и PDGFR в интактных клетках с аналогичными значениями IC_{50} (0.3 мМ). Кроме того, STI 571 демонстрирует мощную противоопухолевую активность *in vivo* против v-Abl и v-Sis-трансформированных BALB/c 3T3 клеток голых мышей [77].

Фениламино-пиримидиновые производные [78-79] были изначально определены в качестве двойных ингибиторов, действующих на киназы PDGFR [80] и РКС- α [81] (например, соединение 20, рисунок 5). Селективность для PDGFR против серин/треонин киназ была достигнута введение метильной группы в шестое положение фенильного кольца. Потеря активности против РКС- α с наибольшей вероятностью вызвана стерическим столкновением модифицированного ингибитора с остатками, формирующими сайт связывания АТФ протеинкиназ семейства С. Возросшая активность и селективность относительно v-Abl была достигнута масштабной работой по оптимизации фенильного кольца [75].

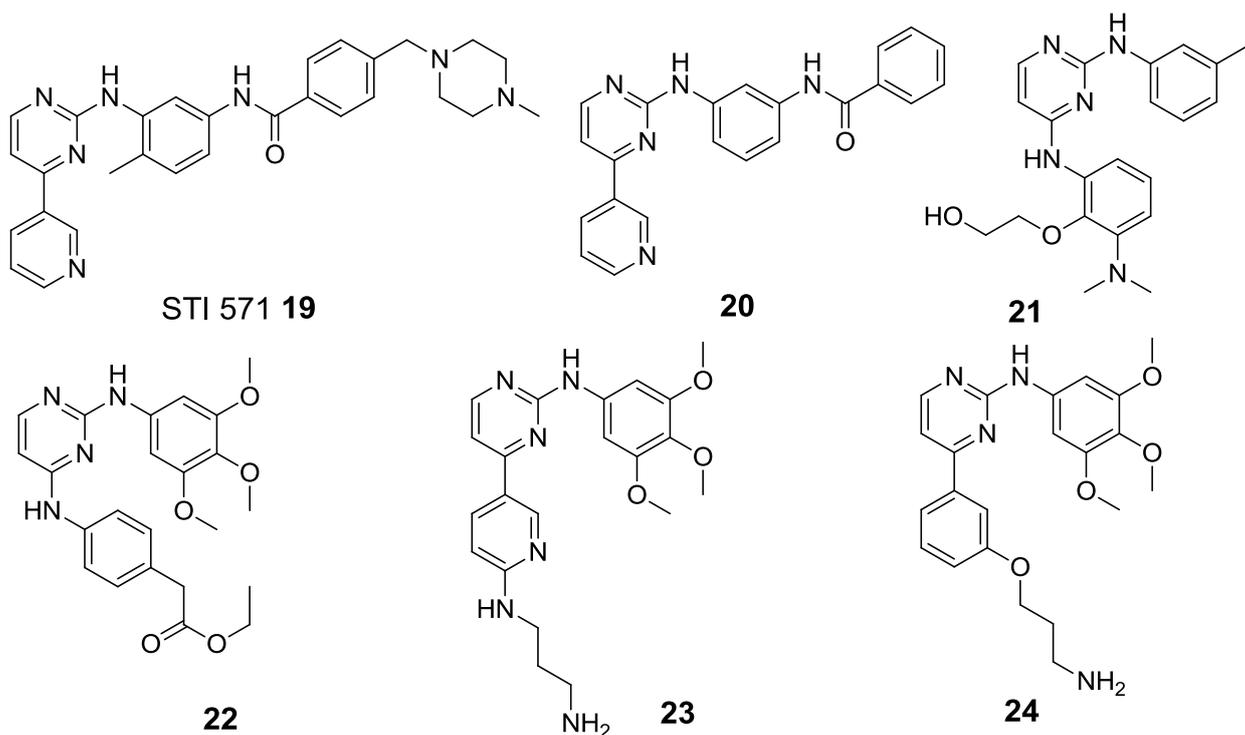


Рисунок 5 – Примеры фениламинопиримидинов

Известно, что 4,6-дианилинопиримидиновые производные являются сильными ингибиторами EGFR тирозинкиназ (например, соединение **21**, $IC_{50} = 1.0$ нМ) [82]. Киназные домены Lck, Fyn, ZAP-70, Csk, EGFR и PKC могут быть ингибированы замещенными 2-анилинопиримидинами (например, **22** $IC_{50}^{Lck} = 540$ нМ, **23**; $IC_{50}^{Fyn} = 68$ нМ; **24**, $IC_{50}^{PKC} = 22$ нМ) [83].

1.2.3 Пиридо[*d*]пиримидины и пиримидо[*d*]пиримидины

Пиридо[*d*]пиримидины впервые были запатентованы Warner Lambert [84-85] и с тех пор пиридо[4,3-*d*]-, пиридо[3,4-*d*]-, пиридо[2,3-*d*]- и пиридо[3,2-*d*]пиримидиновые остовы были использованы в качестве активных соединений относительно ряда киназ (рисунок 6). После первоначального доклада о 4,7-диаминопиридо[4,3-*d*]пиримидинах в качестве сильных ингибиторов EGFR (например, **25**) [86], были проведены обширные SAR исследования всех четырех возможных изомеров пиридо[*d*]пиримидинов, которые можно рассматривать в качестве азааналогов хиназолинов, показавшие значительную разницу между ними в качестве ингибиторов EGFR [87]. Для исследованных соединений, [3,4-*d*]- и

нейтральные (спирты и полиолы), катионные (амины) и анионные (карбоксилаты) [89]. Заместители были введены в 7 положение, которое согласно более ранним исследованиям моделирования лежит на входе аденинового связывающего фрагмента, предоставляя некоторую свободу для размещения объемистых групп. Наиболее эффективным заместителем с точки зрения растворимости в воде (> 40 мМ) и высокой активности как в ферментных, так и клеточных испытаниях являлась слабоосновная аминогруппа (например, соединение **30** $IC_{50} = 1.9$ нМ в испытаниях изолированного фермента EGFR). Существенные задержки в росте опухоли наблюдались в ксенотрансплантате A431, обрабатываемом соединением **30** (25 мг/кг/инъекции на 7-21 день после имплантации опухоли).

Пиридо[3,4-*d*]- и пиридо[4,3-*d*]пиримидины также были описаны в качестве ингибиторов киназ c-erbB2 и c-erbB4 ($IC_{50} = 11-100$ нМ) [90-92] и EGFR тирозинкиназы, совместно с анти-ангиогенными свойствами (соединение **31**) [93-94].

Производные пиридо[2,3-*d*]пиримидинов, выявленные через скрининг библиотеки соединений (соединения **32** и **33**, рисунок 7), оказались активными против киназ PDGFR, FGFR и pp60^{c-src} [95]. Обширные данные SAR-анализа были получены группами Parke-Davis/ Warner Lambert введением различных заместителей в положения C-2, C-6, C-7 и N-8 [96-98]. Для разработки модели режима связывания этого класса соединений были использованы данные по отношению структура-активность совместно с данными рентгеноструктурного анализа, полученные от лиганд-связанных с АТФ киназ или конкурентных ингибиторов. В этой модели пиридо[2,3-*d*]пиримидины предположительно имеют водородную связь, схожую с оломуцином с азотом N-3 и экзоциклическим 2-аминоводородом, образуя бидентантную систему водородных связей с двумя амино остатками. Кроме того, 6-фенилзамещенный фрагмент отстраняется от оболочки АТФ и взаимодействует с глубокими областями центра связывания аденина, состоящим из прядей 4, 5 и 8, а также α С спирали. Далее был проведен

структурно-ориентированный дизайн сильных и селективных ингибиторов с применением доступной структурной информации. Таким образом, селективность относительно EGFR достигалась замещением 2,6-дихлорофенильной группы в 6 положении пиридо[2,3-*d*]пиримидинового scaффолда 3,5-диметоксифенильным фрагментом. Так, соединение PD166866 **34** имеет $IC_{50} = 60$ нМ относительно FGFR и не ингибирует киназы PDGFR, MAP, CDK4, EGFR и InsR при 40 нМ [97-98].

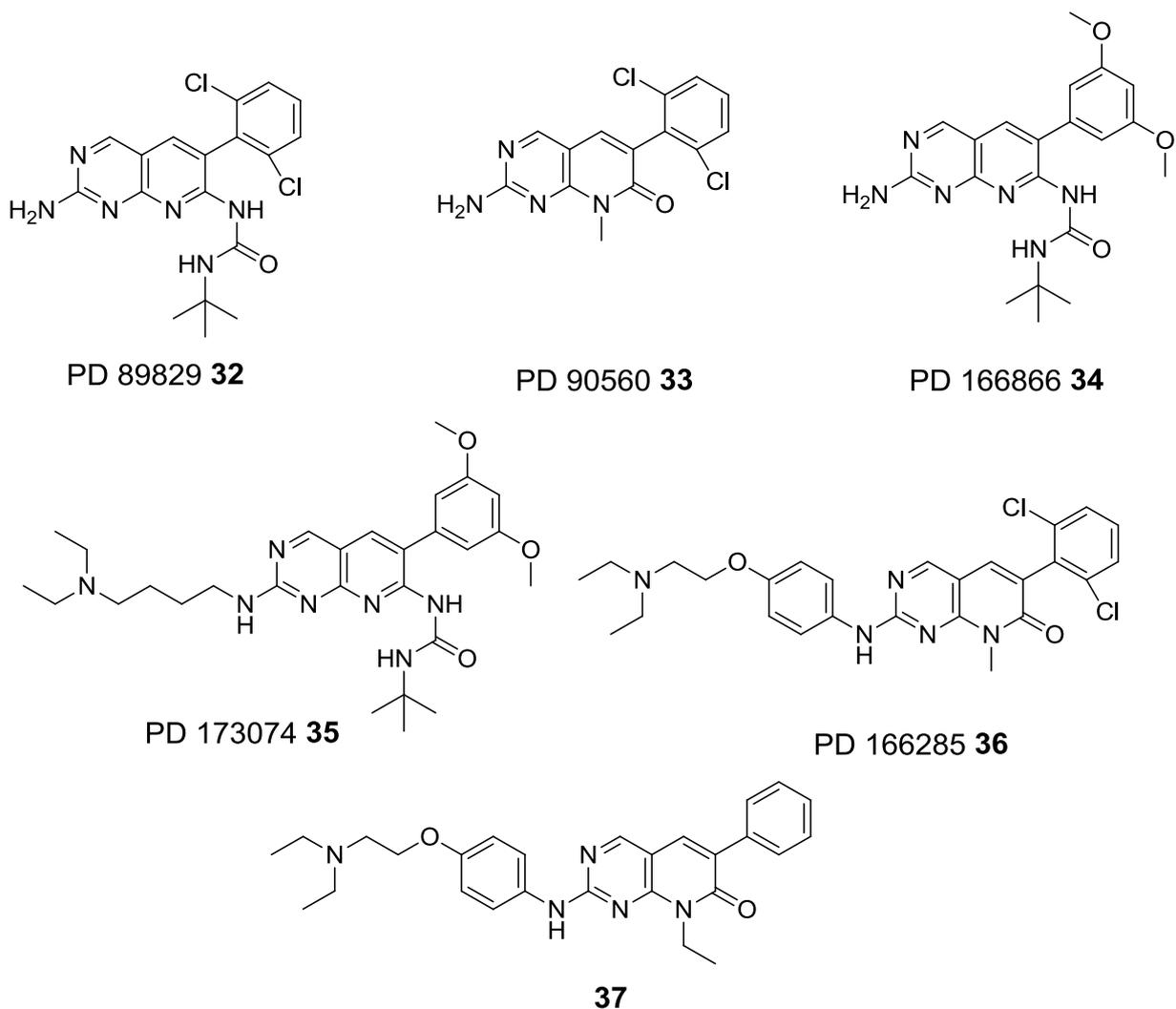


Рисунок 7 – Примеры пиридо[2,3-*d*]пиримидинов

Дальнейшая оптимизация данной структуры привела к соединению PD 173074 **35**, для которого были проведены *in vitro* испытания, показавшие эффективность и селективность соединения относительно киназ FGFR1 и VEGFR2 [99]. Эффективность этого соединения в качестве ингибитора bFGF или ангиогенеза вызванного VEGF была оценена *in vivo* [100]. Существенное

ингибирование bFGF или VEGF без наблюдаемой токсичности проявилось при концентрациях 1 мг/кг/день и 2 мг/кг/день.

Рентгеновская структура домена тирозинкиназы FGFR1 связанного с PD 173074 **35**, а также ранее сообщенные данные по SAR [97], позволили осознать, какой молекулярный базис ответствен за высокую селективность. Высокая комплементарность наблюдалась между ингибитором и АТФ-связывающей петлей белка, она была в основном вызвана 3,5-диметоксиофенильной группой, присоединенной к 6 положению пиридо [2,3-*d*]пиримидина, что подчеркивает силу и селективность PD 173074 **35**.

Модификация аминогруппы 2-амино-6-(2,6-дихлорфенил)-8-метил-8*H*-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-оного остова привела к обнаружению сильных ингибиторов разнообразных тирозинкиназ [96]. Например, PD 166285 **36** у которого IC₅₀ составляет 79, 43, 9 и 44 нМ против активности тирозинкиназ PDGFR, bFGFR, c-src и EGFR, соответственно; также ингибировал PDGF- и EGF-вызванное аутофосфорилирование рецептора во многих клеточных линиях со значениями IC₅₀ 1.6-0.0065 μМ [101]. Исследования соединения *in vivo* показали его эффективность лишь относительно ограниченного числа моделей рака. Однако, по причине высокой активности соединения против целевых протеинкиназ, PD 166285 рекомендовали в качестве потенциального кандидата на клинические испытания с терапевтическим потенциалом при раке и других заболеваниях.

Не так давно были описаны методики синтеза и биологическая оценка серии производных 2-амино-6-(2,6-дихлорфенил)-8-метил-8*H*-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-она, содержащих заместители в С-6 и N-7 положениях [102]. Соединение **37** является чуть более сильным ингибитором PDGFR, чем PD-166285 (IC₅₀ 31 нМ против 89 нМ), а также ингибирует тирозинкиназную активность vFGFR (IC₅₀ = 88 нМ) и c-src (IC₅₀ = 31 нМ). Также это соединение было активно в нескольких PDGF-зависимых клеточных испытаниях и блокировало рост *in vivo* PDGF-зависимых линий рака при оральном приеме в дозах 30-40 мг/кг.

Помимо описанных ранее необратимых ингибиторах хиназолинового типа, были описаны необратимые ингибиторы сайта связывания АТФ рецепторов эпидермального фактора роста на основе 4-(фениламино)пиридо[*d*]пиримидин акриламида [53]. Хиназолин, пиридо[3,4-*d*]пиримидин и пиридо[3,2-*d*]пиримидин 6-акриламиды показали в основном схожую активность в изолированных ферментах, хотя производные пиридо[3,2-*d*]пиримидина были чуть менее активны, чем аналоги в испытании аутофосфорилирования EGFR.

Сравнительное исследование серии изомеров пиридо[*d*]пиримидинов, описанное выше [87], было дополнено теми же авторами получением серии 6-замещенных 4-анилинопиримидо[5,4-*d*]пиримидинов в качестве ингибиторов EGFR [103]. Соединение **38** (рисунок 8) является наиболее сильным ингибитором в серии относительно клеточных испытаний аутофосфорилирования EGFR эпидермоидной карциномы A431 ($IC_{50} = 31$ нМ). Результаты SAR для данного класса изомеров более напоминали результаты для серии [3,2-*d*], чем для пиридо[3,4-*d*]пиримидинов. Конформационный эффект N-5 в пиридо[3,2-*d*]пиримидинах и пиримидо[5,4-*d*]пиримидинах и C-5 в пиридо[3,4-*d*]пиримидинах был отображен с использованием рентгеноструктурного анализа структур. Углерод в большей степени, чем азот приводит к значительным конформационным изменениям в молекуле: (i) длиннее C5a-C4 связи; (ii) 30° угол поворота фенильной группы. Эти структурные изменения могут быть связаны с несвязывающим взаимодействием между протонами C-5 и N-9. В других сообщениях также были описаны пиримидо[5,4-*d*]пиримидины и оценена их активность в качестве ингибиторов EGFR (например, **39**, $IC_{50} = 1$ нМ; **40**, $IC_{50} = 21$ нМ) [104-105].

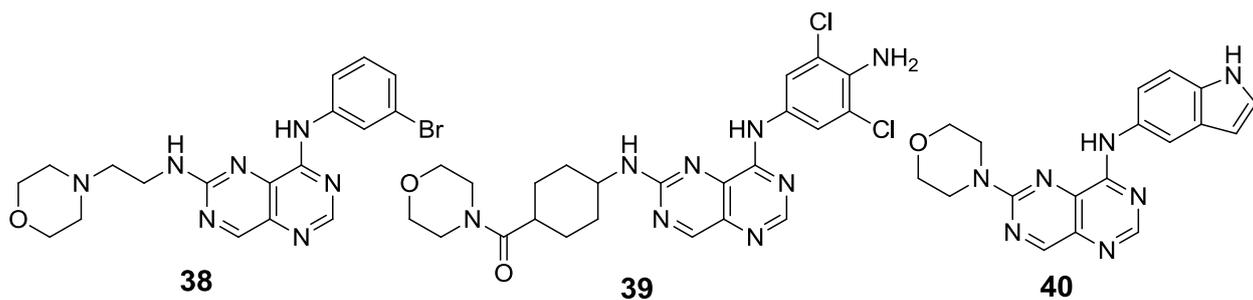


Рисунок 8. Примеры пиримидо[5,4-*d*]пиримидинов

1.2.4 Пирроло[*d*]пиримидины и пирроло[2,3-*b*]пиридины

Остов пирроло[*d*]пиримидина был использован некоторыми фармацевтическими компаниями для ингибирования домена тирозинкиназ EGFR и c-Src.

Оптимизация производных 7*H*-пирроло[2,3-*d*]пиримидина против EGFR проводилась компанией Novartis за счет использования в качестве фармакофорной модели для сайта связывания АТФ рецепторы, описанные выше [106-107]. Согласно этой модели, NH фрагмент пиррольного кольца и атом N-1 пиримидинового цикла образуют при помощи водородных связей бидентантную донорно-акцепторную систему с глутамином-767 и метионином-769, а замещенный анилиновый фрагмент в положении C-4 взаимодействует с другим фрагментом, а именно цистеином-773, что является уникальным для семейства EGFR киназ. Кроме этого, заместители в положениях 5 и 6 могут вызывать ван-дер-ваальсовы взаимодействия с гидрофобными частями, обычно не используемыми естественными лигандами АТФ. К этому классу структур относится CGP 59326 (структура **41** на рисунке 9) – это соединение было выбрано в качестве кандидата для дальнейшей разработки. Оно показало хорошую эффективность и селективность в испытаниях *in vitro* ($IC_{50} = 27$ нМ), а также способность подавлять EGF-стимулированное фосфорилирование в клетках ($IC_{50} = 0.3$ мМ). Помимо этого, данное вещество демонстрировало хорошую антипролиферативную активность ($IC_{50} = 0.5-1.9$ мМ) против целого ряда

EGFR-положительных эпителиальных клеточных линий (например, NCL-H596, MDA-MB468, A431), но плохую активность против EGFR-отрицательных клеточных линий (NCL-H520, NCL-H69).

