

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

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)

УТВЕРЖДАЮ
Завкафедрой «Химия, химические
процессы и технологии»
_____ Г.И. Остапенко
(подпись) (И.О. Фамилия)
«__» _____ 2018 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение бакалаврской работы

Студент Лисник Глеб Эдуардович

1. Тема Молекулярный докинг производных пиримидина в активный сайт EGFR-киназы
2. Срок сдачи студентом готовой работы: июнь 2018
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 структурные формулы исследованных соединений, графики зависимости площади от концентрации исследуемых соединений, таблицы с экспериментальными и расчетными данными, презентация.
6. Консультанты по разделам Е. Ю. Аношина (аннотация на английском языке)
7. Дата выдачи задания « 22 » декабря 2017 г.

Руководитель выпускной
квалификационной работы

_____ Е. В. Варакина
(подпись) (И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

_____ Г. Э. Лисник
(подпись) (И.О. Фамилия)
(подпись) (И.О. Фамилия)

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

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)

УТВЕРЖДАЮ

Завкафедрой «Химия, химические
процессы и технологии»

_____ Г.И. Остапенко
(подпись) (И.О. Фамилия)

«__» _____ 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН
выполнения бакалаврской работы

Студента Лисника Глеба Эдуардовича

по теме: Молекулярный докинг производных пиримидина в активный сайт EGFR-киназы

Наименование раздела работы	Плановый срок выполнения раздела	Фактический срок выполнения раздела	Отметка о выполнении	Подпись руководителя
Подбор литературных источников и написание раздела «Литературный обзор»	7.03.2018 г.	7.03.2018 г.	Выполнено	
Выполнение экспериментальной части работы	20.05.2018 г.	20.05.2018г.	Выполнено	
Написание раздела «Экспериментальная часть»	31.05.2018 г.	31.05.2018г.	Выполнено	

Написание остальных разделов	02.06.2018 г.	02.06.2018 г	Выполнено	
Верстка работы, проверка научным руководителем	04.06.2018 г.	04.06.2018г.		
Проверка ВКР в системе «Антиплагиат.ВУЗ»	14. 06. 2018г.	14.06.2018г.		
Оформление демонстрационного материала и устного доклада	16.06.2018г.	16.06.2018г.		
Предварительная защита	16.06.2018г.	16.06.2018г.		
Корректировка бакалаврской работы	23.06.2018г.	23.06.2018г.		
Верстка и переплетение пояснительной записки				
Защита бакалаврской работы	25.06.2018	25.06.2018		

Руководитель выпускной квалификационной работы

(подпись)

Е. В. Варакина

(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

(подпись)

Г. Э. Лисник

(И.О. Фамилия)

АННОТАЦИЯ

Целью этой выпускной работы является поиск новых структурных типов ингибиторов EGFR-киназы и их конструирование в Schrödinger.

В работе описан теоретический подход к построению производных пиримидина. Была построена виртуальная комбинаторная библиотека соединений. Был проведен молекулярный докинг стандартной точности (SP) и дополнительной точности (XP), а также был проведен индуцированный докинг. Проанализировали полученные результаты молекулярного докинга и оценили относительную аффинность лигандов методом MM/GBSA.

На основании полученных данных было найдено более 20 высокоаффинных ингибиторов, рекомендованных к синтезу.

ABSTRACT

The title of the graduation work is “Molecular docking of pyrimidine derivatives into the active site of EGFR-kinase”

The aim of this work is to search for new structural types of EGFR kinase inhibitors and their design in Schrödinger software.

The paper describes a theoretical approach to the construction of pyrimidine derivatives. A virtual combinatorial library of chemical compounds was built. A molecular docking of standard precision (SP) and extra precision (XP), and an induced-fit docking were performed. The results of molecular docking were analyzed and the relative affinity of the ligands was estimated by MM / GBSA method.