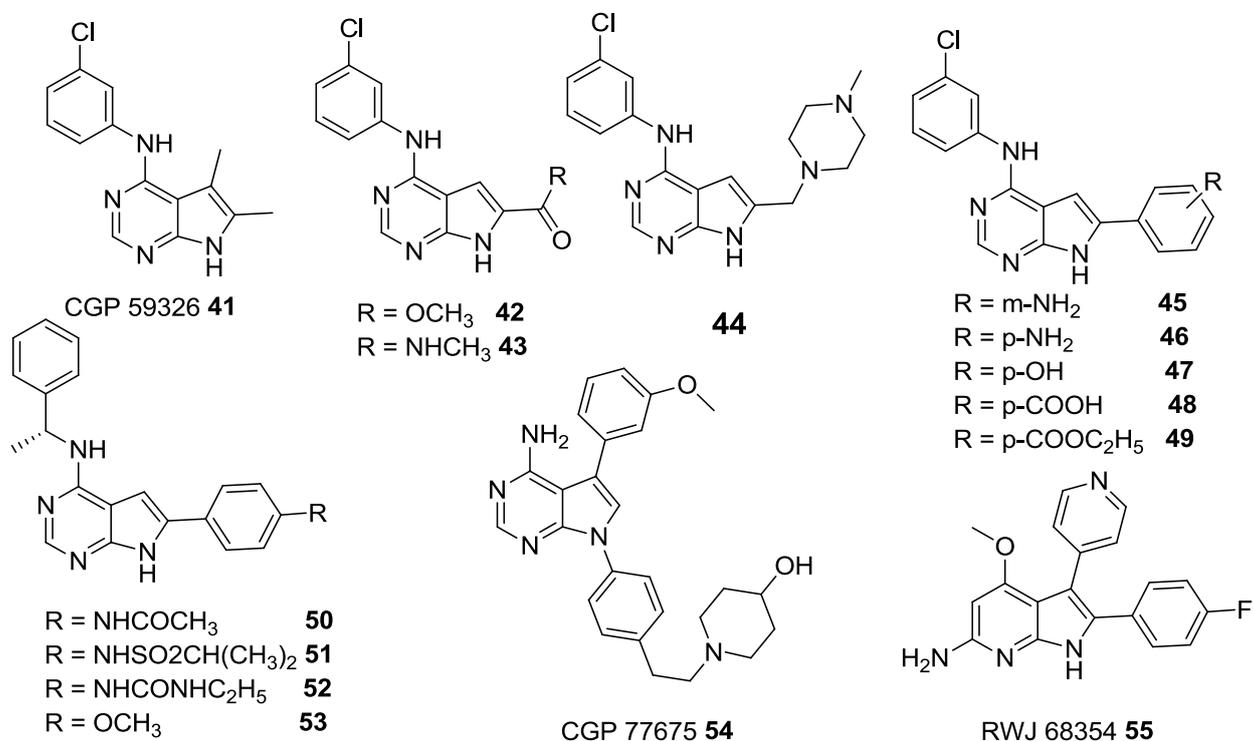


Рисунок 9 – Примеры пирроло[*d*]пиримидинов и пирроло[2,3-*b*]пиридина

Улучшенные биологические и физико-химические характеристики для данной серии веществ были достигнуты за счет модифицирования 4 и 6 положений пирроло[2,3-*d*]пиримидинового остова. С целью улучшения ван-дер-ваальсовых взаимодействий с гидрофобной частью, сформированной остатками треонина-766 и треонина-860, в положение 6 были введены самые разнообразные заместители: эфирные **42**, амидные **43**, гетероциклические **44** и арильные **45-49**. Результатом такой модификации стало в большинстве случаев увеличение активности относительно EGFR киназ (IC₅₀ = 1-5 нМ). Кроме того, замена *m*-хлоранилинового фрагмента в положении 4 на (R)-фенитиламиную группировку значительно улучшило фармакокинетические свойства соединений (например, структуры **50-53**). Наилучшие производные в серии (*in vitro* IC₅₀ = 1-3 нМ) были перорально биодоступными (с_{max} > 10 μM, 50-100 мг/кг/мышь) и блокировали вызванное EGF фосфорилирование в

EGFR-положительных клетках A431 ($IC_{50} = 10-50$ нМ). Кроме того, в случае EGFR-положительных эпителиальных клеточных линий наблюдалась антипролиферативная активность ($IC_{50} = 0.1-0.4$ μ М), тогда как активности в случае EGFR-отрицательных клеток по-прежнему не наблюдалось. Производные из этой серии проходят первую фазу клинических испытаний.

Компания Novartis также представила исследования по группе производных пирроло[3,2-*d*]- и [2,3-*d*]пиримидинов в качестве ингибиторов тирозинкиназы pp60^{c-Src} [111-117]. Стоит отметить, что для 5,7-замещенных пирроло[2,3-*d*]пиримидинов была предложена другая схема связывания с сайтом АТФ pp60^{c-Src}. Бидентантная система с белком устанавливается за счет водородных связей с аминогруппой в положении 4 и атомом азота N-3. Заместитель при пиррольном атоме азота взаимодействует с углеводным участком, а заместитель в положении 5 взаимодействует с гидрофобной составляющей за счет ван-дер-ваальсовых сил. Соединение **54** ингибирует фосфорилирование субстратов c-SRC киназой с IC_{50} 20 нМ и обладает умеренной специфичностью (7-500 кратная селективность) относительно других тирозин и серин/треонин киназ (например, EGFR, KDR, v-AB1, Cdc2 и Fak) или других членов семейства Src (Lck и Yes). Кроме того, данное соединение блокирует фосфорилирование тирозина в случае Fak и паксилаина в клеточной линии IC8.1 со сверхэкспрессией Src со значениями IC_{50} на уровне 0.3 и 0.5 μ М, соответственно. Однако эффект при фосфорилировании Src был куда скромнее – IC_{50} на уровне 5.7 μ М.

Производные пирроло[2,3-*b*]пиримидина были подвергнуты скринингу при клеточных испытаниях (ингибирование выработки TNF- α) с целью поиска ингибиторов киназ p38 [118]. Соединение **55** (RWJ 68354) является сильным ингибитором клеточной киназной активности p38 ($IC_{50} = 9$ нМ) и LPS-вызванной экспрессией TNF- α у мышей ($ED_{50} < 10$ мг/кг) и крыс ($ED_{50} < 25$ мг/кг). Данное соединение является наиболее предпочтительным для дальнейших доклинических испытаний.

1.2.5 Пиразоло[*d*]пиримидины

Сообщается, что производные пиразоло[3,4-*d*]пиримидина являются умеренными ингибиторами CSF-1R [47] и сильными ингибиторами тирозинкиназ Lck, FynT и EGFR.

Соединение **56** (рисунок 10) синтезировали как биоизостерическую замену хиназолинового фрагмента в программе CSF-1R Rhone-Poulenc Rorer. Такая замена обеспечивала селективность *in vitro* в отношении EGFR (IC_{50} 0.18 μ M CSF-1R по сравнению с IC_{50} 50 μ M EGFR).

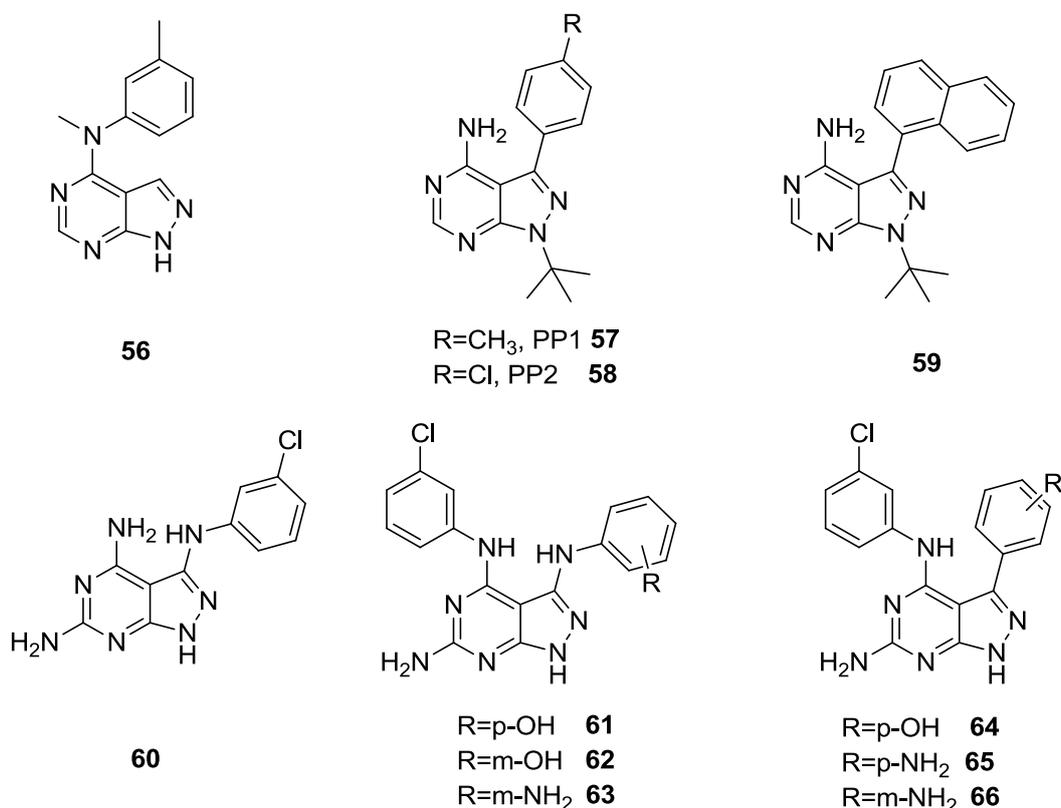


Рисунок 10 – Примеры пиразоло[3,4-*d*]пиримидинов

Соединение PP1 **57** было разработано на основе родительского соединения, идентифицированного в ходе случайного скрининга тирозинкиназы, и демонстрировало высокую активность и селективность *in vitro* против Lck (IC_{50} 5 нМ) и FynT (IC_{50} 6 нМ), при этом наблюдалась низкая микромолярная активность в интактных клетках [119]. Однако PP1 показывает сложную кинетику ингибирования Lck, и поэтому является конкурентным ингибитором АТФ, направленным на сайт только при определенных концентрациях АТФ. PP2 **58**, близкий аналог PP1 **57**, также

является сильным ингибитором Lck и FynT с величинами IC_{50} 4 и 5 нМ соответственно. Это соединение было сокристаллизовано с киназным доменом Lck, и рентгеновская структура показала, что PP2 **58** связывается в АТФ-связывающем участке фермента. Специфичность профиля PP2 **58** против других протеинкиназ интерпретировалась на основе взаимодействий, установленных 3-(4-хлорфенил)-заместителем с гидрофобным участком, который имеет уникальный аминокислотный состав для семейства киназ Src [120]. Структуру комплекса Lck-PP2 **58** использовали также для того, чтобы предложить способ связывания ингибитора с-Src – 1,3-дифенилпирроло[3,4-*d*]пиримидина.

Не так давно была сконструирована, синтезирована и подвергнута скринингу группа С3-производных аналогов PP1 **57** против каталитического домена рационально сконструированного белка v-Src (He338Gly, эта точечная мутация была введена для создания уникального кармана в сайте связывания АТФ v-Src). Из этой серии производных соединение **59** было идентифицировано как сильнодействующий и селективный ингибитор для мутированного домена v-Src киназы (IC_{50} 1.5 нМ против IC_{50} 5 мМ для v-Src дикого типа) [120]. Такой подход, основанный на структуре как протеинкиназы, так и ингибитора, может быть использован для проверки достоверности на клеточном уровне и для выяснения биологических событий, связанных с зависимыми от фосфорилирования сигнальными путями передачи.

Исходя из соединения–лидера, идентифицированного методом случайного скрининга (**60**, IC_{50} = 0.2 μ M), оптимизация структуры 4-фениламинопиразоло[3,4-*d*]пиримидина привела к очень сильным (**61-66** IC_{50} < 10 нМ *in vitro*; **61** и **62** IC_{50} < 50 нМ *in vivo*) и селективным (с-Src, v-Abl, PKC α и Cdk1) ингибиторам тирозинкиназы EGFR [121-122]. В соответствии с моделью фармакофора, которая ранее использовалась для класса пирроло[2,3-*d*]пиримидинов, данные SAR показывают, что предпочтение отдается объемным заместителям в 3-положении пиразольного кольца и *m*-

хлор-заместителю в 4-фениламинном фрагменте. Кроме того, наивысшая аффинность связывания, наблюдаемая для соединений, содержащих данные заместители, была объяснена наличием водородной связи между амидом фенилаланина-832 и гидроксильной или аминогруппой в положении 3.

1.2.6 Индолин-2-оны

Сотрудниками Sugen была разработана, синтезирована и охарактеризована серия 3-замещенных индолин-2-онов в качестве нового класса ингибиторов тирозинкиназ, включая VEGFR, FGFR, EGFR, Her-2 и PDGFR. Соединения могут быть легко получены конденсацией замещенных индолин-2-онов и альдегидов или кетонов в присутствии оснований [123-124]. В недавнем исследовании производных, содержащих индолин-2-он и различные арилдиенильные заместители в положении С-3, была оценена их относительная ингибирующая активность против ряда рецепторов тирозинкиназы в клеточных испытаниях [125]. Данные SAR показали, что с таким базовым скаффолдом можно получить селективные химические ингибиторы для конкретных тирозинкиназ.

Хорошим примером этого класса соединений является SU 5416 **67** (рисунок 11), которое в настоящее время оценивается в клинических исследованиях фазы II / III (внутривенное введение) для лечения злокачественных опухолей человека. Это соединение является мощным и селективным ингибитором KDR/flk-1, которое показало IC_{50} 1 μ M в клеточном исследовании тирозинкиназы (flk-1-сверхэкспрессирующие NIH 3T3 клетки). Данное производное показало приблизительно в 20 раз меньшую ингибирующую активность относительно PDGF-зависимого аутофосфорилирования и полное отсутствие активности с EGFR, InsR и FGFR. Кроме того, **67** ингибирует VEGF-зависимый митогенез HUVEC дозозависимым образом с IC_{50} 40 нМ. Также имеются обширные данные о влиянии SU5416 на подкожный рост ряда линий опухолевых клеток у бестимусных мышей [126]. SU6668, другой представитель этого класса

соединений, который проходит клинические испытания фазы I (пероральное введение) [127].

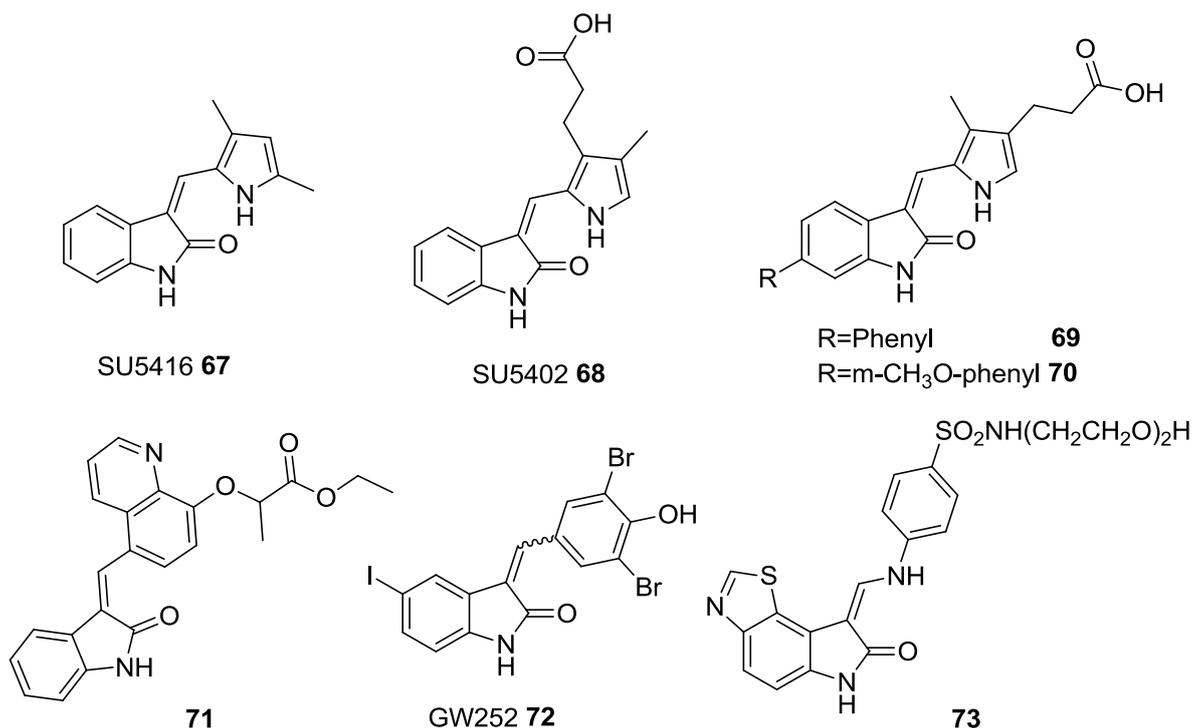


Рисунок 11 – Примеры индолин-2-онов

Соединения SU5402 **68** и SU4984, относящиеся к SU5416 **67**, были сокристаллизованы в каталитическом ядре домена тирозинкиназы FGFR [128]. По данным рентгеноструктурного анализа оксиндольный фрагмент занимает тот же участок, что и адениновый фрагмент АТФ, образуя с N-1 и O-2 бидентатное взаимодействие через водородные связи по донорно-акцепторному механизму с двумя остатками (глутаминовой кислотой-562 и аланином-564) [129]. Заместитель в положении C-3 SU5402 **68**, являющегося более специфическим ингибитором FGFR, чем SU4984, образует водородную связь между карбоксиэтильной группой и боковой цепью аспарагина-568. Кроме того, при связывании этого ингибитора индуцируется конформационное изменение в нуклеотид-связывающей петле. Эти две особенности могут быть причиной специфичности, наблюдаемой для SU5402. В структурных подходах к разработке лекарств для получения новых индолин-2-онов с ещё более лучшими свойствами была использована доступная структурная информация о FGFR вместе с моделями

каталитических доменов рецепторов VEGF и PDGF. Обоснование такого подхода состоит в попытке объединить цитостатические и анти-выживательные свойства ингибирования PDGFR с антиангиогенным эффектом ингибирования двух других рецепторов. Для этого были синтезированы производные 5- или 6-замещенных индолин-2-она, несущие разные группы в пиррольном кольце. Некоторые соединения (например, **69** и **70**) показали широкую ингибирующую активность против Flk-1/KDR, FGFR1 и PDGFR как в биохимических, так и в клеточных анализах [130].

p-Замещенные индолин-2-оны также были описаны как слабые *in vitro*-ингибиторы тирозинкиназы *v*-Abl (**71**, IC₅₀ = 15 μM) [131-132] и сильнодействующие ингибиторы *c*-raf-1 (**72**, IC₅₀ = 17 нМ) [133-134] и Cdk1 / Cdk2 (**73**, IC₅₀ 12 и 0,6 нМ для Cdk1 и Cdk2, соответственно) [135-136].

1.2.7 Пурины

Скринингу на предмет ингибирования различных протеинкиназ, в частности серин/треонинкиназ, были подвергнуты аналоги пурина. Оломуцин **74** (рисунок 12), который был впервые описан как ингибитор 7-глюкозилтрансферазы цитокинина [137], представляет собой умеренно активный АТФ-конкурентный ингибитор Cdk1, Cdc2/циклин В, Cdk2/циклин А, Cdk2/циклин Е, И Cdk5/p35 (IC₅₀ = 3-7 μM) [138-139]. Профиль ингибирующей активности оломуцина для вышеуказанных киназ был слегка улучшен по сравнению с росковитином (**75**, IC₅₀ = 0.2-0.7 μM), другим пуриновым производным. Были предприняты попытки увеличить активность и селективности пуриновой скаффолда для циклинзависимых киназ путем синтеза аналогов с различными заместителями в положениях 2, 6 и 9 и использования структурной информации, полученной с помощью рентгеновской кристаллографии.

пурвалоланола А **77**, близкого аналога пурвалоланола В **76** с улучшенной проницаемостью в клетках млекопитающих (60 линий опухолевых клеток человека NCI) и дрожжей.

Ингибиторы для Cdk1/циклин В ($IC_{50} = 28-90$ нМ) были получены путем объединения заместителей *транс*-4-аминоциклогексанола или *транс*- и *цис*-циклогексан-1,4-диамина в положении 2 у пурина с серией *m*- и *p*-замещенных анилиновых фрагментов в положении 6 (например, **78** и **79**). Некоторые из наиболее эффективных соединений обладали селективностью относительно PKC α , PKA и EGFR в 10-100 раз [141].

1.2.8 *Пиридинилимидазолы, пиримидинилимидазолы и связанные соединения*

Оригинальным представителем нового класса противовоспалительных агентов, которые ингибируют киназу p38 MAP, стало производное пиридинилимидазола – SKF86002 (соединение **80** на рисунке 13) [160]. Рентгеноструктурный анализ связанной с лигандом киназы [161-162] показал, что в случае этого класса соединений пиридин занимает положение в сайте связывания аденина АТФ. Кроме того, пиридиновый азот участвует в образовании водородной связи с пептидным фрагментом метионин-109. Данный фрагмент известен своей способностью к ингибированию изофермента P450 печени человека, что наблюдается в ряде пиридинилимидазолов [163-164]. Наиболее вероятной причиной наблюдаемого ингибирования является взаимодействие 4-пиридинильного фрагмента с гем-железом цитохрома P450, что вызывало увеличение массы печени и значительное увеличение ферментов P450. Данный факт подтверждается токсикологическими исследованиями крыс для соединений SKF-86002 **80** и SKF-203580 **81**. Этот нежелательный побочный эффект элегантно решается замещением пиридинового фрагмента на пиримидиновый (например, соединение **82**, имеющее $IC_{50} = 0.48$ μ М), который является плохо связывающимся с P450 соединением [165-168].

Активность *in vitro* пиримидинилимидазолов была улучшена заменой морфолинилпропильной группы на пиперидиновый фрагмент, SB-220025 (**83**, IC₅₀ = 19 нМ) [169].