The graduation work consists of an introduction, two chapters, a conclusion, list of 105 references, all of which are foreign sources. The text of the work contains 8 figures, 3 tables and 6 schemes.

The first chapter describes the docking methods. The second chapter describes the software used for docking.

The results show that more than 20 high-affinity inhibitors recommended for synthesis were found basing on the data obtained.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение	7
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1 Введение	8
1.2 Третье поколение ингибиторов	11
1.2.1 Rociletinib (CO1686)	11
1.2.2 Osimertinib (AZD9291)	13
1.2.3 Olmutinib (HM61713)	17
1.2.4 Nazartinib (EGF816)	19
1.2.5 Naquotinib (ASP8273)	21
1.2.6 PF06747775	22
1.2.7 Avitinib (AC0010)	23
1.2.8 Brigatinib (AP26113)	24
1.3 Механизм резистентности к ингибиторам третьего поколения	26
1.3.1 Мутация EGFR L718Q	26
1.3.2 Мутация L718Q, L844V и C797S	27
1.3.3 Мутация C797S	27
1.3.3.1 Мутация C797S вызывает резистентность к Osimertinib (AZD9291)	27
1.3.3.2 Мутация C797S вызывает резистентность к Olmutinib (HM61713)	28
1.3.3.3 Цис- и Транс- C797S	29
1.3.4 Усиление HER2 и MET сопровождается резистентностью к Osimertinib (AZD9291)	30
1.3.5 RAS-сигнальная зависимость Osimertinib (AZD9291)	31
1.4 Открытие аллостерических ингибиторов C797S четвертого поколения ...	31
1.5 U-Y Аллостерическая стратегия борьбы с резистентностью C797S EGFR .	33
1.6 Заключение и перспективы на будущее	35
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	37
2.1 Построение виртуальной комбинаторной библиотеки	37
2.2 Высокопроизводительный молекулярный докинг	52
2.3 Индуцированный молекулярный докинг	68
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	82

3.1	Подготовка комбинаторной библиотеки.	82
3.2	Подготовка молекулы белка.	82
3.3	Молекулярный докинг	82
3.4	Вычисление Prime MM/GBSA.	83
	Заключение	84
	Список используемой литературы	85

Принятые сокращения

В настоящей работе применяют следующие сокращения и термины:

АТФ	аденозинтрифосфат
EGFR	рецепторы эпидермального фактора роста
TKI	ингибиторы тирозинкиназы
НМРЛ	немелкоклеточный рак легких
WT EGFR	рецепторы эпидермального фактора роста дикого типа
IC ₅₀	Концентрация 50% ингибирования
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
VCL	Виртуальная комбинаторная библиотека
MM/GBSA	метод молекулярной механики с обобщенной поверхностью
SP	протокол стандартной точности
XP	протокол дополнительной точности

Введение

Одной из важнейших задач современной медицинской химии является поиск низкомолекулярных органических соединений, несущих положительный фармакологический эффект. Ярким примером изыскания подобного рода веществ является поиск высокоэффективных ингибиторов протеинкиназ, эффективных агентов для лечения EGFR-мутантного немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ). По прошествии определённого периода времени ингибиторы протеинкиназ теряют свою активность вследствие возникновения резистентности.

Поэтому возникает необходимость поиска новых ингибиторов EGFR-киназ путём осуществления молекулярного моделирования и последующего молекулярного докинга с киназой.

Производные 4-амино-5-цианопиримидина обладают высокой биологической активностью, поэтому они были выбраны для молекулярного докинга.

Цель работы:

Установить основные структурные закономерности, возникающие между базовым скаффолдом и структурой белка, для конструирования на основании полученных данных высокоаффинных лигандов.