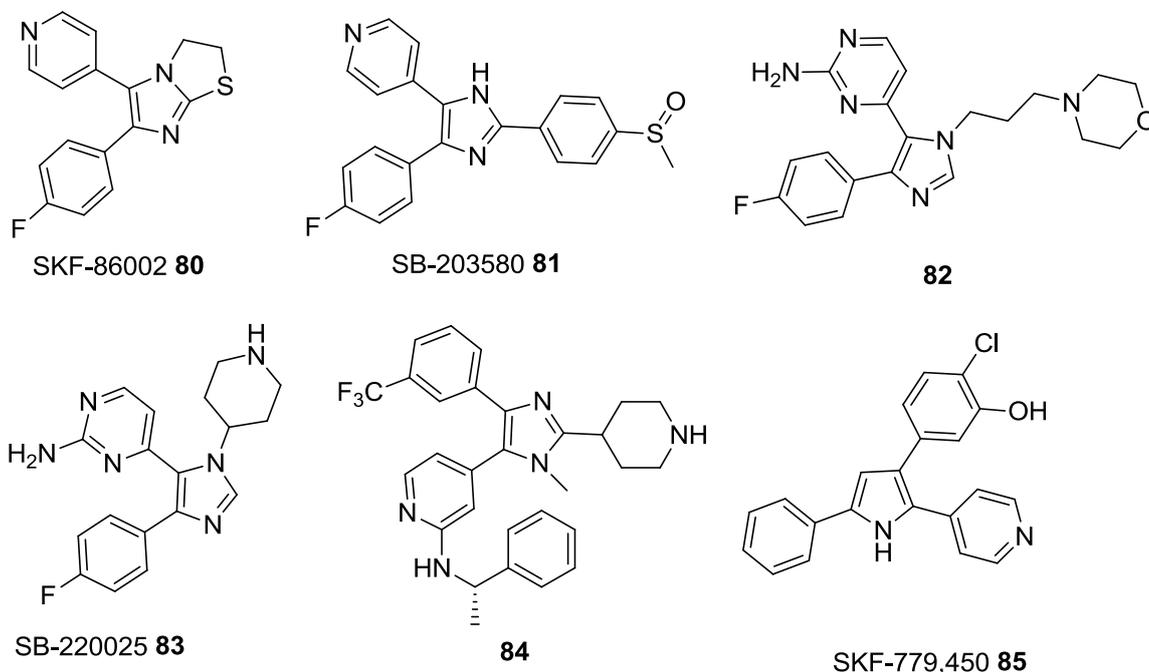


Рисунок 13 – Примеры пиридинилимидазолов, пиримидинилимидазолов и связанных соединений

Францем и соавторами [170] в ходе биохимического и энзимологического описания рекомбинантного р38, получаемого из клеток S2 дрозофилл, было обнаружено, что пиримидинилимидазолы могут связываться как с активными, так и неактивными формами фермента. Последний эффект, неконкурентный с АТФ, может блокировать биологическую активность фермента, за счет снижения его скорости активации, и, если этот механизм верен, АТФ не будет эффективно связываться с этим классом ингибиторов *in vivo*.

На тему замещения имидазольного фрагмента из пиридинилимидазольного ингибитора киназы р38 МАР написано большое количество патентов, статей и публикаций. Предлагаются варианты с оксазольным [171], пиррольным [172-176], пиразольным [177-179], пиримидиновым [180-182] и индольным [183] фрагментами. Эффективность

in vitro и *in vivo* предлагаемых вариантов соединений указывает на то, что наличие имидазального фрагмента не является необходимым фактором для ингибирования протеинкиназы p38 MAP.

Компания Merck представила свои результаты обширного SAR-анализа серии имидазолов, по результатам которого ими был выделен чрезвычайно активный ($IC_{50} = 0.19$ нМ) и селективный (относительно c-Raf, JNK2 α 1, JNK2 α 2, Lck, EGFR, MEK, PKA, и PKC) ингибитор киназы p38 MAP – соединение **84** [184]. Это вещество ингибирует индуцируемое липополисахаридами экспрессию TNF- α из крови со значением IC_{50} на уровне 2.8 нМ, обладает оральной биодоступностью (85% у крыс, 86% у резус-обезьян) и значительно ингибирует вторичный отек лапы в функциональной модели артрита.

Дальнейшая модификация имидазольного скаффолда компанией Merck привела к L-779,450 **85** – сильному ($IC_{50} = 2.0$ нМ) и селективному ингибитору Raf киназы [185]. Это вещество также ингибирует Ras-опосредованную активацию MAP-киназного каскада в раковых клетках с IC_{50} 0.7 μ М. Независимый же рост разных линий клеток был ингибирован при концентрациях 0.3-2 μ М.

1.3. Различные структурные классы

1.3.1 Баланол

Баланол (соединение **86** на рисунке 14) – натуральный продукт, выделенный из гриба *Verticillium balanoides* и обладающий высокой ингибирующей активностью относительно определенных серин- и треонинкиназ (например, большинство изоформ PKC) [186], но являющийся неэффективным относительно тирозинкиназ. Данное вещество подвергалось разнообразными формам химической модификации, включая удаление функциональной группы [187] и синтез ациклических [188], пергидроазепиновых [189-190], конформационно ограниченных [191] и индановых аналогов. С целью увеличения активности этого класса

соединений к клеточным испытаниям был осуществлен ряд пролекарственных подходов [193-194]. Не так давно была описана структура баланола в комплексе с каталитической субъединицей цАМФ-зависимой протеинкиназой [195].

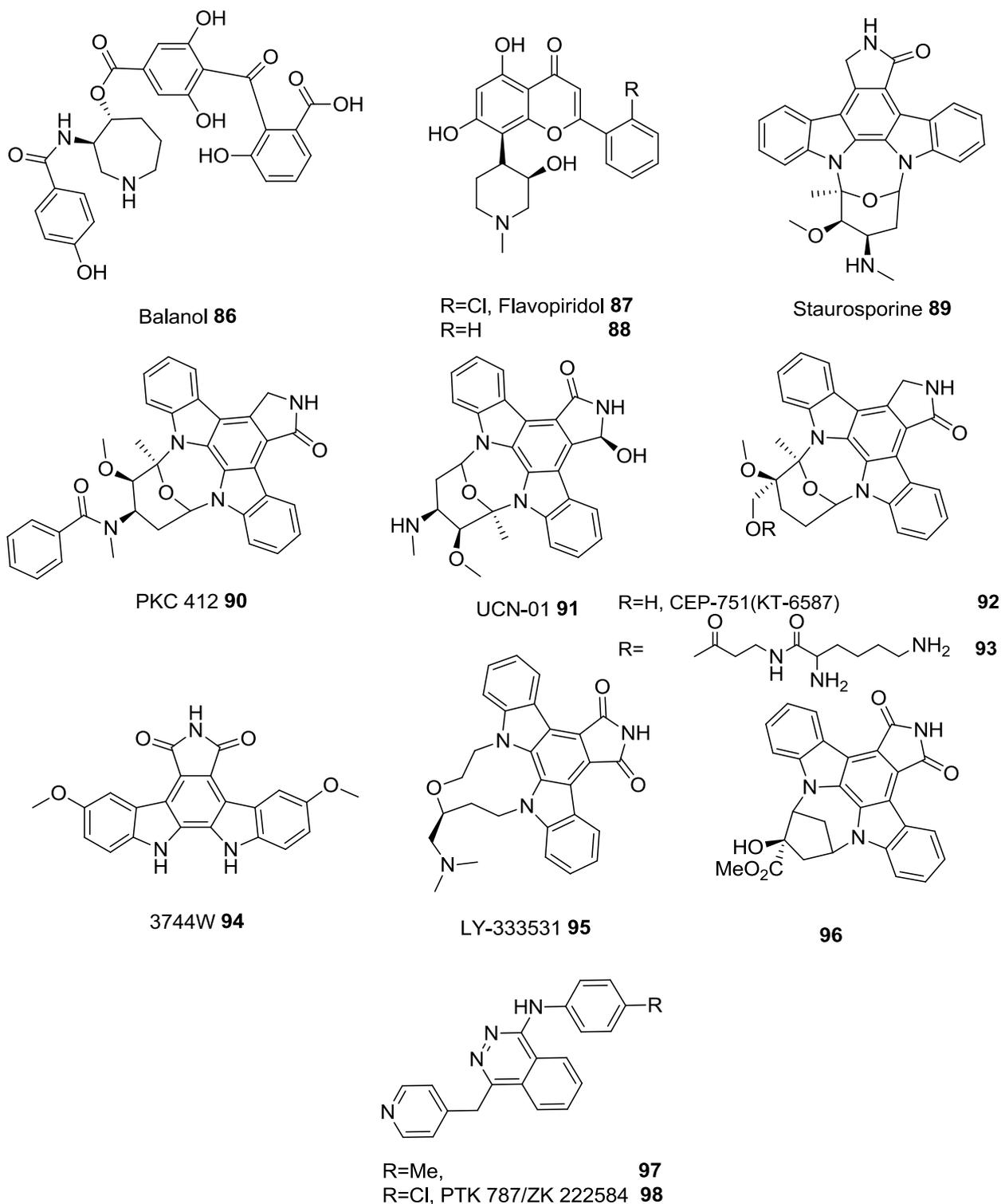


Рисунок 14 – Различные структурные классы ингибиторов протеинкиназ

1.3.2 Флавопиридол

Флавопиридол (**87**, HMR 1275, NSC 649890 или L 68-8275) [196] - флавоноид, структурно подобный алкалоиду, выделенному из *Dysoxylum binectariferum*. Данное соединение ингибирует большинство циклин-зависимых киназ (например, cdk1, cdk2, cdk4, cdk7), подавляет рост целого ряда клеточных линий рака [196-201] и обладает противораковой активностью относительно ксенотрансплантантов человеческого рака [198], что похоже на обычные цитостатические лекарства, хотя в некоторых случаях превосходит их, например, в случае рака предстательной железы. На основании поведения этого вещества в рамках системы скрининга противораковых лекарств Национального Института Рака, оно было выбрано для дальнейших исследований. В первой фазе клинических испытаний, флавопиридол, принимаемый через каждые 72 часа в течение 2 недель, показал противоопухолевый эффект у ряда пациентов с раком предстательной железы, толстого кишечника и неходжкинской лимфомой. В настоящее время лекарство проходит вторую фазу клинических испытаний. Не так давно была определена структура аналога флавопиридола **88** в комплексе с киназой cdk2 [202].

1.3.3 Стауроспорин, индолокарбозол и связанные аналоги

Стауроспорин **89** представляет собой микробный алкалоид, который является сильным, но не специфическим ингибитором протеинкиназ [203]. В последние годы были опубликованы работы по получению производных стауроспорина с повышенной специфичностью в качестве противораковых препаратов [204]. РКС 412 (CGP41251, соединение **90**) является мощным ингибитором РКС ($IC_{50} = 50$ нМ) с улучшенным профилем специфичности в сравнении с стауроспорином [205]. Соединение проявило противораковую активность как *in vitro*, так и *in vivo*, а также обладает способностью обращать множественную лекарственную устойчивость [206]. Соединение **90** в данный момент проходит вторую фазу клинических испытаний Novartis в

качестве лекарственного средства против неходжкинской лимфомы и хронического лимфоцитарного лейкоза. UCN-01 (соединение **91**) – ещё один аналог стауроспорина, который является сильным ингибитором PKC ($IC_{50} = 4.1$ нМ) [203,207], выделенным из штамма стрептомицет (N-126) [208-209]. Лекарство в настоящий момент проходит первую фазу в качестве панацеи для прогрессирующего рака у пациентов без отклика на предыдущее лечение.

С целью разработки лекарства против некоторых заболеваний, включая травмы головы и позвоночника, нейродегенеративные расстройства, раковые заболевания и сердечнососудистые заболевания, несколько лет назад компанией Cephalon Inc. был лицензирован ряд производных индолокарбозола. CEP-751 (соединение **92**) является сильным ингибитором ($IC_{50} = 5$ нМ) домена тирозинкиназы NGF-рецептора TrkA, а также связанных нейротрофиновых рецепторов TrkB и C [210]. Вещество вызывает впечатляющую регрессию опухоли предстательной железы в копенгагенских крысах [211]. Соответствующий водорастворимый пролекарственный сложный эфир CEP-2563 **93** [212] в данный момент проходит первую фазу клинических испытаний в качестве противоракового средства. Имеются сведения и о индолокарбозолах – и ингибиторах PDGFR. Например, соединение **94** ингибирует аутофосфорилирование PDGFR в интактном анализе клеток A10 с величиной IC_{50} на уровне 14.5 нМ [213]. В клетках человеческой гладкой мускулатуры вещество ингибировало ($c = 1$ μ М) аутофосфорилирование α и β изоформ PDGFR на 85% и 80%, соответственно.

LY-333531 **95** [214] является мощным и селективным ингибитором PKC β I ($IC_{50} = 4.7$ нМ, $K_i = 2$ нМ) и PKC β II ($IC_{50} = 5.9$ нМ). Соединение в данный момент проходит вторую фазу клинических испытаний Ely Lilly для лечения диабетических осложнений [215-216]. Было показано, что PKC β II более предпочтительно активируется в сетчатке, сердце и аорте диабетических крыс. Кроме того, активированный фермент PKC может играть важную роль в диабетической ретинопатии, которая совместно с другими заболеваниями ведет к слепоте.

Не так давно был описан метод синтеза мостиковых производных циклопентан-индолкарбазолов. Данный подход может открыть новый путь в синтезе мощных и селективных ингибиторов PKC (например, соединение **96** IC₅₀ = 5-53 нМ) [217].

1.3.4. Фталазин

Фталазиновые производные (например, **97** и **98**) являются запатентованными ингибиторами рецепторов VEGF и PDGF тирозинкиназ [218]. Соединения обладают субмикромольным ингибированием в изолированном ферменте и в клеточных анализах. Ряд веществ этого класса ингибирует *in vivo* рост раковых опухолей и образование микрососудов [219]. Соединение-лидер **98** уже успешно прошло доклинические испытания.

В заключение хочется отметить следующее. Ингибирование протеинкиназ АТФ сайт-направленными конкурентными и необратимыми ингибиторами является быстро развивающейся областью исследований, как в прикладном, так и в академическом планах. В рамках литературного обзора были рассмотрены не все возможные химические скаффолды ингибиторов киназ, а те, которые проходят клинические испытания или близки к ним. После всех проблем с исследованием и разработкой, клинические испытания покажут, стоила ли овчинка выделки. Очевидно, что результаты этих исследований окажут влияние на данную область медицинской химии, стимулируя дальнейшие исследования ингибиторов протеинкиназ и создание новых, а также улучшение старых базовых скаффолдов с целью получения новых структур-лидеров.

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дерегулирование активности киназы стало основным механизмом, с помощью которого раковые клетки избегают нормальных физиологических ограничений, связанных с ростом и выживаемостью. Несмотря на то, что на сегодняшний день большинство ингибиторов EGFR получило одобрение FDA и по-прежнему ведущими мировыми исследовательскими центрами прилагаются значительные усилия для разработки селективных низкомолекулярных ингибиторов киназ, вовлеченных в онкогенез, лекарственная устойчивость стала основным препятствием для дальнейшего успеха использования таргетных препаратов, направленных на EGFR-киназу. Например, развитие резистентности при лечении немелкоклеточного рака легкого, резко сокращает безрецидивную выживаемость и является ограничением для применения серии ингибиторов EGFR. Детальное исследование устойчивых мутантов EGFR киназы (L858R/T790M) выявило одну аминокислоту – так называемую «гейткиперскую» аминокислоту – которая индуцирует устойчивость к препаратам первого и второго поколения. Более того, сравнительно недавно выделенная форма EGFR (C797S) оказывается устойчивой ко всем известным ингибиторам, включая недавно предложенный AZD9291. Учитывая данные факты нам срочно необходимы новые химические подходы для обнаружения и синтеза перспективных соединений, которые способны ингибировать мутантные формы протеинкиназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста.

Цель данного исследования – разработать химические стратегии синтеза для избирательных ингибиторов EGFR, несущих мутации в АТФ сайте. Поскольку киназы обычно существуют в неактивном состоянии и требуют структурных перестроек для активации их ферментативной активности, мы предположили, что соединения, которые предотвращают эту активацию, могут обеспечить стратегию селективного ингибирования киназ, в том числе устойчивых к традиционным АТФ-конкурентным ингибиторам

из-за имеющихся мутаций. В дальнейшем мы рассмотрим результаты молекулярного моделирования, методы и подходы к синтезу найденных соединений, а также результаты биологических испытаний.

2.1. Молекулярный докинг

В основу будущей комбинаторной библиотеки структур планируемых для изучения особенностей связывания с EGFR – киназой лег фрагмент 4-аминопиримидина, давно зарекомендовавший себя в качестве киназы-ингибирующего скаффолда. Дальнейшее наращивание структуры производилось на основании принципа обеспечения высоких drug-like характеристик исследуемых соединений, в первую очередь оптимальные параметры для правил Липински.

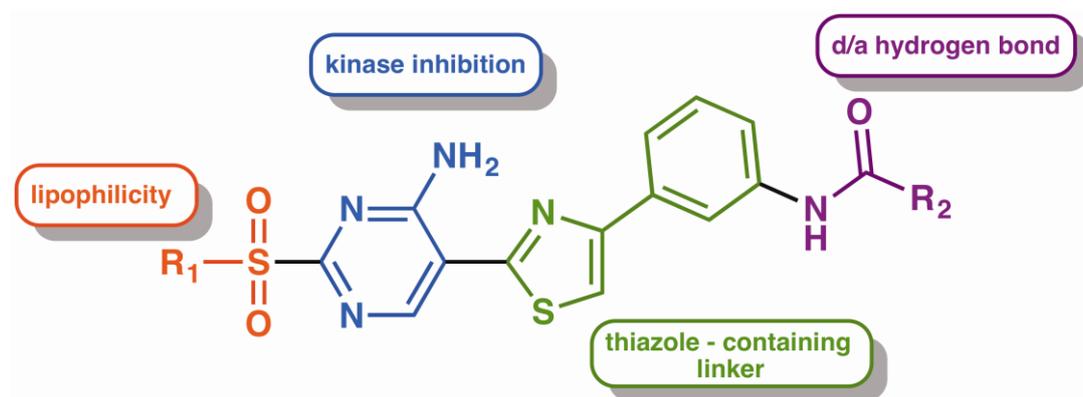
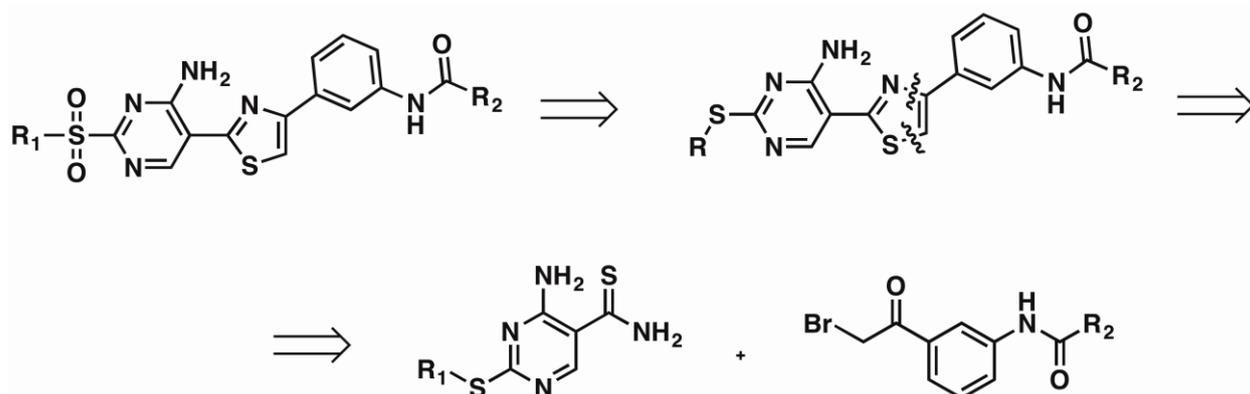


Рисунок 1 – Конструирование лиганда

2.2. Синтез ингибиторов

Для планирования синтеза сконструированных лигандов мы применили метод ретросинтетического анализа. Ключевые синтоны полученные в ходе анализа представлены на схеме 1:

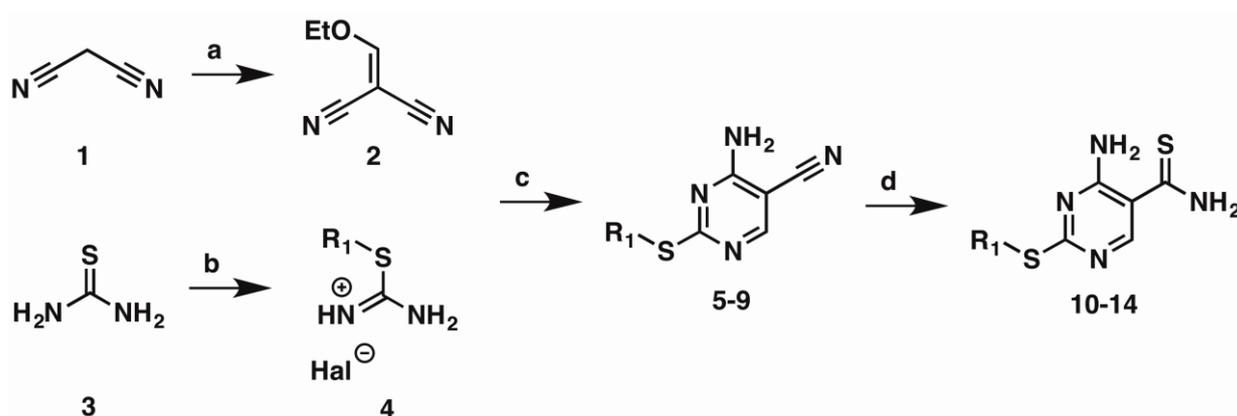
Схема 1



В ретросинтетической схеме можно выделить, две ключевые стадии. Стадию окисления сульфида до сульфона, а также сборку тиазольного цикла по методу Ганча.

Исходные 2-тиоалкил-4-амино-5-пиримидитиоамиды получены по схеме 2.

Схема 2

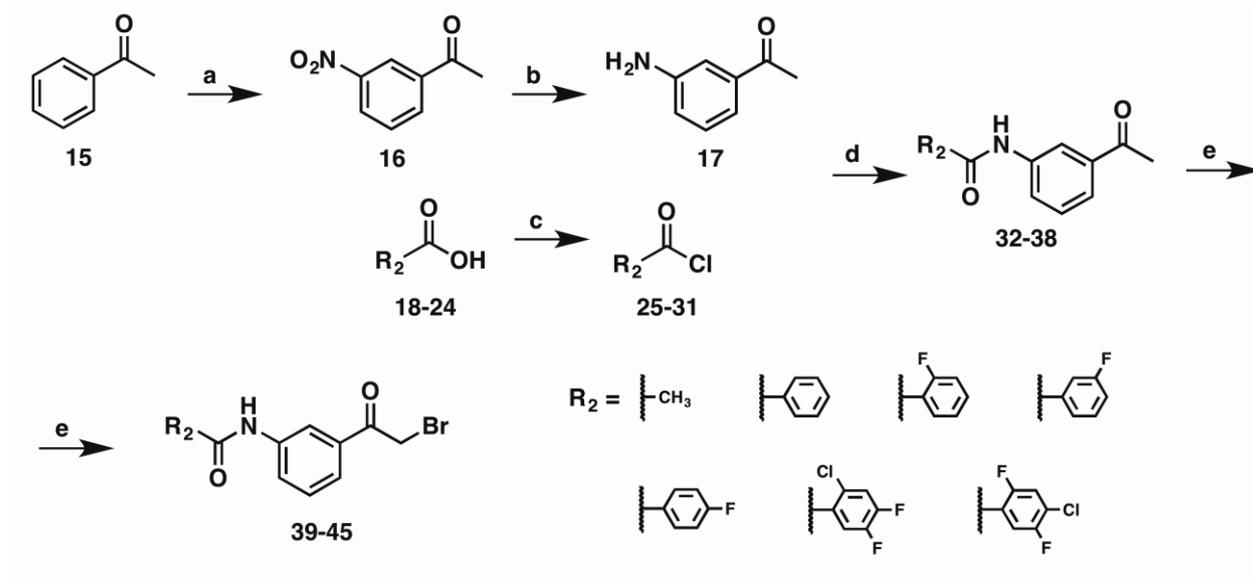


$R_1 = \text{Me, Et, n-Pr, i-Pr, Bn}$

a: (Et₃O)CH, Ac₂O, reflux 5h; b: R₁Hal, EtOH, reflux 7h; c: Et₃N, EtOH, reflux 8h; d: H₂S, Et₃N, Py, 24 h r.t.

Фенацилбромиды **39-45** были получены последовательным ацилированием м-аминоацетофенона и бромированием под действиями мягкого бромирующего агента – бромида меди (II) в системе хлороформ-этилацетат (схема 3).

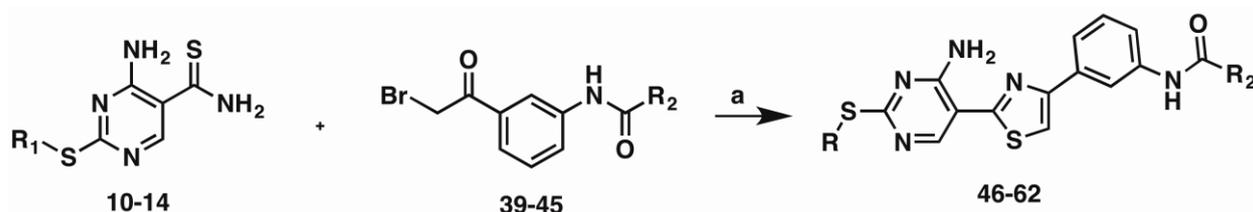
Схема 3



a: $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ -20 °C; b: Fe, HCl/EtOH, then NaOH; c: SOCl_2 , CHCl_3 reflux 3h; d: Et_3N , DCM, 5-10 °C; e: CuBr_2 , EtOAc/ CHCl_3 , reflux 24-58 h.

Финальная сборка тиазолов **46-62** проводилась по методу Ганча путем продолжительного кипячения (48 часов) смеси фенацилбромида и тиоамида, с последующей обработкой раствором гидрокарбоната натрия (схема 4).

Схема 4



a: EtOH, reflux 48h then NaHCO_3

Строение всех синтезированных лигандов подтверждено методом ЯМР ^1H и ^{13}C , а также двумерных экспериментов COSY, HMQC и HMBC. На рисунках 0000 приведены примеры наблюдаемых спектров ЯМР.

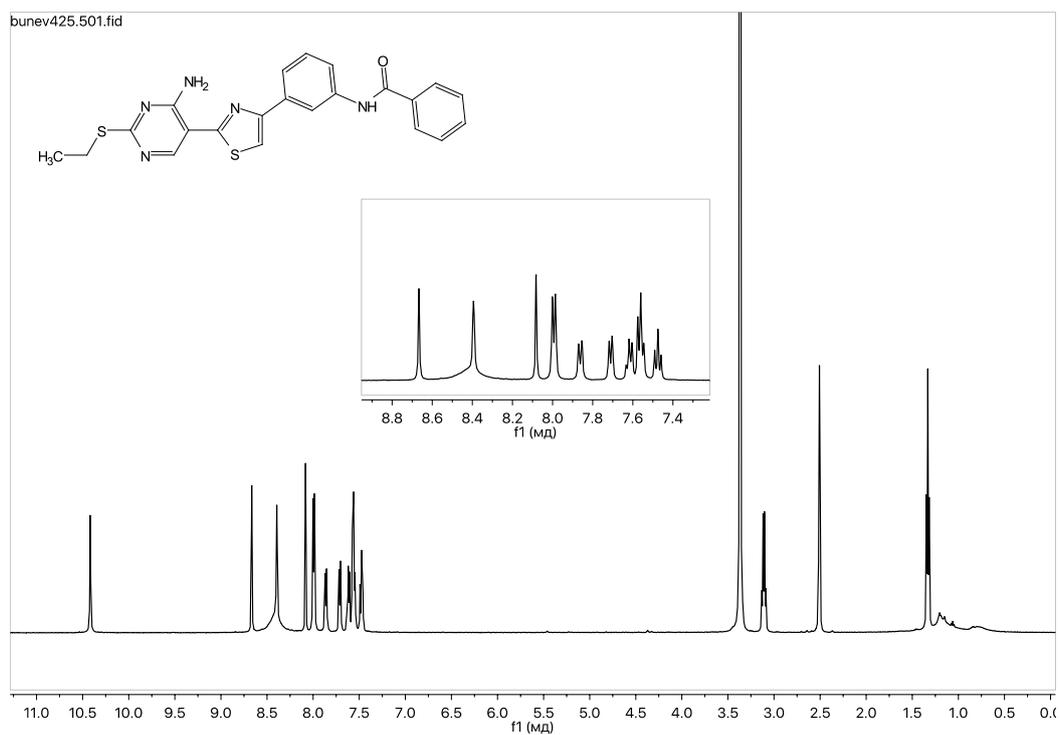


Рисунок 2 – ЯМР ^1H *N*-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамида

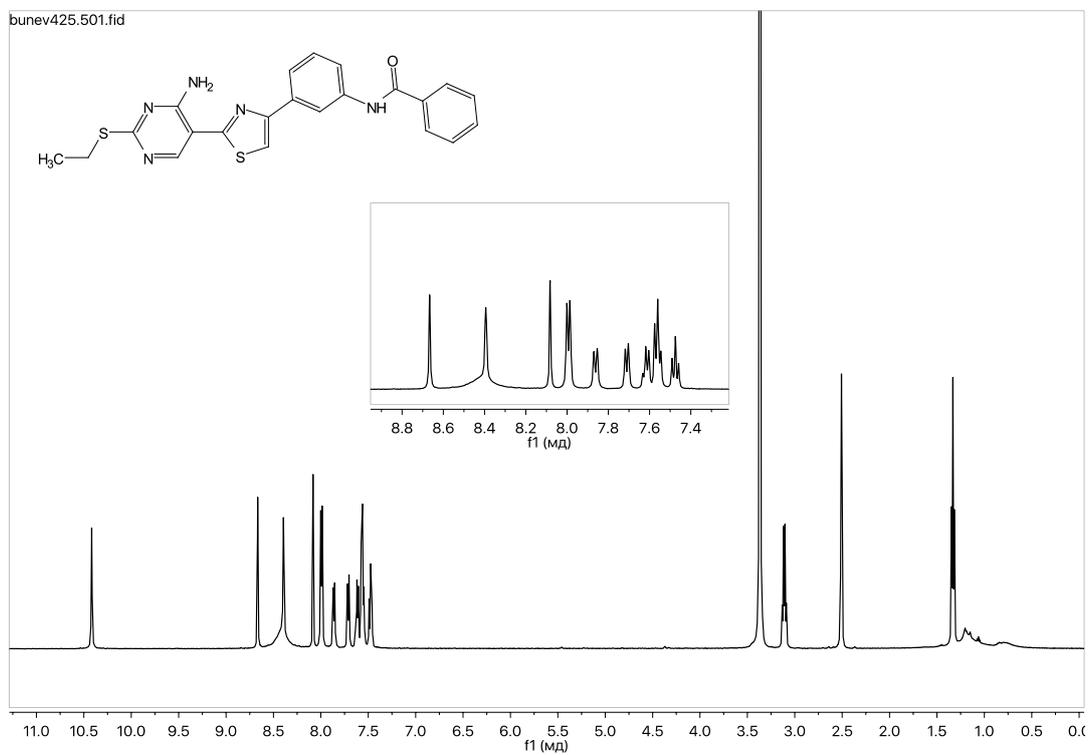


Рисунок 3 – ЯМР ^{13}C *N*-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамида

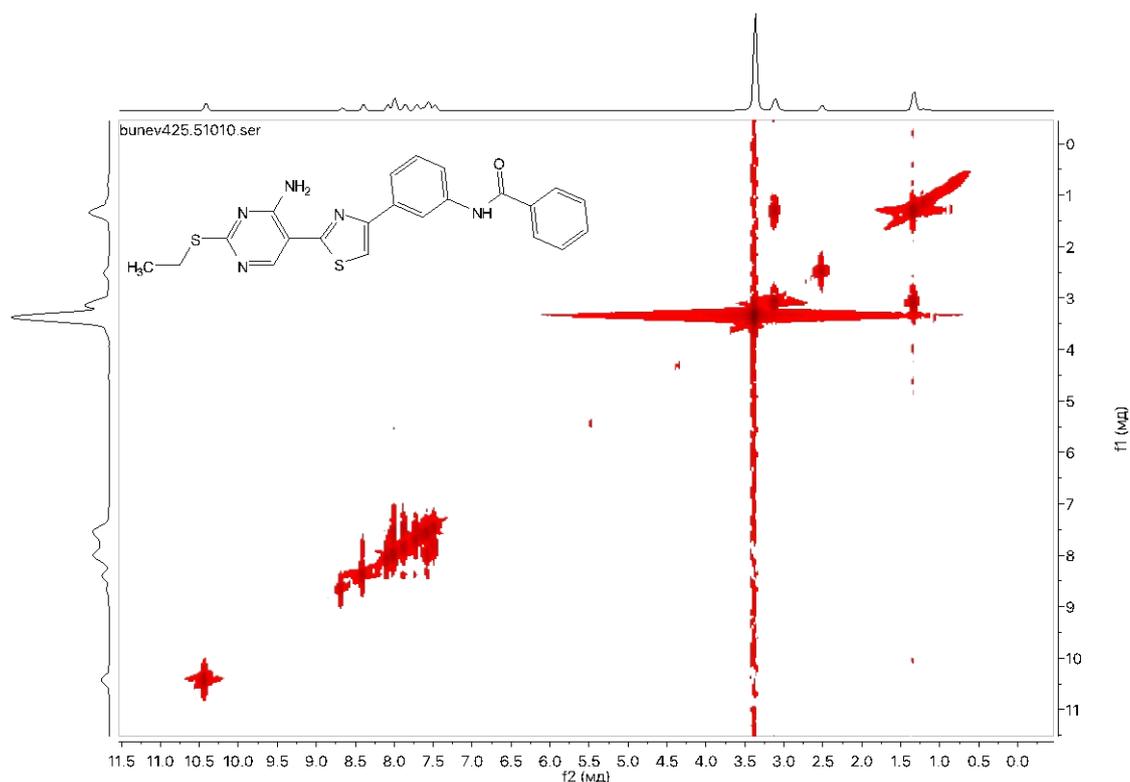


Рисунок 4 – ЯМР COSY (^1H - ^1H) спектр *N*-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамида

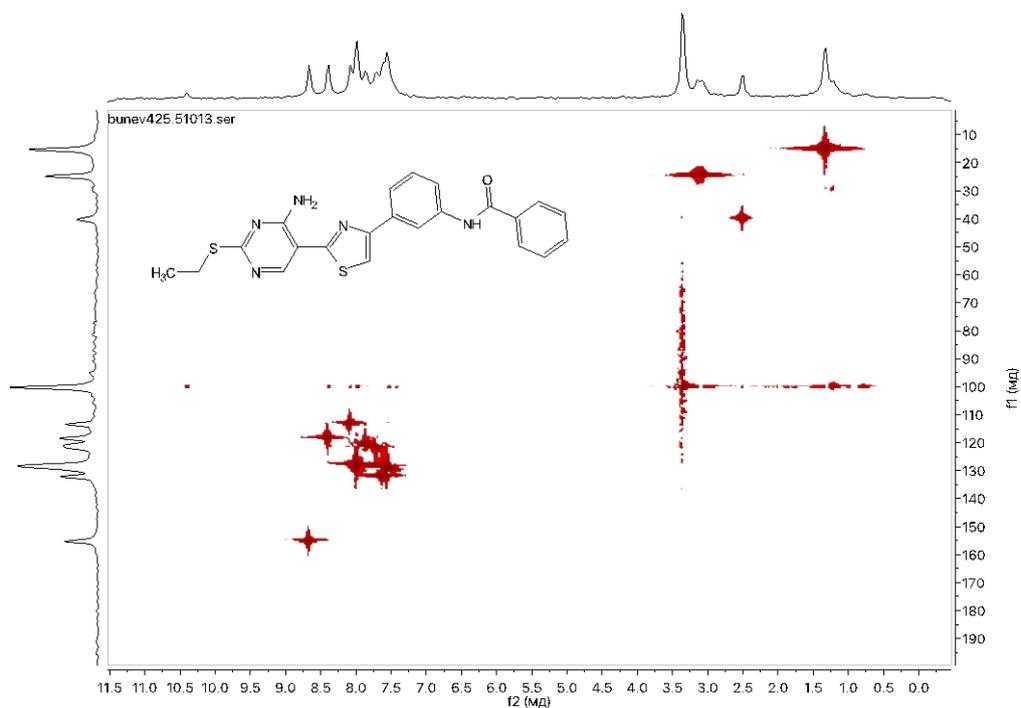


Рисунок 5 – ЯМР HMQC (^1H - ^{13}C) спектр *N*-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамида

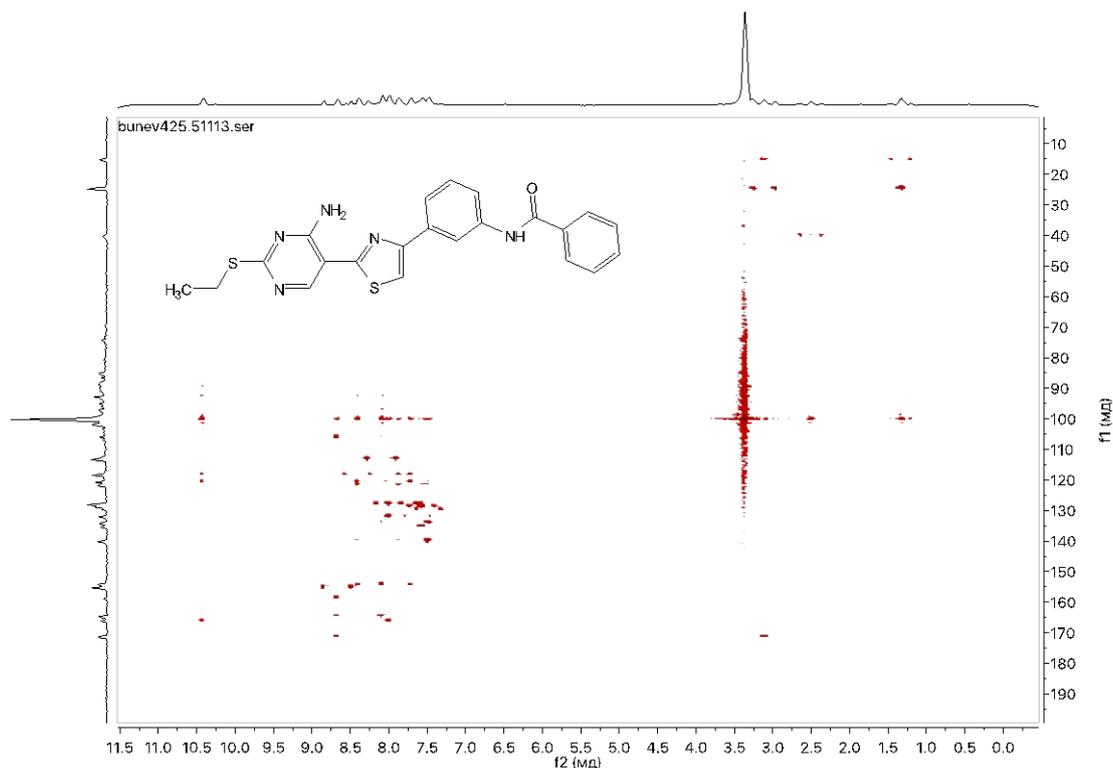


Рисунок 5 – ЯМР НМВС (^1H - ^{13}C) спектр *N*-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)тиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамида

2.3. Биологические испытания

2.3.1. Изучение цитотоксического действия соединения ASB1 на клетках линии MCF-7, A549 методом МТТ-теста

Клетки линии A549 и MCF7 вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты (Nunc) по 6×10^3 клеток на лунку в полной среде RPMI-1640. Через 24 часа в лунки с клетками добавляли исследуемые препараты, приготовленные из рабочих стоков *in situ* в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-9} моль/л и инкубировали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO_2 . После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и оставляли на 4 часа в CO_2 -инкубаторе, затем среду отбирали и вносили в лунки по 200 мкл ДМСО (Sigma, США) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора

определяли на спектрофотометре «Multiscan EX» (Thermo Scientific, США) при 540 нм, используя ДМСО как нулевой контроль.

2.3.2. Исследование EGF-зависимой экспрессии EGFR/pEGFR, pAKT, под действием ингибиторов EGFR

Исследования экспрессии и активационного состояния сигнальных молекул проводилось на культуре клеток линии SK-BR-3 методом иммунофлуоресцентного окрашивания с первичными антителами к EGFR, pEGFR (pY1197), pAKT и вторичными антиаидовыми конъюгированными антителами.

Клетки линии SK-BR-3 наносили на адгезионные предметные стекла для культивирования клеток (BD Falcon, США) в количестве 4×10^3 /ячейку в 500 мкл среды RPMI-1640 с 10% ЭТС (Gibco) и культивировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем добавляли в ячейки ингибиторы EGFR в нецитотоксических концентрациях (10^{-7} М) в среде RPMI-1640 с 1% ЭТС и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч. После этого клетки дважды отмывали в RPMI-1640, и инкубировали в среде RPMI-1640 с EGF 40 нг/мл (BD) в течение 90 мин, дважды отмывали в холодном PBS и проводили иммунофлуоресцентный анализ. Результаты представлены на рисунках 6-8.

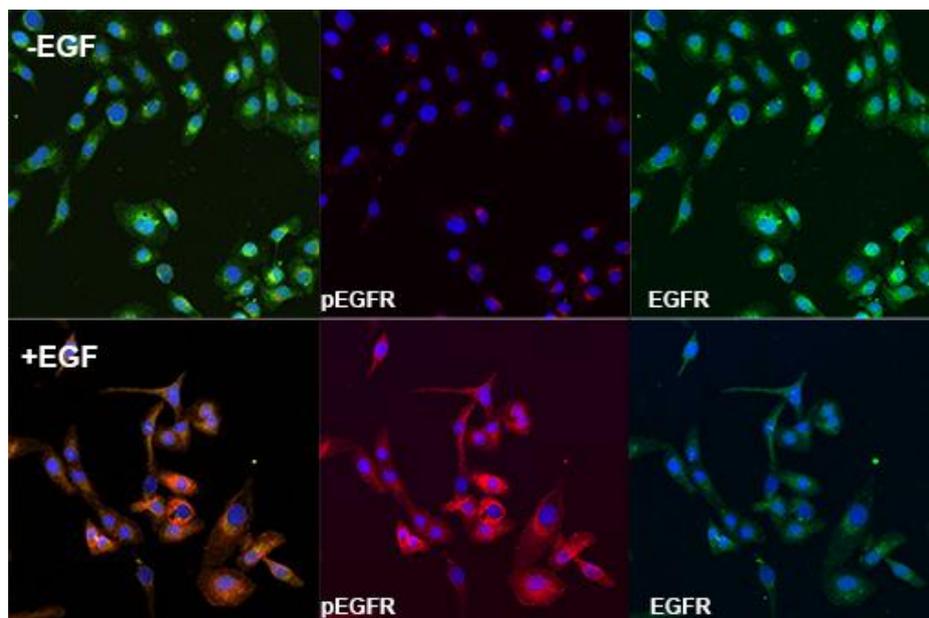


Рисунок 6 – Экспрессия EGFR/pEGFR под действием EGF. (Левый блок – суммарное изображение EGFR/pEGFR).