Задачи:

1. Построение виртуальной комбинаторной библиотеки структур производных 4-амино-5-цианопиримидина;
2. Проведение двух протоколов молекулярного докинга для данной библиотеки структур: стандартной точности (SP) и дополнительной точности (XP);
3. Проведение индуцированного молекулярного докинга;
4. Анализ полученных результатов молекулярного докинга и оценка относительной аффинности лигандов методом MM/GBSA.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Введение

Ингибиторы эпидермального фактора роста (EGFR) тирозинкиназы (TKI) gefitinib, erlotinib и afatinib эффективны для лечения EGFR-мутантного немелкоклеточного рака легких (НМРЛ)[1-5]. Хотя большинство пациентов с EGFR-мутантным НМРЛ реагируют на эти методы лечения, ответы не являются постоянными, и у пациентов обычно развивается резистентность после одного года лечения[6]. Существует несколько механизмов приобретенной резистентности к erlotinib, включая развитие точечной мутации гейткипера T790M, которая не даёт TKI эффективно ингибировать EGFR[7-11] и наблюдается в более чем 50% устойчивых биопсий[12-14].

Ингибиторы EGFR второго поколения, включая afatinib (BIBW2992) и dacomitinib (PF 00299804), являются необратимыми ингибиторами EGFR, которые связываются с Cys797 и были показаны в доклинических экспериментах для эффективного ингибирования EGFR с активирующими мутациями (делеция 19 экзона или L858R), а также с мутациями сопротивления T790M[15-17]. Однако, их активность у пациентов с резистентным к erlotinib раком, укрывающими T790M, была минимальной[18,19]. Расхождение между лабораторными и клиническими результатами, вероятно, связано с плохим терапевтическим окном. Эти препараты одинаково эффективны против EGFR дикого типа и EGFR T790M, и поэтому токсичность, возникающая в результате ингибирования EGFR дикого типа (сыпь и диарея), исключает использование доз, которые необходимы для эффективного подавления T790M[20].

Совсем недавно были разработаны ингибиторы EGFR третьего поколения, среди которых WZ4002, CO1686, AZD9291 и EGF816, для мутантного EGFR, содержащего T790M[21-23]. Этот класс ингибитора также ковалентно связывается с Cys797 и в значительной степени сохраняет WT

EGFR, тем самым снижая токсичность и позволяя использовать дозы, полностью подавляющие T790M. Это большое терапевтическое окно, вероятно, учитывает более 50% ответов, наблюдаемых в клинических испытаниях с CO1686 и AZD9291 в резистентных к erlotinib, T790M-положительных НМРЛ (рис. 1)[24].

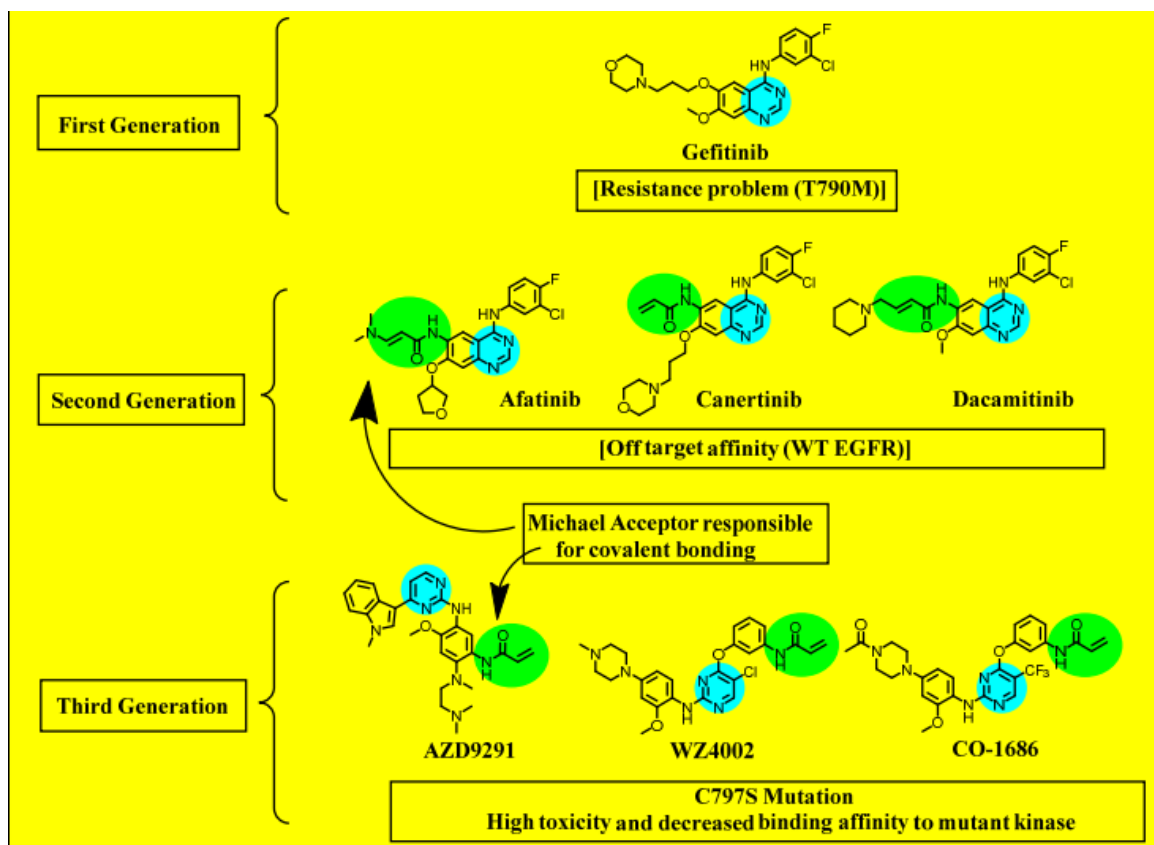


Рисунок 1. Ингибиторы EGFR первого, второго и третьего поколений

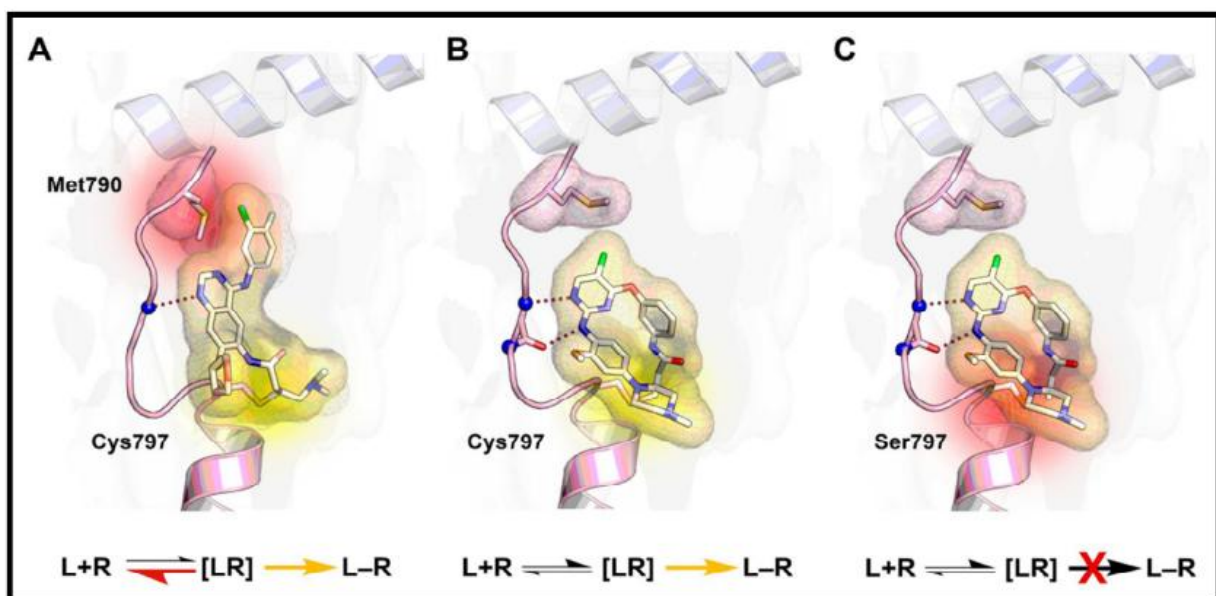


Рис.2 Вид связывания ковалентных ингибиторов тирозинкиназы EGFR

А) Второе поколение (Afatinib) связывается с EGFR T790M

В) Ингибиторы третьего поколения (WZ4002) избегают стерического конфликта с Met790 и, следовательно, достигают полного заполнения рецептора

С) Мутация C797S опосредует устойчивость к необратимым лекарственным средствам, поскольку менее нуклеофильная боковая цепь серина не может образовать ковалентную связь в физиологическом состоянии.

Основываясь на этих многообещающих результатах, оба препарата получили FDA, «обозначение прорывной терапии», и этот класс ингибиторов находится на грани широкого внедрения для лечения этой группы пациентов[25]. Однако, как и в соединениях первого и второго поколений, возникла резистентность: появились недавние сообщения о мутации C797S или о потере мутации T790M в образцах ДНК без клеточной плазмы у пациентов, у которых развилась резистентность, и второй отдельный отчет о мутации C797S в образцах биопсии от одного пациента (Рисунок 2)[26,27]. Кроме того, исследования с линиями клеток третьего поколения показали, что аллельный контекст активирующих гейткippers и мутаций C797S влияет на чувствительность к трем поколениям ингибиторов без EGFR TKI самостоятельно или в комбинации, способных подавлять активность, когда мутация в цис, как показано на рисунке 2[28]. Эти данные свидетельствуют о том, что существует потребность в лекарствах, которые могут преодолеть препятствие устойчивости EGFR (C797S) в немелкоклеточном раке легких (НМРЛ). В этом обзоре обобщены ингибиторы третьего поколения, их механизм резистентности и новейшая разработка по обнаружению TKI EGFR четвертого поколения и аллостерических стратегий U-Y для борьбы с резистентностью EGFR C797S проблема положения.