Внесение в культуру клеток рекомбинантного человеческого EGF 40 нг/мл, вызывает активацию рецептора, что выражается в увеличении экспрессии pEGFR и снижении экспрессии нефосфорилированной формы EGFR. Без индукции EGF преобладающей является экспрессия EGFR.

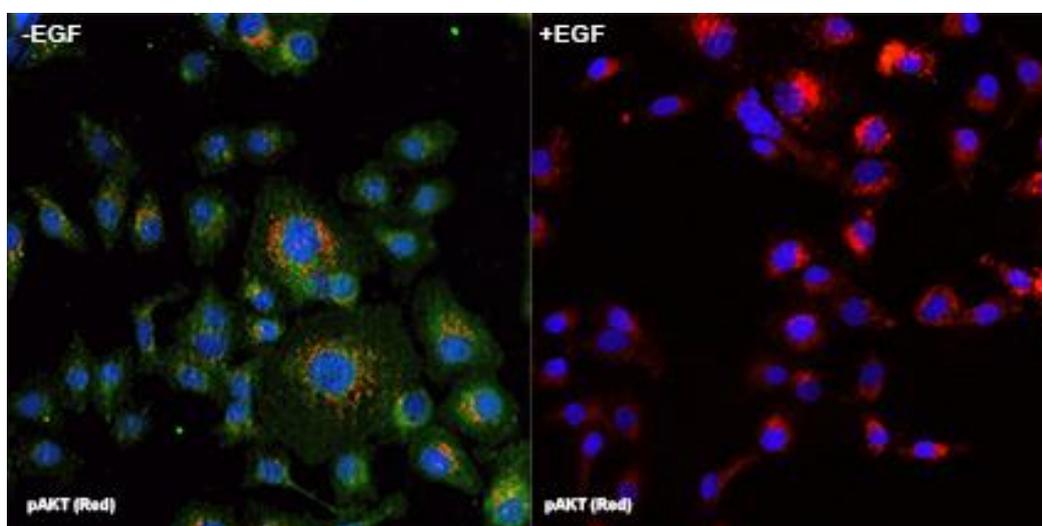


Рисунок 7 – Экспрессия pAKT под действием EGF (Красное окрашивание Alexa 568)

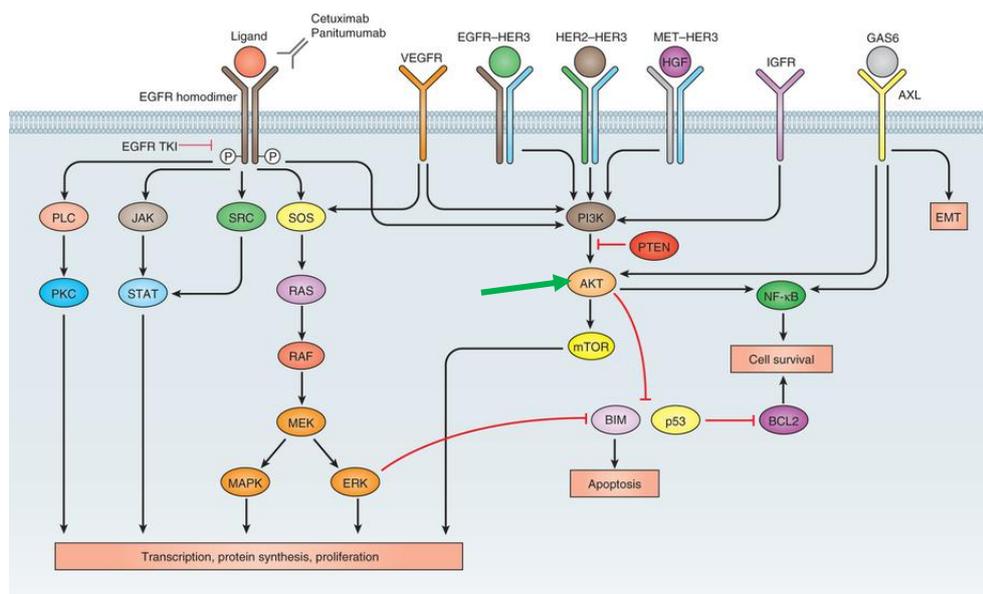


Рисунок 8 – Активация EGFR

pAKT – является одной из ключевых молекул PI3K-AKT-mTOR сигнального пути и поэтому ее можно выбрать в качестве «индикатора» ингибирования EGFR и снижение ее экспрессии по сравнению с EGF-индуцированным контролем является признаком ингибирования данного сигнального пути EGFR.

Внесение ингибитора ASB-1 приводит к изменению экспрессии сигнальных молекул.

Согласно полученным данным внесение ингибитора ASB-1 и последующая активация клеток SK-BR-3 при помощи EGF 40 нг/мл не вызывает активации рецептора и образования pAKT – т.е. происходит ингибирование pAKT-зависимого сигнального пути.

2.3.3. Изучение влияние ингибиторов EGFR на EGF-зависимое деление клеток

Для изучения действия ингибиторов на EGF-зависимую пролиферацию клетки линии SK-BR-3 культивировали в среде RPMI-1640 с 1% ЭТС, EGF 40 нг/мл (BD) а также с добавлением ингибиторов EGFR в нецитотоксических концентрациях (10^{-7} M) в течение 18 часов. Для определения клеточного

цикла использовали Muse Cell Cycle Kit (Merck/Millipore) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Результаты представлены на Рис.9.

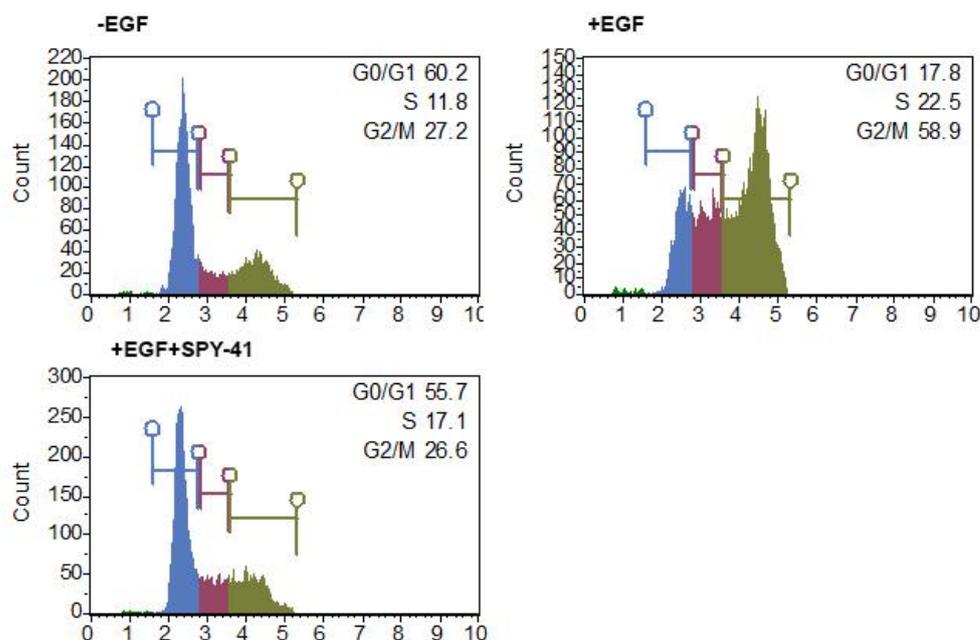


Рисунок 9 – Клеточный цикл SK-BR-3 под действием EGF и ингибиторов ASB-1

Добавление к культуре клеток SK-BR-3 среды RPMI-1640 с 1% ЭТС и EGF 40 нг/мл вызывает пролиферацию, что выражается в увеличении доли клеток в S-фазе и двукратное увеличение доли клеток в G2/M фазе. Одновременное добавление в среду EGF 40 нг/мл и ASB-1 10^{-7} М не вызывает индукцию пролиферации и полученные результаты сравнимы с группой клеток, находившихся в среде RPMI-1640 с 1% ЭТС.

Таким образом, соединение ASB-1 обладает ингибирующим действием в отношении EGFR-зависимого сигнального пути.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Реагенты и оборудование

Ход реакций и чистоту целевых продуктов оценивали посредством тонкослойной хроматографии с применением пластинок с закрепленным слоем марки «Силуфол». В качестве элюентов применялись смеси растворителей следующих составов: этанол : толуол 1 : 4 и 1 : 9; изопропанол : четыреххлористый углерод 3 : 97, этилацетат : гептан 2 : 3 и 1 : 1. Обнаружение веществ (проявление пятен) проводили в парах йода, в концентрированном растворе перманганата калия и при УФ-облучении.

Температуры плавления определены в блоке.

ИК спектры записаны на приборе ФСМ-1201 в таблетках KBr и в растворе четыреххлористого углерода.

Хроматографический анализ проводили на хроматографе «Agilent 1220 м» с спектрофотометрическим детектором на колонке ZORBAX C-18; элюент представляет собой смесь ацетонитрила и воды в соотношении 8 : 2; скорость потока 1 мл/мин. Обработка данных проводилась с применением программы OpenLab.

Результаты ЯМР спектроскопии получены при комнатной температуре в дейтерированном диметилсульфоксиде на спектрометре Bruker Avance с рабочей частотой 600 МГц для ядер ^1H и 151 МГц для ядер ^{13}C . В качестве стандарта использовался тетраметилсилан, сигналы химических сдвигов приведены в миллионных долях.

3.2. Очистка и сушка растворителей

Ацетон

Для удаления воды 1 л ацетона кипятили в колбе с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой над пентоксидом фосфора (10 г) течение 2 часов, затем перегоняли при атмосферном давлении. $T_{\text{кип.}} = 55 - 56\text{ }^\circ\text{C}$, $d^{25} = 0.7899$, $n_D^{20} = 1.3591$.

Гексан

Высушивали кипячением с обратным холодильником в течение 5 ч над 5 г металлического натрия, после чего перегоняли при атмосферном давлении. $T_{\text{кип.}} = 67 - 68 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 0.6548$, $n_D^{20} = 1.3751$.

Дихлорметан

Для удаления воды к 1 л дихлорметана добавляли 20 г пентоксида фосфора, кипятили 3 ч, после чего перегоняли при атмосферном давлении. $T_{\text{кип.}} = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 1.3266$, $n_D^{20} = 1.4242$.

Диэтиловый эфир

Выдерживали 2 дня над безводным хлоридом кальция, после чего его отфильтровывали, добавляли к эфиру металлический натрий и небольшое количество бензофенона и кипятили несколько часов с обратным холодильником до образования синего окрашивания. Затем растворитель отгоняли. $T_{\text{кип.}} = 34 - 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 0.714$, $n_D^{20} = 1.3527$.

Метанол

Высушивали, смешивая 5 г магниевых стружек с 50 мл метанола и добавляя эту смесь к 0.95 л метанола. Затем кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч и отгоняли при нормальном давлении. $T_{\text{кип.}} = 63 - 64 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 0.7918$, $n_D^{20} = 1.3286$.

Этанол

Для удаления воды к 1 л этилового спирта добавляли 7 г металлического натрия и 25 г диэтилового эфира щавелевой кислоты, кипятили в колбе с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой кипячения в течение 2 ч. Затем перегоняли при атмосферном давлении. $T_{\text{кип.}} = 78.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 0.7893$, $n_D^{20} = 1.3611$.

Этилацетат

Для удаления воды к 1 л этилацетата добавляли 120 г прокаленного хлорида кальция и выдерживали не менее 12 ч, после чего перегоняли при атмосферном давлении. $T_{\text{кип.}} = 77 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $d^{25} = 0.902$, $n_D^{20} = 1.3720$.

Другие растворители, реагенты и вспомогательные вещества производства фирм Acros Organics, Merck и Sigma–Aldrich использовали без дополнительной очистки.

3.3. Получение исходных соединений

3-Нитроацетофенон [221]

При температуре $-5 - -10$ °С к 75 мл концентрированной H_2SO_4 при перемешивании добавляли 29.2 мл ацетофенона (0.25 моль, 30 г). Затем также при перемешивании прикапывали нитрующую смесь, состоящую из 24 мл концентрированной HNO_3 (0.325 моль, $d^{25} = 1.376$) и 30 мл концентрированной H_2SO_4 , поддерживая указанную температуру. После выливали реакционную смесь на 300 г льда с 400 мл воды, отфильтровывали выпавший осадок и многократно промывали ледяной водой. Для отчистки 3-нитроацетофенон растворяли при нагревании в 100 мл этанола и выливали в 1 л ледяной воды. Выпавший осадок отфильтровывали. Получали порошок желтого цвета с выходом 65% (26.6 г). Т. пл. = $70 - 72$ °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 96.7 %. ИК-спектр (KBr), ν , cm^{-1} : 3442, 2924, 2853, 1693, 1530, 1351, 1252, 1110, 741.

3-Аминоацетофенон

К раствору 3-нитроацетофенона (20 ммоль, 3.30 г) в 70 мл этанола добавляли железные стружки (75 ммоль, 4.2 г). Далее смесь нагревали на водяной бане до 60 °С и при перемешивании по каплям добавляли концентрированную HCl (0.49 моль, 15 мл, 17.85 г), после чего выдерживали в течение 1 ч при этой же температуре. Затем реакционную смесь выливали на лед с водой и нейтрализовали 2М раствором NaOH до pH 8. Продукт дважды экстрагировали 100 мл этилацетата, органический слой сушили Na_2SO_4 и удаляли растворитель. Остаток перекристаллизовывали из водного этанола. Получали кристаллы светло-коричневого цвета. Выход 91 % (2.46 г).

Т. пл. = 94 – 95 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 95.8 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3469, 3370, 2922, 2360, 1669, 1628, 1599, 1458, 1356, 1321, 1238, 777.

N-(3-ацетилфенил)ацетамид

N-(3-(2-бромацетил)фенил)ацетамид

Хлорангидриды карбоновых кислот. Общая методика синтеза

В колбе с обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой к раствору соответствующей кислоты (25 ммоль) в 40 мл дихлорэтана добавляли 30 мкл ДМФА, 2.9 мл тионилхлорида (40 ммоль, 4.76 г) и кипятили в течение 3 ч. Затем удаляли растворитель и непрореагировавший тионилхлорид. Хлорангидриды сразу вводили в следующую стадию без дополнительной очистки. По данной методике были получены хлорангидриды *о*-фторбензойной кислоты, *м*-фторбензойной кислоты, *п*-фторбензойной.

Бензамиды. Общая методика синтеза

Соответствующий хлорангидрид замещенной бензойной кислоты (11 ммоль) растворяли в 40 мл хлористого метилена. Раствор охлаждали на бане со льдом и при перемешивании добавляли триэтиламин (13 ммоль, 1.32 г, 1.81 мл), а затем 3-аминоацетофенон (10 ммоль, 1.35 г). оставляли на ночь при комнатной температуре. На следующий день реакционную смесь обрабатывали последовательно 30 мл воды, раствором 0.5 мл концентрированной HCl в 30 мл воды, 30 мл насыщенного раствора NaHCO₃, 30 мл насыщенного раствора NaCl. Органический слой сушили Na₂SO₄ и удаляли растворитель. Продукт очищали перекристаллизацией из этанола.

N-(3-ацетилфенил)бензамид

Выход 98 % (2.34 г). Т. пл. = 105 – 107 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.9 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3338, 2918, 2850, 1673, 1542, 1484, 1307, 687.

N-(3-ацетилфенил)-2-фторбензамид

Выход 90 % (2.32 г). Т. пл. = 98 – 100 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 95.0 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3352, 2819, 1674, 1610, 1552, 1486, 1321, 1311, 1276, 786, 757, 689.

N-(3-ацетилфенил)-3-фторбензамид

Выход 86 % (2.21 г). Т. пл. = 123 – 125 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 96.7 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3282, 2924, 2854, 1675, 1646, 1587, 1541, 1438, 793, 685.

N-(3-ацетилфенил)-4-фторбензамид

Выход 58 % (1.95 г). Т. пл. = 103 – 105 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 97.5 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3351, 1669, 1608, 1546, 1508, 1486, 1315, 1235.

2-Бромацетильные производные бензамидов. Общая методика синтеза

Соответствующий бензамид (6.4 ммоль) растворяли в 20 мл смеси EtOAc и CHCl₃ (1:1), добавляли CuBr₂ (12.8 ммоль, 1.5504 г) и кипятили в течение 48 ч. Затем отфильтровывали осадок, упаривали растворитель, а остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле, используя в качестве растворителя хлористый метилен.

N-(3-(2-бромацетил)фенил)бензамид

Получали бромированием *N*-(3-ацетилфенил)бензамида. Выход 43 % (0.87 г). Т. пл. = 114 – 116 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 89.8 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3292, 2921, 2851, 1709, 1652, 1525, 995, 793.

N-(3-(2-бромацетил)фенил)-2-фторбензамид

Получали бромированием *N*-(3-ацетилфенил)-2-фторбензамида. Выход 53% (1.07 г). Т. пл. = 114 – 116 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 88.8 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3854, 3676, 2923, 1702, 1655, 1592, 1543, 1426, 792, 750.

N-(3-(2-бромацетил)фенил)-3-фторбензамид

Получали бромированием *N*-(3-ацетилфенил)-3-фторбензамида. Выход 41 % (0.79 г). Т. пл. = 125 – 127 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 93.6 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3290, 2922, 1692, 1646, 1587, 1538, 1442, 1155, 788, 684.

N-(3-(2-бромацетил)фенил)-4-фторбензамид

Получали бромированием *N*-(3-ацетилфенил)-4-фторбензамида. Выход 34 % (0.45 г). Т. пл. = 119 – 121 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 93.5 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3306, 2923, 1691, 1645, 1167, 846, 787, 681.

Алкилйодиды. Общая методика синтеза [222]

При охлаждении в бане с холодной водой к соответствующему спирту (0.33 моль) добавляли красный фосфор (0.11 моль, 3.41 г), а затем небольшими порциями при перемешивании – молекулярный йод (0.165 моль, 41.9 г). После реакцию смесь кипятили на водяной бане в течение 1 – 2 ч. Затем отгоняли продукт, собирая его в охлаждаемый приемник. Дистиллят последовательно промывали насыщенным раствором NaHCO₃ и 10 %-ым раствором Na₂S₂O₃, органический слой сушили прокаленным CaCl₂.

Метилйодид. Выход 56 %. Т. кип. = 42 °С, $n_D^{20} = 1.5304$.

Этилйодид. Выход 38 %. Т. кип. = 72 °С, $n_D^{20} = 1.5140$.

Пропилйодид. Выход 83 %. Т. кип. = 102 °С, $n_D^{20} = 1.5050$.

Изопропилйодид. Выход 72 %. Т. кип. = 89 °С, $n_D^{20} = 1.4996$.

Тиоурониевые соли. Общая методика синтеза

К раствору тиомочевины (0.123 моль, 9.36 г) в 80 мл этанола добавляли соответствующий алкилгалогенид (0.123 моль) и кипятили с обратным холодильником в течение 7 ч. Затем испаряли растворитель.

Гидрохлорид 2-бензилизотиурония. Выход 97 %. Т. пл. = 147 – 150 °С.

Гидройодид 2-этилизотиурония. Выход 96 %. Т. пл. = 67 – 70 °С.

Гидройодид 2-пропилизотиурония. Выход 95 %.

Гидройодид 2-изопропилизотиурония. Выход 98 %.

Производные пиримидин-5-карбонитрила. Общая методика синтеза

К раствору 2-(этоксиметилен)малононитрила (50 ммоль, 6.11 г) в 70 мл этилового спирта добавляли соответствующую тиоурониевую соль (50

ммоль), 14 мл триэтиламина (100 ммоль, 10.11 г) и кипятили в течение 8 ч. Затем реакционную смесь разбавляли водой и отфильтровывали выпавший осадок.

4-Амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карбонитрил

Выход 79 %, т. пл. 212-214 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 94.3 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3361, 3200, 2222, 774. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.44 (с, 1H), 7.90 (д, $J = 156.1$ Гц, 2H), 2.45 (д, $J = 1.3$ Гц, 3H). ¹³C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 175.10, 161.85, 161.03, 116.15, 109.99, 85.75, 13.91.

4-Амино-2-(этилтио)пиримидин-5-карбонитрил

Выход 75 %, т. пл. 145-147 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 97.2 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3400, 3322, 2223, 774. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.44 (с, 1H), 7.89 (д, $J = 158.9$ Гц, 2H), 3.04 (квинт., $J = 7.3$ Гц, 2H), 1.27 (т, $J = 7.3$ Гц, 3H). ¹³C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 174.73, 161.91, 161.09, 116.12, 85.80, 24.88, 15.03.