1.2 Третье поколение ингибиторов

Третьим поколением TKI, таких как osimertinib (AZD9291), rociletinib (CO1686), HM61713, EGF816 и ASP8273, являются мутантные селективные и EGFR-дикие типы, сохраняющие чувствительность к EGFR, а также T790M EGFR (таблица 1)[29]. Кроме того, они оказывают очень низкое ингибирующее действие на WT EGFR, таким образом преодолевая ограничение токсичности, наблюдаемое при использовании TKI первого и второго поколения EGFR[29]. WZ4002 был одним из ранних исследованных соединений.

In vitro WZ4002 был в 30-100 раз сильнее против EGFR T790M и в 100 раз менее сильным против WT EGFR, и аналогичная активность была замечена *in vivo* с использованием моделей мышинного легкого T790M. WZ4002 в настоящее время не находится в клиническом развитии[30].

1.2.1 Rociletinib (CO1686)

Rociletinib, также известный как AVL301 и CO1686, представляет собой орально доступную небольшую молекулу, необратимый ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с потенциальной противоопухолевой активностью. EGFR-ингибитор CO1686 связывает и ингибирует мутантные формы EGFR, включая T790M, тем самым приводя к гибели устойчивых опухолевых клеток. По сравнению с другими ингибиторами EGFR, CO1686 ингибирует T790M, вторичную приобретенную резистентную мутацию, а также другие мутантные EGFR и может иметь терапевтические преимущества в опухолях с опосредованной T790M резистентностью к другим ингибиторам тирозинкиназы EGFR[31].

Он имеет 22-кратную селективность по WT EGFR. В клеточных линиях НМРЛ, содержащих мутации EGFR, rociletinib демонстрирует следующий клеточный pEGFR IC₅₀: 62 нМ в NCI-1975 (L858R / T790M), 187 нМ в HCC827 (делеция 19 экзона), 211 нМ в PC9 (делеция 19 экзона). В клеточных

линиях, экспрессирующих WT EGFR, клеточный pEGFR IC₅₀ составляет: > 4331 нМ в A431, > 2000 нМ в NCIH1299 и > 2000 нМ в NCI-H358[29,30].

В исследовании фазы I / II (TIGER-X) rociletinib вводили пациентам с мутантным НМРЛ с EGFR, у которых было прогрессирование заболевания во время лечения с предыдущей линией терапии EGFR ТКИ. Исследование фазы I было исследованием эскалации дозы для оценки безопасности профиля побочных эффектов и фармакокинетических свойств rociletinib, а исследование фазы II было расширением для оценки эффективности[32]. «Позитивность» T790M была подтверждена до регистрации в фазе II. В дозе 500 мг BID объективная частота ответа в 243 централизованно подтвержденных тканях у пациентов с положительным результатом T790M составляла 60%, а показатель контроля заболевания составлял 90%. Rociletinib также показал активность в центрально подтвержденных «отрицательных» пациентах T790M с общей частотой ответа 37%. Общим дозозависимым побочным явлением была гипергликемия 3-го уровня, встречающаяся у 17% пациентов в дозе 500 мг BID. Пролонгация QTc 3 степени наблюдалась у 2,5% пациентов в той же дозе. Связанные с лечением побочные эффекты, ведущие к прекращению приема лекарств, наблюдались только у 2,5% пациентов с 500 мг BID[31,32].

Гидробромид rociletinib был зарегистрирован в США для лечения мутантного рака легкого (НМРЛ), но был отклонен FDA в апреле 2016 года. Обозначение прорывной терапии было назначено FDA для этого показания в 2014 году[29-32].

Баевский и другие сообщили о синтезе rociletinib (схема 1), где происходила реакция 2,4-дихлор-5-трифторметилпиримидином (1) с защищенным N-Вос 1,3-диаминобензолом (2) в основном состоянии (n-BuOH, DIPEA). С промежуточного соединения (3) снимают защиту с образованием промежуточного соединения (4) с использованием кислоты в присутствии TFA. Соединение (4), ацилированное акрилоилхлоридом (5), с

образованием промежуточного соединения (6), которое подвергли взаимодействию с 1- (4- (4-амино-3-метоксифенил) пиперазин-1-ил) этан-1-он (7) с образованием rociletinib (8)[33].