4-Амино-2-(пропилтио)пиримидин-5-карбонитрил

Выход 86 %, т. пл. 142-144 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.1 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3368, 3315, 2226, 778. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.43 (с, 1H), 7.87 (д, $J = 145.1$ Гц, 2H), 3.02 (т, $J = 7.2$ Гц, 2H), 1.63 (гепт., $J = 7.3$ Гц, 2H), 0.95 (т, $J = 7.4$ Гц, 3H). ¹³C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 174.81, 161.87, 161.04, 116.12, 85.78, 32.36, 22.74, 13.65.

4-Амино-2-(бензилтио)пиримидин-5-карбонитрил

Выход 71 %, т. пл. 167-169 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.8 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3400, 3326, 2225, 773. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.46 (с, 1H), 7.98 (д, $J = 191.8$ Гц, 2H), 7.43 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.30 (т, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.24 (т, $J = 7.4$ Гц, 1H), 4.35 (с, 2H). ¹³C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 174.13, 161.92, 161.21, 138.17, 129.50, 128.87, 127.57, 116.05, 86.01, 34.54.

4-Амино-2-(изопропилтио)пиримидин-5-карбонитрил

Выход 80 %, т. пл. 156-158 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.8 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3370, 3330, 2222, 779. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 8.43 (с, 1H), 7.87 (д, $J = 134.3$ Гц, 2H), 3.81 (гепт., $J = 6.9$ Гц, 1H), 1.32 (д, $J =$

7.1 Гц, 6H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 174.72, 161.92, 161.07, 116.10, 85.75, 35.65, 23.18.

Производные пириимидин-5-карботиоамида. Общая методика синтеза

Через раствор соответствующего пириимидин-5-карбонитрила (40 ммоль) и 6 мл триэтиалмина (40 ммоль, 4.04 г) в 30 мл пиридина пропускали сероводород, получаемый при действии на сульфид фосфора воды, до изменения окраски с желтой на зеленую. Смесь оставляли при комнатной температуре на 24 ч, после чего выливали в воду, осадок отфильтровывали и промывали водой.

4-Амино-2-(метилтио)пириимидин-5-карботиоамид

Получали тиоамидированием 4-амино-2-(метилтио)пириимидин-5-карбонитрила. Выход 64 %. Т. пл. = 245 – 247 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.9 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3388, 3289, 1057, 780. ^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9.76 (с, 1H), 9.50 (с, 1H), 8.23 (с, 1H), 8.02 (с, 2H), 2.45 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 195.79, 172.07, 160.77, 153.32, 111.86, 109.99, 13.82.

4-Амино-2-(этилтио)пириимидин-5-карботиоамид

Получали тиоамидированием 4-амино-2-(этилтио)пириимидин-5-карбонитрила. Выход 72 %. Т. пл. = 193 – 195 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 100 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3390, 3309, 1207, 784. ^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9.76 (с, 1H), 9.50 (с, 1H), 8.22 (с, 1H), 8.00 (с, 2H), 3.04 (квинт., J = 7.3 Гц, 2H), 1.28 (т, J = 7.4 Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 195.79, 171.70, 160.84, 153.36, 111.95, 24.69, 15.29.

4-Амино-2-(пропилтио)пириимидин-5-карботиоамид

Получали тиоамидированием 4-амино-2-(пропилтио)пириимидин-5-карбонитрила. Выход 74 %. Т. пл. = 137 – 139 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.7 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3381, 3338, 1204, 800. ^1H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9.77 (с, 1H), 9.50 (с, 1H), 8.21 (с, 1H), 8.01 (с, 3H), 3.03 (т, J = 7.2 Гц, 2H), 1.65 (гепт., J = 7.3 Гц, 2H), 0.96 (т, J = 7.4 Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 195.77, 171.78, 160.80, 153.34, 111.91, 32.22, 22.97, 13.71.

4-Амино-2-(бензилтио)пиримидин-5-карботиоамид

Получали тиамидированием 4-амино-2-(бензилтио)пиримидин-5-карбонитрила. Выход 84 %. Т. пл. = 172 – 174 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.6 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3391, 3272, 1062, 782. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9.80 (с, 1H), 9.54 (с, 1H), 8.24 (с, 1H), 8.07 (с, 2H), 7.43 (д, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.30 (т, $J = 7.5$ Гц, 2H), 7.23 (т, $J = 7.4$ Гц, 1H), 4.36 (с, 2H). ¹³C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 195.71, 171.10, 160.80, 153.44, 138.74, 129.41, 128.84, 127.45, 112.18, 34.37.

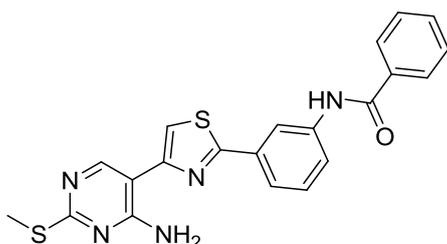
4-Амино-2-(изопропилтио)пиримидин-5-карботиоамид

Получали тиамидированием 4-амино-2-(изопропилтио)пиримидин-5-карбонитрила. Выход 86 %. Т. пл. = 135 – 137 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.9 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3401, 3347, 1202, 785. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9.77 (с, 1H), 9.51 (с, 1H), 8.22 (с, 1H), 8.00 (с, 2H), 3.83 (гепт., $J = 6.8$ Гц, 1H), 1.34 (д, $J = 7.0$ Гц, 6H). ¹³C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 195.77, 171.78, 160.84, 153.34, 111.89, 35.33, 23.37.

3.4. Синтез целевых соединений

Производные N-(3-(4-(4-амино-2-(алкилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамида. Общая методика каплинга

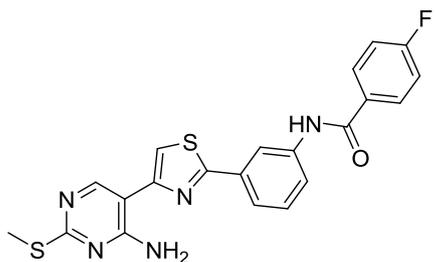
К раствору 2-бромацетильного производного бензамида (1 ммоль) в 50 мл этанола добавляли соответствующее производное пиримидин-5-карботиоамида (1 ммоль) и кипятили в течение 48 ч. После реакцию смесь обрабатывали насыщенным раствором NaHCO₃, отфильтровывали выпавший осадок и промывали водой.



N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамид

Выход 83 %. Т. пл. = 243 – 245 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.1 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3349, 2920, 1612, 1370, 705.

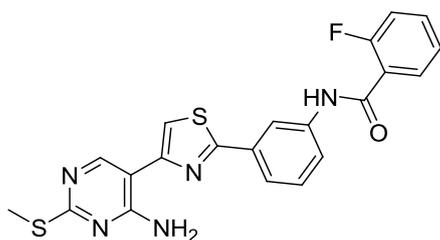
^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ 10.42 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.39 (s, 2H), 8.07 (с, 1H), 8.02 – 7.96 (м, 2H), 7.87 (дд, $J = 8.1, 2.0$ Гц, 1H), 7.71 (дт, $J = 7.8, 1.2$ Гц, 1H), 7.65 – 7.59 (м, 1H), 7.56 (т, $J = 7.3$ Гц, 2H), 7.47 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.79, 166.21, 164.82, 158.78, 155.26, 140.22, 135.38, 134.25, 132.11, 129.71, 128.89, 128.15, 121.86, 120.81, 118.49, 113.37, 105.99, 13.89.



N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-4-фторбензамид

Выход 80 %. Т. пл. = 255 – 257 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 98.4 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3316, 3467, 1652, 1368, 730.

^{19}F ЯМР (471 МГц, ДМСО- d_6) δ -108.66. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ 10.44 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.54 – 8.27 (м, 3H), 8.14 – 8.02 (м, 3H), 7.84 (дд, $J = 8.1, 2.1$ Гц, 1H), 7.71 (дт, $J = 7.7, 1.3$ Гц, 1H), 7.47 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.43 – 7.33 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.80, 165.56, 165.07, 164.83, 163.58, 158.78, 155.28, 154.26, 140.11, 134.26, 131.77, 130.93, 130.86, 129.72, 121.94, 120.86, 118.52, 115.92, 115.75, 113.41, 105.99, 13.88.

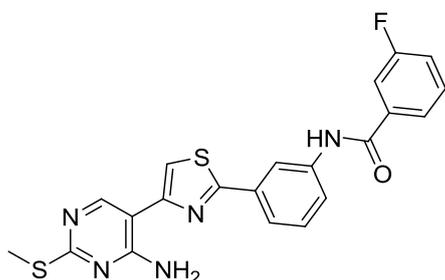


N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-2-фторбензамид

Выход 69 %. Т. пл. = 231 – 233 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.4 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3331, 3436, 1654, 1329, 727.

^{19}F ЯМР (471 МГц, ДМСО- d_6) δ -114.59. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ 10.59 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.51 – 8.28 (м, 3H), 8.08 (с, 1H), 7.86 – 7.78 (м, 1H), 7.71 (тт, $J = 6.2, 2.0$ Гц, 2H), 7.60 (дддд, $J = 8.8, 7.3, 5.3, 1.8$ Гц, 1H), 7.47 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.43 – 7.30 (м, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.80, 164.84, 163.42, 160.33, 158.78, 158.35, 155.28, 154.14, 139.95, 134.37,

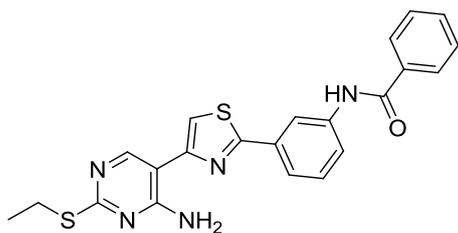
133.07, 130.38, 129.88, 125.39, 125.05, 122.00, 120.09, 117.78, 116.74, 116.57, 113.48, 105.98, 13.88.



N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамид

Выход 64 %. Т. пл. = 257 – 259 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 98.6 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3324, 1645, 1328, 726.

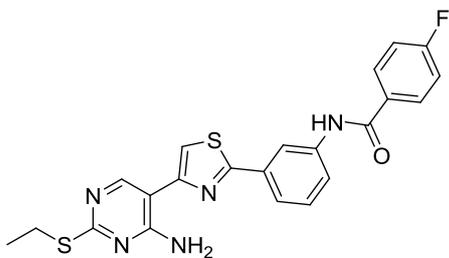
¹⁹F ЯМР (471 МГц, ДМСО-*d*₆) δ -112.57. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.49 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.53 – 8.30 (м, 3H), 8.08 (с, 1H), 7.86 (д, *J* = 7.7 Гц, 2H), 7.81 (дт, *J* = 9.7, 2.2 Гц, 1H), 7.72 (дт, *J* = 7.8, 1.3 Гц, 1H), 7.62 (тд, *J* = 8.0, 5.8 Гц, 1H), 7.48 (тд, *J* = 8.2, 4.3 Гц, 2H).



N-(3-(4-(4-амино-2-(этиллтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)бензамид

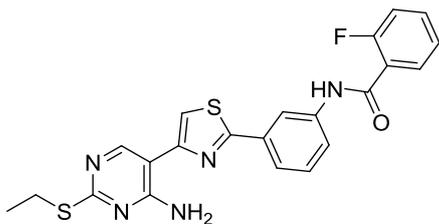
Выход 97 %. Т. пл. = 246 – 248 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 93.4 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3435, 3325, 1646, 1080, 727.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.42 (с, 1H), 8.67 (с, 1H), 8.39 (с, 2H), 8.08 (с, 1H), 8.03 – 7.95 (м, 2H), 7.86 (д, *J* = 8.1 Гц, 1H), 7.71 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.62 (т, *J* = 7.3 Гц, 1H), 7.56 (т, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.48 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 3.11 (квинт., *J* = 7.3 Гц, 2H), 1.33 (т, *J* = 7.3 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.43, 166.20, 164.82, 158.85, 155.34, 154.27, 140.22, 135.38, 134.26, 132.11, 129.72, 128.89, 128.15, 121.86, 120.80, 118.49, 113.38, 106.05, 24.77, 15.29.



N-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-4-фторбензамид

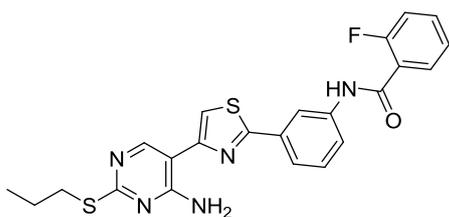
Выход 80 %. Т. пл. = 242 – 244 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 92.7 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3351, 3324, 1327, 725.



N-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-2-фторбензамид

Выход 80 %. Т. пл. = 242 – 244 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 92.7 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3351, 3324, 1327, 725.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.59 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.52 – 8.28 (м, 3H), 8.09 (с, 1H), 7.85 – 7.77 (м, 1H), 7.71 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H), 7.60 (квинт., *J* = 7.3 Гц, 1H), 7.47 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 7.37 (квинт., *J* = 9.4, 7.7 Гц, 2H), 3.11 (квинт., *J* = 7.3 Гц, 2H), 1.33 (т, *J* = 7.3 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.44, 164.84, 163.42, 160.33, 158.85, 158.35, 155.34, 154.13, 139.95, 134.37, 133.00, 130.38, 129.88, 125.39, 125.05, 122.00, 120.08, 117.78, 116.74, 116.57, 113.49, 106.04, 24.77, 15.28.

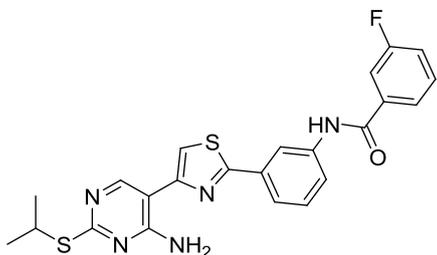


N-(3-(4-(4-амино-2-(пропилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-2-фторбензамид

Выход 82 %. Т. пл. = 210 – 212 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 94.9 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3342, 1631, 1311, 724.

¹⁹F ЯМР (471 МГц, ДМСО-*d*₆) δ -114.60 (дт, *J* = 11.0, 6.3 Гц). ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.59 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.54 – 8.27 (м, 3H), 8.08 (с, 1H), 7.81 (дд, *J* = 8.0, 2.0 Гц, 1H), 7.71 (тд, *J* = 7.4, 1.7 Гц, 2H), 7.60 (тдд, *J* = 7.6, 5.3, 1.8 Гц, 1H), 7.47 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 7.43 – 7.29 (м, 3H), 3.09 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H), 1.69 (гепт., *J* = 7.3 Гц, 2H), 0.99 (т, *J* = 7.3 Гц, 3H). ¹³C ЯМР

(126 МГц, ДМСО) δ 171.52, 164.84, 163.42, 160.33, 158.80, 158.35, 155.32, 154.13, 139.95, 134.37, 133.01, 130.38, 129.88, 125.38, 125.05, 121.99, 120.08, 117.79, 116.74, 116.57, 113.48, 106.03, 32.31, 22.97, 13.76.

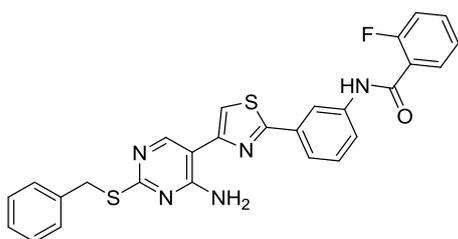


N-(3-(4-(4-амино-2-

(изопропилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамид

Выход 89 %. Т. пл. = 228 – 230 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 96.4 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3318, 1622, 1309, 727.

¹⁹F ЯМР (471 МГц, ДМСО-*d*₆) δ -112.57 (тд, J = 9.2, 5.7 Гц). ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.48 (с, 1H), 8.66 (д, J = 0.8 Гц, 1H), 8.38 (д, J = 2.0 Гц, 3H), 8.08 (д, J = 0.8 Гц, 1H), 7.83 (ддт, J = 21.2, 10.0, 1.3 Гц, 3H), 7.72 (дквинт., J = 7.7, 1.1 Гц, 1H), 7.62 (тд, J = 7.9, 5.7 Гц, 1H), 7.55 – 7.42 (м, 2H), 3.95 – 3.85 (м, 1H), 1.38 (дд, J = 6.9, 1.0 Гц, 6H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.52, 164.84, 164.76, 163.37, 161.42, 158.84, 155.33, 154.20, 139.92, 137.67, 137.61, 134.29, 131.13, 131.07, 129.77, 124.36, 122.10, 120.88, 119.10, 118.94, 118.57, 115.07, 114.89, 113.44, 105.99, 35.43, 23.40.

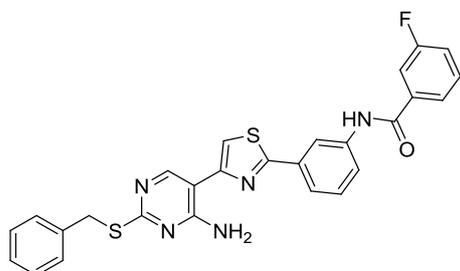


N-(3-(4-(4-амино-2-(бензилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-2-фторбензамид

Выход 86 %. Т. пл. = 238 – 240 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 94.1 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3302, 1603, 1307, 725.

¹⁹F ЯМР (471 МГц, ДМСО-*d*₆) δ -114.60 (дт, J = 11.2, 6.2 Гц). ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.59 (с, 1H), 8.68 (с, 1H), 8.61 – 8.32 (м, 3H), 8.10 (с, 1H), 7.81 (дт, J = 8.1, 1.4 Гц, 1H), 7.72 (ддд, J = 9.3, 7.6, 1.8 Гц, 2H), 7.61 (тдд, J = 7.5, 5.2, 1.8 Гц, 1H), 7.50 – 7.45 (м, 2H), 7.40 – 7.35 (м, 2H), 7.35 – 7.30 (м, 2H), 7.29 – 7.23 (м, 2H), 4.41 (с, 2H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ

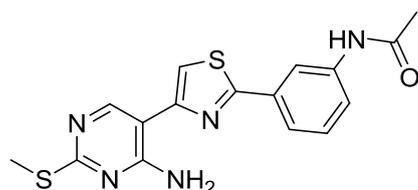
170.86, 164.73, 163.43, 160.33, 158.85, 158.35, 155.38, 154.14, 139.96, 138.66, 134.36, 133.08, 133.02, 130.36, 129.90, 129.84, 129.50, 128.86, 127.48, 125.50, 125.38, 125.08, 125.05, 122.00, 120.08, 117.80, 116.74, 116.57, 113.58, 106.21, 34.49.



N-(3-(4-(4-амино-2-(бензилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамид

Выход 84 %. Т. пл. = 225 – 227 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 99.0 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3314, 1611, 1321, 731.

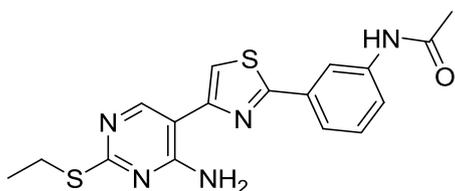
¹⁹F ЯМР (471 МГц, ДМСО-*d*₆) δ -112.56. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.48 (с, 1H), 8.68 (с, 1H), 8.40 (т, *J* = 1.9 Гц, 3H), 8.09 (с, 1H), 7.92 – 7.77 (м, 3H), 7.77 – 7.69 (м, 1H), 7.62 (тд, *J* = 8.0, 5.8 Гц, 1H), 7.52 – 7.43 (м, 4H), 7.36 – 7.28 (м, 2H), 7.29 – 7.20 (м, 1H), 4.42 (с, 2H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 170.87, 164.78, 164.73, 163.37, 161.43, 158.85, 155.37, 154.22, 139.95, 138.66, 137.63, 134.28, 131.12, 129.76, 129.50, 128.86, 127.48, 124.39, 122.09, 120.86, 119.10, 118.93, 118.58, 115.08, 114.90, 113.51, 106.23, 34.50.



N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)ацетамид

Выход 31 %. Т. пл. = 248 – 250 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 97.0 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3557, 3320, 1672, 731.

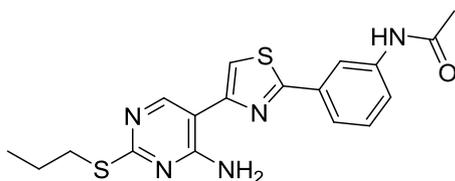
¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.12 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.43 (д, *J* = 15.7 Гц, 2H), 8.19 (д, *J* = 2.0 Гц, 1H), 8.04 (с, 1H), 7.63 (ддд, *J* = 9.1, 7.6, 1.8 Гц, 2H), 7.40 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 2.08 (с, 3H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.78, 168.96, 164.77, 158.78, 155.25, 154.29, 140.36, 134.26, 129.76, 121.20, 119.45, 117.08, 113.34, 105.98, 24.55, 13.88.



N-(3-(4-(4-амино-2-(этилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)ацетамид

Выход 49 %. Т. пл. = 234 – 236 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 96.5 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3435, 3220, 1646, 724.

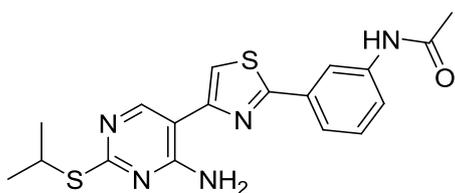
¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО -*d*₆) δ 10.12 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.42 (д, *J* = 21.9 Гц, 2H), 8.18 (д, *J* = 2.0 Гц, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.62 (т, *J* = 8.3 Гц, 2H), 7.40 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 3.11 (квинт., *J* = 7.3 Гц, 2H), 2.08 (с, 3H), 1.33 (т, *J* = 7.3 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.42, 168.96, 164.77, 158.85, 155.30, 154.28, 140.35, 134.27, 129.76, 121.20, 119.45, 117.07, 113.32, 106.04, 24.77, 24.53, 15.27.



N-(3-(4-(4-амино-2-(пропилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)ацетамид

Выход 77 %. Т. пл. = 223 – 225 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 98.6 %. ИК-спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3428, 3324, 3314, 1684, 730.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10.11 (с, 1H), 8.64 (с, 1H), 8.41 (д, *J* = 21.4 Гц, 2H), 8.19 (т, *J* = 1.9 Гц, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.67 – 7.56 (м, 2H), 7.40 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 3.09 (т, *J* = 7.2 Гц, 2H), 2.08 (с, 3H), 1.69 (гепт., *J* = 7.3 Гц, 2H), 1.00 (т, *J* = 7.3 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.50, 168.98, 164.77, 158.80, 155.29, 154.27, 140.34, 134.27, 129.77, 121.21, 119.45, 117.07, 113.33, 106.03, 32.30, 24.52, 22.96, 13.75.



N-(3-(4-(4-амино-2-(изопропилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)ацетамид

Выход 58 %. Т. пл. = 148 – 150 °С. ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2): 94.0 %. ИК-спектр (KBr),

ν , cm^{-1} : 3426, 3351, 3285, 1659, 732.

^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ 10.10 (с, 1H), 8.65 (с, 0H), 8.39 (с, 2H), 8.18 (т, $J = 1.9$ Гц, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.67 – 7.55 (м, 2H), 7.40 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H), 3.90 (пиктет, $J = 6.9$ Гц, 1H), 2.08 (с, 3H), 1.38 (д, $J = 6.8$ Гц, 6H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ДМСО) δ 171.50, 168.94, 164.77, 158.85, 155.29, 154.29, 140.35, 134.28, 129.75, 121.21, 119.45, 117.06, 113.31, 106.00, 35.41, 24.53, 23.41.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. На основе структурно-ориентированного молекулярного дизайна предложены новые эффективные ингибиторы мутантных форм киназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста, включающих 4-амино-5-(тиазол-2-ил)пиримидиновый скаффолд.
2. Посредством молекулярного моделирования (молекулярный докинг) определены основные особенности межмолекулярного взаимодействия синтезируемых лигандов с активным сайтом связывания EGFR-киназы.
3. Посредством МТТ-теста показана высокая цитотоксичность *in vitro* синтезированных соединений в отношении клеточных линий MCF-7, A549 в микромолярных концентрациях.
4. Изучена способность нарушения EGF-зависимой экспрессии EGFR/pEGFR, pAKT, под действием разработанного ингибитора EGFR.
5. Показано отсутствие индукция пролиферации клеток SK-BR-3 под действием разработанного ингибитора EGFR.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lawrence D.S., Niu J. // Pharmacol. Ther. 1998. Vol. 77. P. 81.
2. Profit A. A., Lee T. R., Lawrence D. S. Bivalent Inhibitors of Protein Tyrosine Kinases // Journal of the American Chemical Society. 1999. Vol. 121, № 1. P. 280-283.
3. Strawn L. M., Shawver L. K. Tyrosine kinases in disease: overview of kinase inhibitors as therapeutic agents and current drugs in clinical trials // Expert Opinion on Investigational Drugs. 1998. Vol. 7, № 4. P. 553-573.
4. Bridges A.J. Current progress towards the development of tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents // Expert Opinion on Emerging Drugs. 1998. Vol. 3, № 1. P. 279-292.
5. Kelly A.G., Laight A., Morris C.O., Woodburn J.R., Richmond G.H.P. In: 10th NCI-EORTC Symp. New Drugs Cancer Ther. Amsterdam. 1998.
6. Senderowicz A.M., Headlee D., Stinson S.F., Lush R.M., Kalil N., Villalba L., Hill K., Steinberg S.M., Figg W.D., Tompkins A., Arbuck S.G., Sausville E.A. Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms // Journal of Clinical Oncology. Vol. 16, № 9. P. 2986-2999.
7. Mehta A.B., Virchis A.E., Jones D.T., Hart S.M., Wickremasinghe R.G., Prentice H.G., Yong K.L., Csemak-Renner A.M.K., Ganeshaguru K. // Blood 1997. Vol. 90. P. 3634.
8. Lavelle F. American Association for Cancer Research 1997: progress and new hope in the fight against cancer // Expert Opinion on Investigational Drugs. 1997. Vol. 6, № 6. P. 771-775.
9. Smith C.M., Shindayalov I.N., Veretnik S., Gribskov M., Taylor S.S., Ten Eyck L.F., Bourne P.E. Trends in Biochemical Sciences. 1997. Vol. 22. P. 444.
10. Trumpp-Kallmeyer S., Rubin J.R., Humblet C., Hamby J.M., Showalter H.D.H. Development of a Binding Model to Protein Tyrosine Kinases for Substituted Pyrido[2,3-*d*]pyrimidine Inhibitors // Journal of Medicinal Chemistry. 1998. Vol. 41, № 11. P. 1752-1763.

11. Trumpp-Kallmeyer S., Showalter H.D. // Chemtracts. 1998. Vol. 11. P. 550.
12. Palmer B.D., Trumpp-Kallmeyer S., Fry D.W., Nelson J.M., Showalter H.D.H., Denny W.A. Tyrosine Kinase Inhibitors. 11. Soluble Analogues of Pyrrolo- and Pyrazoloquinazolines as Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: Synthesis, Biological Evaluation, and Modeling of the Mode of Binding // Journal of Medicinal Chemistry. 1997. Vol. 40, № 10. P. 1519-1529.
13. Furet P., Caravatti G., Lydon N., Priestle J.P., Sowadski J.M., Trinks U., Traxler P. // J. Comp-Aid Mol. Des. 1995. Vol. 9. P. 465.
14. Traxler P., Green J., Mett H., Sequin U., Furet P. Use of a Pharmacophore Model for the Design of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors: Isoflavones and 3-Phenyl-4(1*H*)-quinolones // Journal of Medicinal Chemistry. 1999. Vol. 42, № 6. P. 1018-1026.
15. Traxler P., Bold G., Frei J., Lang M., Lydon N., Mett H., Buchdunger E., Meyer T., Mueller M., Furet P. Use of a Pharmacophore Model for the Design of EGF-R Tyrosine Kinase Inhibitors: 4-(Phenylamino)pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines // Journal of Medicinal Chemistry. 1997. Vol. 40, № 22. P. 3601-3616.
16. Traxler P., Furet P., Mett H., Buchdunger E., Meyer T., Lydon N. // Journal of Medicinal Chemistry. 1996. Vol. 36, № 12. P. 2285.
17. Adams J.L., Lee D. // Curr. Opin. Drug. Disc. Dev. 1999. Vol. 2. P. 96.
18. McMahon G., Sun L., Liang C., Tang C. // Cur. Opin. Drug. Disc. Dev. 1998. Vol. 1. P. 131.
19. Traxler P. // Expert. Opin. Ther. Pat. 1998. Vol. 8. P. 1599.
20. Traxler P. // Expert. Opin. Ther. Pat. 1997. Vol. 7. P. 571.
21. Voldborg B.R., Damstrup L., Spang-Thomsen M., Poulsen H.S. // Ann. Oncol. 1997. Vol. 12. P. 1197.
22. Heldin C.H., Oumlstman A., Rönstrand L. // Biochim. Biophys. Acta 1998. Vol. 1378. P. F79.

23. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. P. 9.
24. Klint P., Claesson-Welsh L. // *Front. Biosci.* 1999. Vol. 4. P. D165.
25. Garrington T.P., Johnson G.L. // *Curr. Opin. Cell. Bio.* 1999. Vol. 11. P. 211.
26. Wang Z.L., Canagarajah B.J., Boehm J.C., Kassis S., Cobb M.H., Young P.R., Abdel-Meguid S., Adams J.L., Goldsmith E.J. // *Structure.* 1998. Vol. 6. P. 1117.
27. Kyriakis J.M., Avruch J. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 24313.
28. Lee J.C., Laydon J.T., McDonnell P.C., Gallagher T.F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M.J., Heys J.R., Landvatter S.W., Strickler J.E., et al. // *Nature.* 1994. Vol. 372. P. 739.
29. Pines J. // *Nature Cell. Bio.* 1999. Vol. 1. P. E73.
30. Fry D.W., Kraker A.J., McMichael A., Ambroso L.A., Nelson J.M., Leopold W.R., Connors R.W., Bridges A.J. // *Science.* 1994. Vol. 265. P. 1093.
31. McMahon G., Shawver L.K., Narog B., Tang P.C., Hirth K.P., inventors. *Sugen WO-09810767; 1998.*
32. Kunkel M.W., Hook K.E., Howard C.T., Przybranowski S., Roberts B.J., Elliot W.L., Leopold W.R. // *Invest New Drug.* 1996. Vol. 13. P. 295.
33. Faust R.A., Tawfic S., Davis A.T., Ahmed K. // *Oral. Oncol.* 1999. Vol. 35. P. 290.
34. Modjtahedi H., Affleck K., Stubberfield C., Dean C. // *Int. J. Oncol.* 1998. Vol. 13. P. 335.
35. Bos M., Mendelsohn J., Kim Y.M., Albanell J., Fry D.W., Baselga J. // *Clin. Cancer. Res.* 1997. Vol. 3. P. 2099.
36. Jonstrom P., Fredriksson A., Thorell J.O., Stone-Elander S. // *J. Label Cpd. Radiopharm.* 1998. Vol. XLI. P. 623.
37. Gibson K.H., inventor. *Zeneca WO-09633980; 1996.*

38. Woodburn J.R., Barker A.J., Gibson K.H., Ashton S.E., Wakeling A.E., Curry B.J., Scarlett L., Henthorn L.R. // Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 1997. Vol. 38. P. 633.
39. Moyer J.D., Barbacci E.G., Iwata K.K., Arnold L., Boman B., Cunningham A., DiOrio C., Doty J., Morin M.J., Moyer M.P., Neveu M., Pollack V.A., Pustilnik L.R., Reynolds M.M., Sloan D., Theleman A., Miller P. // Cancer. Res. 1997. Vol. 57. P. 4838.
40. Iwata K., Miller P.E., Barbacci E.G., Arnold L., Doty J., DiOrio C.I., Pustilnik L.R., Reynolds M., Thelemann A., Sloan D., Moyer J.D. // Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 1997. Vol. 38. P. 633.
41. Schnur R.C., Arnold L.D., inventors. Pfizer WO-09630347; 1996.
42. Myers M.R., Spada A.P., Maguire M.P., Persons P.E., inventors. Rhone-Poulenc Rorer Pharm US-05721237; 1998.
43. Barker A.J., Johnstone C., inventors. Zeneca WO-09730044; 1997.
44. Gibson K.H., inventor. Zeneca WO-09738994; 1997.
45. Cockerill G.S., Carter M.C., McKeown S.K., Vile S., Page M.J., Hudson A.T., Barraclough P., Franzmann K.W., inventors. Glaxo-Wellcome WO-09703069; 1997.
46. McKeown S.K., Page M.J., Vile S., Walker A.L., Hudson A.T., Barraclough P., Franzmann K.W., inventors. Glaxo-Wellcome WO-09713760; 1997.
47. Myers M.R., Setzer N.N., Spada A.P., Persons P.E., Ly C.Q., Maguire M.P., Zulli A.L., Cheney D.L., Zilberstein A., Johnson S.E., Franks C.F., Mitchell K.J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. Vol. 7. P. 421.
48. Myers M.R., Setzer N.N., Spada A.P., Zulli A.L., Hsu C.Y.J., Zilberstein A., Johnson S.E., Hook K.E., Jacoski M.V. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. Vol. 7. P. 417.
49. Gibson K.H., Brundy W., Godfrey A.A., Woodburn J.R., Ashton S.E., Curry B.J., Scarlett L., Barker A.J., Brown D.S. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1997. Vol. 7. P. 2723.

50. Bridges A.J., Zhou H., Cody D.R., Rewcastle G.F., McMichael A., Showalter H.D., Fry D.W., Kraker A.J., Denny W.A. Tyrosine Kinase Inhibitors. 8. An Unusually Steep Structure–Activity Relationship for Analogues of 4-(3-Bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a Potent Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996. Vol. 39, № 1. P. 267-276.

51. Hsu C.Y.J., Johnson S.E., Maguire M.P., Myers M.R., Persons P.E., Spada A.P., Zilberstein A., inventors. Rhone– Poulenc Rorer Pharm WO-09515758; 1995.

52. Rewcastle G.F., Denny W.A., Bridges A.J., Zhou H., Cody D.R., McMichael A., Fry D.W. Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl)amino]- and 4-(phenylamino)quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate binding site inhibitors of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995. Vol. 38, № 18. P. 3482-3487.

53. Smaill J.B., Palmer B.D., Rewcastle G.F., Denny W.A., McNamara D.J., Dobrusin E.M., Bridges A.J., Zhou H., Showalter H.D., Winters R.T., Leopold W.R., Fry D.W., Nelson J.M., Slintak V., Elliot W.L., Roberts B.J., Vincent P.W., Patmore S.J. Tyrosine Kinase Inhibitors. 15. 4-(Phenylamino)quinazoline and 4-(Phenylamino)pyrido[*d*]pyrimidine Acrylamides as Irreversible Inhibitors of the ATP Binding Site of the Epidermal Growth Factor Receptor // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1999. Vol. 42, № 10. P. 1803-1815.

54. Fry D.W., Bridges A.J., Denny W.A., Doherty A.M., Greis K.D., Hicks J.L., Hook K.E., Keller P.R., Leopold W.R., Loo J.A., McNamara D.J., Nelson J.M., Sherwood V., Smaill J.B., Trumpp-Kallmeyer S., Dobrusin E.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 12022.

55. Bridges A.J., Denny W.A., Dobrusin E.M., Doherty A.M., Fry D.W., McNamara D.J., Showalter H.D., Smaill J.B., Zhou H., et al., inventors. Warner Lambert WO-09738983; 1997.

56. Vincent P.W., Patmore S.J., Atkinson B.E., Bridges A.J., Kirkish L.S., Dudeck R.C., Leopold W.R., Zhou H., Elliott W.L. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1999. Vol. 40. P. 117.
57. Driscoll D., Steinkampf R., Patmore S., Elliot W., Klohs W. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1999. Vol. 40. P. 121.
58. Bridges A.J., Denny W.A., Dobrusin E.M., Doherty A.M., Fry D.W., McNamara D.J., Showalter H.D., Smaill J.B., Zhou H., inventors. Warner Lambert WO-09738983; 1997.
59. Bridges A.J., inventor. Warner Lambert WO-09906396; 1999.
60. Bridges A.J., inventor. Warner Lambert WO-09906378; 1999.
61. Tang C., McMahan G., Weinberger H., Kutscher B., App H., inventors. Sugen WO-09850370; 1998.
62. Cockerill G.S., Stubberfield C., Stables J., Carter M., Guntrip S., Smith K., Shaw R., Topley P. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1999. Vol. 40. P. 117.
63. Hennequin L.F.A., Thomas A.P., Johnstone C., Ple P., Stokes E.S.E., Ogilvie D.J., Dukes M., Wedge S.R. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1999. Vol. 90. P. 69.
64. Ogilvie D.J., Wedge S.R., Dukes M., Kendrew J., Curwen J.O., Thomas A.P., Hennequin L.F.A., Ple P., Stokes E.S.E., Johnstone C., Wadsworth S.A., Richmond G.H.P., Curry B.J. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1999. Vol. 90. P. 69.
65. Hennequin L.F.A., Ple P., Lohmann J.J.M., Thomas A.P., inventors. Zeneca WO-09910349; 1999.
66. Thomas A.P., Hennequin L.F.A., Ple P., inventors. Zeneca WO-09813350; 1998.
67. Thomas A.P., Hennequin L.F.A., Johnstone C., Stokes E.S.E., Lohmann J.J.M., Clayton E., inventors. Zeneca WO-09813354; 1998.
68. App H., McMahan G., Tang P.C., Gazit A., Levitzki A., inventors. Sugen US-5712395; 1998.

69. Lohmann J.J.M., Hennequin L.F.A., Thomas A.P., inventors. Zeneca WO-09722596; 1997.
70. Thomas A.P., Hennequin L.F.A., Johnstone C., inventors. Zeneca WO-09732856; 1997.
71. Thomas A.P., Johnstone C., Hennequin L.F.A., inventors. Zeneca WO-09730035; 1997.
72. Thomas A.P., Hennequin L.F.A., inventors. Zeneca WO-09734876; 1997.
73. Cobb J.M., Fiorini M.T., Goddard C.R., Theoclitou M.E., Abell C. // *Tetrahedron Lett.* 1999. Vol. 40. P. 1045.
74. Bridges A.J., Zhou H., Cody D.R., Rewcastle G.W., McMichael A., Showalter H.D., Fry D.W., Kraker A.J., Denny W.A. // *Journal of Medicinal Chemistry.* 1996. Vol. 7. P. 187.
75. Zimmermann J., Buchdunger E., Mett H., Meyer T., Lydon N.B. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. Vol. 7 P. 187.
76. Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N.B. // *Nature Med.* 1996. Vol. 2. P. 561.
77. Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Mueller M., Druker B.J., Lydon N.B. // *Cancer Res.* 1996. Vol. 56. P. 100.
78. Zimmermann J., inventor. Ciba-Geigy WO-09509847; 1995.
79. Zimmermann J., inventor. Ciba-Geigy EP-0564409; 1993.
80. Zimmermann J., Buchdunger E., Mett H., Meyer T., Lydon N.B., Traxler P. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. Vol. 6. P. 1221.
81. Zimmermann J., Caravatti G., Mett H., Meyer T., Mueller M., Lydon N.B., Fabbro D. // *Arch. Pharm. Weinheim.* 1996. Vol. 329. P. 371.
82. Thomas A.P., inventor. Zeneca WO-09515952; 1995.
83. Davis P.D., Moffat D.F.C., Davis J.M., Hutchings M.C., inventor. Celltech Therapeutics WO-09719065; 1997.

84. Bridges A.J., Denny W.A., Fry D.W., Kraker A.J., Meyer R.F., Rewcastle G.F., Thompson A.M., inventors. Warner Lambert WO-09519774; 1995.
85. Bridges A.J., Denny W.A., Fry D.W., Kraker A.J., Meyer R.F., Rewcastle G.F., Thompson A.M., Showalter H.D., inventors. Warner Lambert WO-09519970; 1995.
86. Thompson A.M., Bridges A.J., Fry D.W., Kraker A.J., Denny W.A. // Journal of Medicinal Chemistry. 1995. Vol. 38. P. 3780.
87. Rewcastle G.F., Palmer B.D., Thompson A.M., Bridges A.J., Cody D.R., Zhou H.M., Fry D.W., McMichael A., Denny W.A. // Journal of Medicinal Chemistry. 1996. Vol. 39. P. 1823.
88. Rewcastle G.W., Murray D.K., Elliott W.L., Fry D.W., Howard C.T., Nelson J.M., Roberts B.J., Vincent P.W., Showalter H.D., Winters R.T., Denny W.A. // Journal of Medicinal Chemistry. 1998. Vol. 41. P. 742.
89. Thompson A.M., Murray D.K., Elliott W.L., Fry D.W., Nelson J.A., Showalter H.D., Roberts B.J., Vincent P.W., Denny W.A. // Journal of Medicinal Chemistry. 1997. Vol. 40. P. 3915.
90. Cockerill G.S., Carter M.C., Guntrip S.B., Smith K.J., inventors. Glaxo Group WO-09802438; 1998.
91. Cockerill G.S., Carter M.C., Guntrip S.B., Smith K.J., inventors. Glaxo Group WO-09802437; 1998.
92. Cockerill G.S., Guntrip S.B., McKeown S.K., Page M.J., Smith K.J., Vile S., Hudson A.T., Barraclough P., Franzmann K.W., et al., inventors. Glaxo Group WO-09713771; 1997.
93. Himmelsbach F., Dahmann G., von Ruden T., Metz T., inventors. Karl Thomae DE-19629652-A1; 1998.
94. Himmelsbach F., Dahmann G., von Ruden T., Metz T., inventors. Karl Thomae DE-1960831-A1; 1997.
95. Blankley C.J., Boschelli D.H., Doherty A.M., Hamby J.M., Klutchko S.R., Panek R.L., inventors. Warner Lambert WO-09634867; 1996.