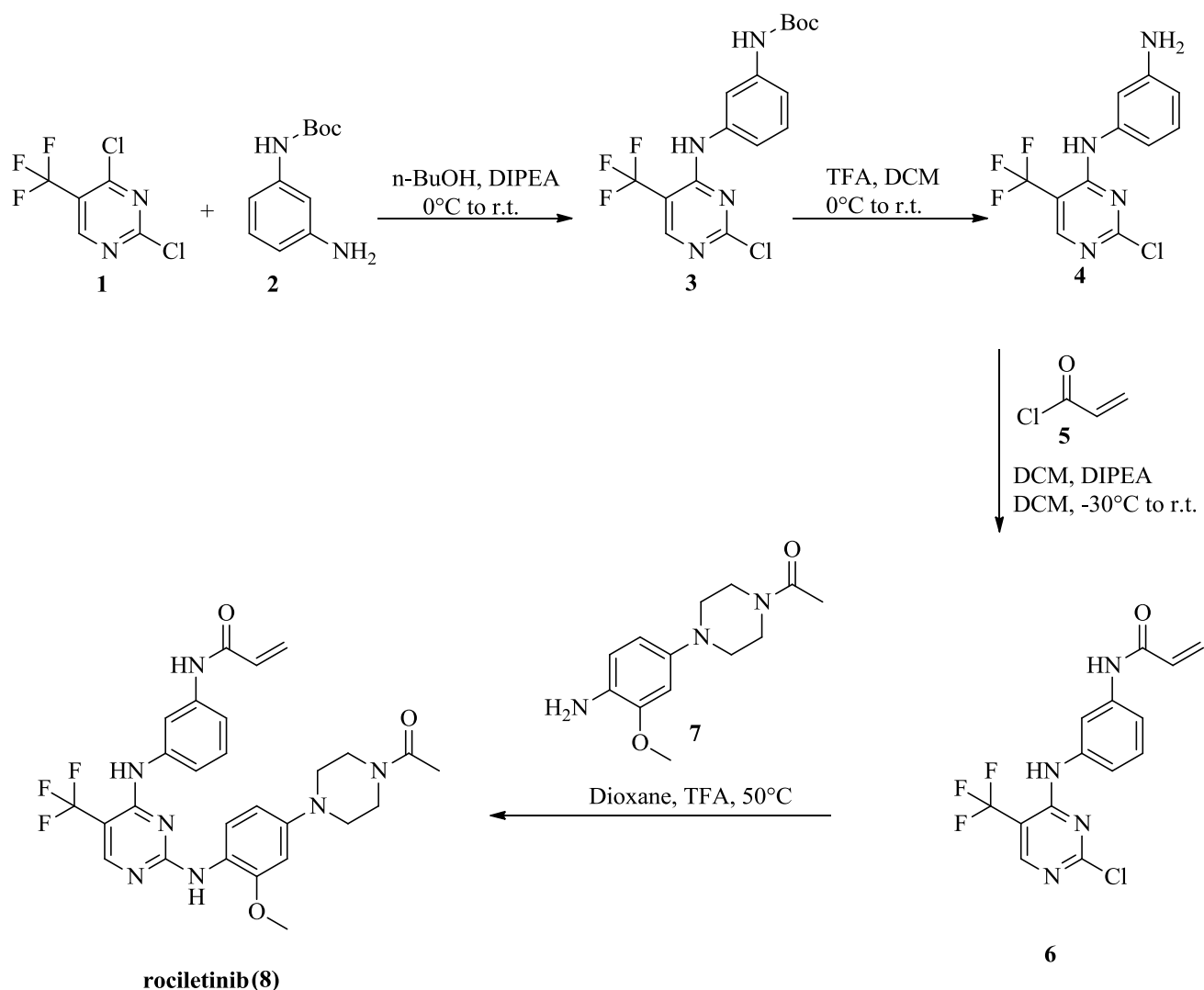


Схема 1. Синтез Rociletinib (роцилетиниб)

1.2.2 Osimertinib (AZD9291)

Osimertinib (ранее известный как mereletinib или AZD9291, торговое название Tagrisso) представляет собой препарат ингибитора тирозинкиназы рецептора третьего поколения (EGFR) тирозинкиназы (TKI), разработанный AstraZeneca Pharmaceuticals для мутированных раковых заболеваний EGFR.