96. Klutchko S.R., Hamby J.M., Boschelli D.H., Wu Z., Kraker A.J., Amar A., Hartl B.G., et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998. Vol. 41. P. 3276.
97. Connolly C.J.C., Hamby J.M., Schroeder M.C., Barvian M., Lu G.H., Panek R.L., Amar A., Shen C., Kraker A.J., Fry D.W., Klohs W.D., Doherty A.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. Vol. 7. P. 2415.
98. Hamby J.M., Connolly C.J., Schroeder M.C., Winters R.T., Showalter H.D., Panek R.L., Major T.C., Olsewski B., Ryan M.J., Dahring T., Lu G.H., Keiser J., Amar A., Shen C., Kraker A.J., Slintak V., Nelson J.M., Fry D.W., Bradford L., Hallak H., Doherty A.M. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997. Vol. 40. P. 2296.
99. Mohammadi M., Froum S., Hamby J.M., Schroeder M.C., Panek R.L., Lu G.H., Eliseenkova A.V., Green D., Schlessinger J., Hubbard S.R. // *EMBO J.* 1998. Vol. 17. P. 5896.
100. Kenyon B.M., Voest E.E., Chen C.C., Flynn E., Folkman J., D'Amato R.J. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996. Vol. 37. P. 1625.
101. Panek R.L., Lu G.H., Klutchko S.R., Batley B.L., Dahring T.K., Hamby J.M., Hallak H., Doherty A.M., Keiser J.A. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. Vol. 283. P. 1433.
102. Boschelli D.H., Wu Z., Klutchko S.R., Showalter H.D., Hamby J.M., Lu G.H., Major T.C., Dahring T., Batley B., Panek R.L., Keiser J., Hartl B.G., Kraker A.J., Klohs W.D., Roberts B.J., Patmore S., Elliott W.L., Steinkampf R., Bradford L., Hallak H., Doherty A.M. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998. Vol. 41. P. 4365.
103. Rewcastle G.F., Bridges A.J., Fry D.W., Rubin J.R., Denny W.A. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997. Vol. 40. P. 1820.
104. Himmelsbach F., Dahmann G., von Ruden T., Metz T., inventors. Karl Thomae WO-09732880; 1997.
105. Himmelsbach F., Dahmann G., von Ruden T., Metz T., inventors. Karl Thomae WO-09732882; 1997.

106. Traxler P., Furet P., Brill W.D., inventors. Ciba–Geigy EP-00682027; 1995.
107. Traxler P., Bold G., Buchdunger E., Lang M., Mett H., Furet P. Book of abstracts. Dallas: 215th ACS Nat Meet; 1998.
108. Traxler P., Bold G., Lang M., Frei J., inventors. Novartis AG WO-09807726; 1998.
109. Traxler P., Frei J., Bold G., inventors. Novartis AG WO-09727199; 1997.
110. Traxler P., Bold G., Brill W.D., Frei J., inventors. Novartis AG WO-09702266; 1997.
111. Missbach M., Jeschke M., Field J.B., Muller M., Glatt M., Green J., Susa M. // Bone. 1999. Vol. 24. P. 437.
112. Missbach M., Green J., Susa M., Jeschke M., Buchdunger E., Mett H., Meyer T. // Book of abstracts. Dallas: 215th ACS Nat. Meet. 1998.
113. Altmann E., inventor. Novartis AG WO-09734895; 1997.
114. Altmann E., Missbach M., Widler L., inventors. Novartis AG WO-09732879; 1997.
115. Altmann E., Missbach M., Widler L., Maibaum J.K., inventors. Novartis AG WO-09749706; 1997.
116. Altmann E., Widler L., Missbach M., inventors. Novartis AG WO-09728161; 1997.
117. Missbach M., inventor. Ciba–Geigy WO-09610028; 1996.
118. Henry J.R., Rupert K.C., Dodd J.H., Turchi I.J., Wadsworth S.A., Cavender D.E., Fahmy B., Olini G.C., Davis J.E., Pellegrino-Gensey J.L., Schafer P.H., Siekeirka J.J. // Journal of Medicinal Chemistry. 1998. Vol. 41. P. 4196.
119. Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer E.J., Pollock B.A., Connelly P.A. // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 695.
120. Zhu X., Kim J.L., Newcomb J.R., Rose P.E., Stover D.R., Toledo L.M., Zhao H., Morgenstern K.A. // Structure. 1999. Vol. 7. P. 651.

121. Bold G., Frei J., Lang M., Traxler P., Furet P., inventors. Novartis AG WO-09814451; 1998.
122. Bold G., Frei J., Lang M., Traxler P., Furet P., inventors. Novartis AG WO-09814449; 1998.
123. Tang P.C., Sun L., McMahon G., Shawver L.K., Hirth K.P., inventors. Sugen WO-09850356; 1998.
124. Tang C., Sun L., McMahon G., Hirth K.P., Shawver L.K., inventors. Sugen WO-09807695; 1998.
125. Sun L., Tran F., App H., Hirth P., McMahon G., Tang C. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998. Vol. 41. P. 2588.
126. Fong T.A.T., Shawver L.K., Sun L., Tang C., App H., Powell T.J., Kim Y.H., Schreck R., Wang X., Risau W., Ullrich A., Hirth K.P., McMahon G. // *Cancer Res*. 1999. Vol. 59. P. 99.
127. Shawver L.K., Strawn L.M., Fong T.A.T., Antonian L., Sukbuntherng J., Powell T.J., Lipson K., Tang F., Tang C., Sun L., et al. // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*. 1999. Vol. 40. P. 723.
128. Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C., Hirth P., Yeh B.K., Hubbard S.R., Schlessinger J. // *Science*. 1997. Vol. 276 P. 955.
129. Mohammadi M., Schlessinger J., Hubbard S.R. // *Cell*. 1996. Vol. 86. P. 577.
130. Liang C., Sun L., Tran F., Schreck R., Tang C., Lipson K.L., Shawver L.K., McMahon G. // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*. 1999. Vol. 40. P. 68.
131. Battistini C., Ermoli A., Vioglio S., Buzzetti F., Ballinari D., inventors. Pharmacia & Upjohn WO-09745409; 1997.
132. Battistini C., Vioglio S., Buzzetti F., Ballinari D., inventors. Pharmacia & Upjohn WO-09746551; 1997.
133. McNutt R.W., Jung D.K., Harris P.A., Hunter R.N., Veal J.M., et al., inventors. Glaxo Group WO-09910325; 1999.
134. Lackey K., Chapman D., Crosby R.M., Davenport E., Dickerson S., Gilmer T.M., Griffin R.J., Hunter R.N., Jung D.K., Keith B.R., Mahoney W.B.,

McDonald O.B., Mullin R.J., Rusnak D.W., Wood E. // Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 1999. Vol. 40 P. 124.

135. Davis S.T., Dickerson S.H., Frye S.V., Harris P.A., Hunter R.N., et al., inventors. Glaxo Group WO-09915500; 1999.

136. Luzzio M.J., Bramson N., Dickerson S., Frye S.V., Harris P., Hassell A.M., Holmes W., Hunter R., Kuyper L., Lackey K., Lovejoy B., Montana V., Roque W., Shewchuk L., Veal J., Walter D. // Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 1999. Vol. 40. P. 622.

137. Parker C.W., Entsch B., Letham D.S. // Phytochem. 1986. Vol. 25. P. 303.

138. Meijer L. // Trends Cell. Biol. 1996. Vol. 6. P. 393.

139. Vesely J., Havlicek L., Strnad M., Blow J.J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D.S., Kato J., Detivaud L. // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 224. P. 771.

140. Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P.J., Blow J.J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., Moulinoux J.P. // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 243. P. 527.

141. Imbach P., Capraro H.G., Furet P., Mett H., Meyer T., Zimmermann // J. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999. Vol. 9. P. 91.

142. Legraverend M., Ludwig O., Bisagni E., Leclerc S., Meijer L. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998. Vol. 8. P. 793.

143. Havlicek L., Hanus J., Vesely J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strand M. // Journal of Medicinal Chemistry. 1997. Vol. 40. P. 408.

144. Zimmermann J., Capraro H.G., Peterli P., Furet P., inventors. Novartis AG WO-09716452; 1997.

145. Gray N.S., Wodicka L., Thunnissen A.M.W.H., Norman T.C., Kwon S., Espinoza F.H., Morgan D.O., Barnes G., Leclerc S., Meijer L., Kim S.H., Lockhart D.J., Schultz P.G. // Science. 1998. Vol. 281. P. 533.

146. Norman T.C., Gray N.S., Koh J.T., Schultz P.G. // J. Am. Chem. Soc. 1996. Vol. 118. P. 7430.

147. Kim S.H. // Pure Appl. Chem. 1998. Vol. 70. P. 555.

148. De Azevedo W.F., Leclerc S., Meijer L., Havlicek L., Strnad M., Kim S.H. // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 243. 518.
149. Kim S.H., Schulze-Gahmen U., Brandsen J., De Azevedo W.F. // *Prog. Cell. Cycle. Res.* 1996. Vol. 2. P. 137.
150. Schulze-Gahmen U., De Bondt H.L., Kim S.H. // *Journal of Medicinal Chemistry.* 1996. Vol. 39. P. 4540.
151. Russo A.A., Jeffrey P.D., Patten A.K., Massagué J., Pavletich N.P. // *Nature.* 1996. Vol. 382. P. 325.
152. Jeffrey P.D., Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massagué J., Pavletich N.P. // *Nature.* 1995. Vol. 376. P. 313.
153. Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H.D., Morgan D.O., Meijer L., Vesely J., Kim S.H. // *Protein. Struc. Func. Gene.* 1995. Vol. 22. P. 378.
154. De Bondt H.L., Rosenblatt J., Jancarlk J., Jones H.D., Morgan D.O., Kim S.H. // *Nature.* 1993. Vol. 363. P. 595.
155. Chang Y.T., Gray N.S., Rosania G.R., Sutherlin D.P., Kwon S., Norman T.C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P.G. // *Chem. Bio.* 1999. Vol. 6. P. 361.
156. Fiorini M.T., Abell C. // *Tetrahedron Lett.* 1998. Vol. 39. P. 1827.
157. Gray N.S., Kwon S., Schultz P.G. // *Tetrahedron Lett.* 1997. Vol. 38. P. 1161.
158. Schow S.R., Mackman R.L., Blum C.L., Brooks E., Horsma A.G., Joly A., Kerwar S.S., Lee G., Shiffman D., Nelson M.G., Wang X., Wick M.M., Zhang X., Lum R.T. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. Vol. 7. P. 2697.
159. Nugiel D.A., Cornelius L.A.M., Corbett J.W. // *J. Org. Chem.* 1997. Vol. 62. P. 201.
160. Lee J.C., Badger A.M., Griswold D.E., Dunnington D., Truneh A., Votta B., White J.R., Young P.R., Bender P.E. // *Ann. NY Acad. Sci.* 1993. Vol. 696. P. 149.
161. Tong L., Pav S., White D.H., Rogers S., Crane K.M., Cywin C.L., Brown M.L., Pargellis C.A. // *Nature Struct. Bio.* 1997. Vol. 4. P. 311.

162. Wilson K.P., McCaff P.G., Hsiao K., Pazhanisamy S., Galullo V., Bemis G.W., Fitzgibbon M.J., Caron P.R., Murcko H.A., Su M.S.S. // *Chem. Bio.* 1997. Vol. 4. P. 423.
163. Gallagher T.F., Seibel G.L., Kassis S., Laydon J.T., Lee J.C., Lee D., Boehm J.C., Bender P.E., Erhard K.F., Krog A.J., Hofmann G.A., Adams J.L. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997. Vol. 5. P. 49.
164. Adams J.L., Boehm J.C., Kassis S., Gorycki P.D., Webb E.F., Hall R., Sorenson M., Lee J.C., Ayrton A., Griswold D.E., Gallagher T.F. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. Vol. 8. P. 3111.
165. Kumar S., McDonnell P.C., Gum R.J., Hand A.T., Lee J.C., Young P.R. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997. Vol. 235. P. 533.
166. Goedert M., Cuenda A., Craxton M., Jakes R., Cohen P. // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. P. 3563.
167. Cohen P. // *Trends Cell. Bio.* 1999. Vol. 7. P. 353.
168. Liverton N.J., Buthcer J.W., Claremon D.A., Bilodeau M.T., inventors. Merck WO-09747618; 1997.
169. Jackson J.R., Bolognese B., Hillegass L., Kassis S., Adams J.L., Griswold D.E., Winkler J.D. // *J. Pharmacol Exp. Ther.* 1998. Vol. 284. P. 687.
170. Frantz B., Klatt T., Pang M., Parsons J., Rolando A., Williams H., Tocci M.J., O'Keefe S.J., O'Neill E.A. // *Biochem.* 1998, Vol. 37. P. 13846.
171. Hanson G.J. // *Exp. Opin. Ther. Patents.* 1997. Vol. 7. P. 729.
172. De Laszlo S.E., Visco D., Agarwal L., Chang L., Chin J., Croft G., Forsyth A., Fletcher D., Frantz B., Hacker C., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. Vol. 8. P. 2689.
173. De Laszlo S.E., Mantlo N.B., Ponticello G.S., Selnick H.G., Liverton N.J., inventors. Merck WO-09705877; 1997.
174. De Laszlo S.E., Mantlo N.B., inventors. Merck WO-09716441; 1997.
175. De Laszlo S.E., Mantlo N.B., inventors. Merck WO-09716426; 1997.
176. De Laszlo S.E., Mantlo N.B., Ponticello G.S., Selnick H.G., Liverton N.J., inventors. Merck WO-09705878; 1997.

177. Hanson G.J., Liao S., inventors. Searle WO-09852941; 1998.
178. Anantanarayan A., Clare M., Collins P.W., Crich J.Z., Devraj R., Flynn D.L., Geng L., Hanson G.J., Koszyk F.J., Liao S., Partis R., Selness S.R., South M.S., Stealey M.A., Weier R.M., Xu X., inventors. Searle WO-09852940; 1998.
179. Anantanarayan A., Clare M., Geng L., Hanson G.J., Partis R., Stealey M.A., Weier R.M., inventors. Searle WO-09852937; 1998.
180. Gallagher T.F., Thompson S.M., inventors. SmithKline Beecham WO-09733883; 1997.
181. Spohr U.D., Malone M.J., Mantlo N.B., inventors. Amgen WO-09824782; 1998.
182. Spohr U.D., Malone M.J., Mantlo N.B., Zablocki J.A., inventors. Amgen WO-09824780; 1998.
183. Zablocki J.A., Tartlton E., Rizzi J.P., Mantlo N.B., inventors. Amgen WO-09822457; 1998.
184. Liverton N.J., Butcher J.W., Clairbone C.F., Claremon D.A., Libby B.E., et al. // *J. Med. Chem.* 1999. Vol. 42. P. 2180.
185. Heimbrook D.C., Huber H.E., Stirdivant S.M., Claremon D., Liverton N.J., Patrick D.R., Selnick H.G., et al. // *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.* 1998. Vol. 39. P. 558.
186. Kulanthaivel P., Hallock Y.F., Boros C., Hamilton S.M., Janzen W.P., Ballas L.M., Loomis C.R., Jiang J.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. Vol. 115. P. 6452.
187. Koide K., Bunnage M.E., Paloma L.G., Kanter J.R., Taylor S.S., Brunton L.L., Nicolaou K.C. // *Chem. Bio.* 1995. Vol. 2. P. 601.
188. Defauw J.M., Murphy M.M., Jagdmann G.E. Jr., Hu H., Lampe J.W., Hollinshead S.P., Mitchell T.J., Crane H.M., Heerding J.M., Mendoza J.S., Davis J.E., Darges J.W., Hubbard F.R., Hall S.E. // *J. Med. Chem.* 1996. Vol. 39. P. 5215.

189. Lai Y.S., Mendoza J.S., Jagdmann G.E. Jr., Menaldino D.S., Biggers C.K., Heerding J.M., Wilson J.W., Hall S.E., Jiang J.B., Janzen W.P., Ballas L.M. // *J. Med. Chem.* 1997. Vol. 40. P. 226.
190. Lai Y.S., Menaldino D.S., Nichols J.B., Jagdmann G.E. Jr., Mylott F., Gillespie J., Hall S.E. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. Vol. 5. P. 2151.
191. Mendoza J.S., Jagdmann G.E. Jr., Gosnell P.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. Vol. 5. P. 2211.
192. Hu H., Hollinshead S.P., Hall S.E., Kalter K., Ballas L.M. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. Vol. 6. P. 973.
193. Crane H.M., Menaldino D.S., Jagdmann G.E. Jr., Darges J.W., Buben J.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. Vol. 5. P. 2133.
194. Heerding J.M., Lampe J.W., Darges J.W., Stamper M.L. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. Vol. 5. P. 1839.
195. Narayana N., Diller T.C., Koide K., Bunnage M.E., Nicolaou K.C., Brunton L.L., Xuong N.H., Eyck L.F.T., Taylor S.S. // *Biochem.* 1999. Vol. 38. P. 2367.
196. Sedlacek H.H., Czech J., Naik R., Kaur G., Worland P., Losiewicz M., Parker B., Carlson B., Smith A., et al. // *Int. J. Oncol.* 1996. Vol. 9. P. 1143.
197. Patel V., Senderowicz A.M., Adrian M., Pinto D. Jr., Igishi T., Raffeld M., Quintanilla-Martinez L., Ensley J.F., Sausville E.A., Gutkind J.S. // *J. Clin. Invest.* 1998. Vol. 102. P. 1674.
198. Drees M., Denny W.A., Roth T., Labonte H., Mayo J., Malspeis L., Grever M., Sausville E.A., Fiebig H.H. // *Clin. Cancer. Res.* 1997. Vol. 3. P. 273.
199. Czech J., Hoffmann D., Naik R., Sedlacek H.H. // *Int. J. Oncol.* 1995. Vol. 6. P. 31.
200. Losiewicz M., Carlson B., Kaur G., Sausville E.A., Worland P. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994. Vol. 201. P. 589.
201. Kaur G., Stetler-Stevenson M., Sebers S., Worland P., Sedlacek H.H., Myers C., Czech J., Naik R., Sausville E.A. // *J. Natl. Cancer. Inst.* 1992. Vol. 84. P. 1736.

202. De Azevedo W.F., Mueller-Dieckmann H.J., Schulze-Gahmen U., Worland P., Sausville E.A., Kim S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. Vol. 93. P. 2735.
203. Rueegg U.T., Burgess G.M. // *Trends Pharmacol. Sci.* 1989. Vol. 10. P. 218.
204. Gescher A. // *Gen. Pharmacol.* 1998. Vol. 31. P. 721.
205. Meyer T., Regenass U., Fabbro D., Alter E., Rösel J., Müller M., Caravatti G., Matter A. // *Int. J. Cancer*. 1989. Vol. 43. P. 851.
206. Utz I., Hofer S., Regenass U., Hilbe W., Thaler J., Grunicke H., Hofmann J. // *Int. J. Cancer*. 1994. Vol. 57. P. 104.
207. Takahashi I., Saitoh Y., Yoshida M., Sano H., Nakano H., Morimoto M., Tamaoki T. // *J. Antibiot.* 1989. Vol. 42. P. 571.
208. Takahashi I., Kobayashi E., Asano K., Yoshida M., Nakano H. // *J. Antibiot.* 1987. Vol. 40. P. 1782.
209. Nomoto H., Nakano H., Takahashi I., Tamaoki T., Tomita F., Kawamoto I., Asano K., Morimoto M., inventors. Kyowa Hakko Kogyo EP-0238011; 1987.
210. Camoratto A.M., Jani J.P., Angeles T., Maroney A.C., Sanders C.Y., Murakata C., Neff N.T., Vaught J.L., Isaacs J.T., Dionne C.A. // *Int. J. Cancer*. 1997. Vol. 72. P. 673.
211. Dionne C.A., Camoratto A.M., Jani J.P., Emerson E., Neff N.T., Vaught J.L., Murakata C., Djakiew D., Lamb J., Bova S., George D., Isaacs J.T. // *Clin. Cancer. Res.* 1998. Vol. 4. P. 1887.
212. Hudkins R.L., Iqbal M., Park C.H., Goldstein J., Herman J., Shek E., Murakata C., Mallamo J.P. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. Vol. 8. P. 1873.
213. Spacey G.D., Uings I.J., Slater M., Hirst S., Bonser R.W. // *Biochem. Pharmacol.* 1998. Vol. 55. P. 261.
214. Jirousek M.R., Gillig J.R., Gonzalez C.M., Heath W.F., McDonald J.H. III, Neel D.A., Rito C.J., Singh U., Stramm L.E. // *J. Med. Chem.* 1996. Vol. 39. P. 2664.

215. Ishii H., Jirousek M.R., Koya D., Takagi C., Xia P., Clemont A., Bursell S.E., Kern T.S., Ballas L.M., Heath W.F., Stramm L.E., Feener E.P., King G.L. // Science. 1996. Vol. 272. P. 728.
216. Inoguchi T., Battan R., Handler E., Sportsman J.R., Heath W., King G.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 11059.
217. Riley D.A., Simpkins N.S., Moffat D. // Tetrahedron Lett. 1999. Vol. 40. P. 3929.
218. Bold G., Frei J., Traxler P., Altmann K.H., Mett H., Stover D.R., Wood J., inventors. Novartis AG WO9835958; 1998.
219. Wood J., Buchdunger E., Cozens R., Hoffman F., Mestan J., Mett H., Mueller M., Roesel J., Schnell C., Stover D.R., Wood-Cook K., Bold G., Frei J., et al. // Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 1998. Vol. 39. P. 96.
220. Bishop A.C., Kung C.Y., Shah K., Witucki L., Shokat K.M., Liu Y. // J. Am. Chem. Soc. 1999. Vol. 121. P. 627.
221. *m*-Nitroacetophenone // Organic Syntheses. 1943. Coll. Vol. 2. P. 434.
222. Беккер Х. Органикум. Том 1 / Х. Беккер, Г. Домшке, Э. Фангхенель, М. Фишер и др. М.: Мир, 1992. – 487 с.