Это соединение моноанилинопиримидина, которое структурно отличается от других ТКИ третьего поколения EGFR (таблица 1). Osimertinib нацеливает остаток цистеина-797 в участок связывания АТФ-киназы EGFR необратимо через образование ковалентной связи[29,30]. Он структурно отличается от ТКИ EGFR первого и второго поколений. Это соединение является необратимым мутантно-селективным EGFR ТКИ (делеция 19 экзона: EGFR $IC_{50} = 12,92$ нМ, L858R / T790M EGFR $IC_{50} = 11,44$ нМ, EGFR дикого типа $IC_{50} = 493,8$ нМ)[29,30]. В настоящее время это единственный утвержденный EGFR ТКИ для пациентов с метастатическим EGFR T790M мутационно-положительным НМРЛ[29,30]. В обеих доклинических, а также клинических условиях наблюдались два циркулирующих активных метаболита, аналог десметилметила AZ5104 и N-деметилированный аналог AZ7550[29,30]. По сравнению с osimertinib, AZ5104 показал лучшую эффективность против активирующего мутанта (IC_{50} 2 нМ в клеточной линии PC9) и двойного мутанта (IC_{50} 2 нМ в клеточной линии H1975) и IC_{50} 33 нМ в клеточной линии LoVo с WT EGFR. AZ7550 показал очень сходную активность (IC_{50} 26 нМ в клеточной линии PC9, IC_{50} 45 нМ в клеточной линии H1975) и профиль селективности (WT EGFR, IC_{50} 786 нМ в клеточной линии LoVo) до osimertinib [37-40]. В фармакокинетическом исследовании на мышах, osimertinib продемонстрировал хорошую биодоступность, умеренный клиренс и широкое распределение ткани с периодом полураспада 3 ч после однократной пероральной дозы 25 мг / кг. Период полураспада циркулирующих метаболитов в плазме был аналогичен osimertinib, а общий уровень воздействия (AUC) составил приблизительно 68% и 33% по сравнению с исходниками для AZ7550 и AZ5104 соответственно. Интересно отметить, что уровень метаболитов (AZ7550 и AZ5104) относительно osimertinib значительно ниже у человека, чем у мыши[29,30].

В ноябре 2015 года после Приоритетного обзора FDA США предоставило ускоренное одобрение osimertinib для лечения

метастатического эпидермального фактора роста фактора роста (EGFR) T790M мутационно-позитивного немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), как было установлено одобренным FDA-тестом, который прогрессировал после или после терапии ингибитором тирозинкиназы EGFR (TKI)[29,30].

В одобрении FDA были сделаны ссылки на два клинических испытания, в которых мутация EGFR T790M была подтверждена тестом мутации Cobas EGFR; osimertinib давали как 80 мг один раз в день. Европейская комиссия (ЕС) дала аналогичное одобрение в феврале 2016 года после двух исследований Фазы II (Расширение AURA и AURA2). Osimertinib сравнивается с химиотерапией в исследовании III фазы AURA3[29,30,41-43].

Баттерворт и другие сообщили о синтезе osimertinib, как показано на схеме 2, где 1H-индол (9) подвергают взаимодействию с 1,2-дихлорэтаном (10) в присутствии метилмагнийбромида с получением 3-(2-хлорпиримидин-4-ил)-1H-индола (11). Метилирование 11 с использованием иодметана давало 3-(2-хлорпиримидин-4-ил)-1-метилиндол (12). Дальнейшая реакция 3-(2-хлорпиримидин-4-ил)-1-метилиндола (12) и 4-фтор-2-метокси-5-нитроанилина (13) с использованием гидрата 4-метилбензолсульфоновой кислоты дает N-(4-фтор-2-метокси-5-нитрофенил)-4-(1-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-амин (14) в виде желтого твердого вещества. N1, N1, N2-триметилэтан-1,2-диамин (15) добавляли к суспензии N-(4-фтор-2-метокси-5-нитрофенил)-4-(1-метилиндол-3-ил)пиримидина-2-амин (14) и DIPEA, эту смесь нагревали в микроволновой печи и очищали флэш-хроматографией на силикагеле с получением N'-(2-диметиламиноэтил)-2-метокси-N'-метил-N-[4-(1-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил]-5-нитробензол-1,4-диамина (16).

Восстановление N'-(2-диметиламиноэтил)-2-метокси-N'-метил-N-[4-(1-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил]-5-нитробензол-1,4-диамина (16) с помощью хлорида железа и аммония, получали N1-(2-диметиламиноэтил)-5-метокси-N1-метил-N4-[4-(1-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил]бензол-1,2,4-триамина (17). Акрилоилхлорид в DCM добавляли к перемешиваемому

раствору N1-(2-диметиламиноэтил)-5-метокси-N1-метил-N4-[4-(1-метилиндол-3-ил) пиримидин-2-ил] бензол- 1,2,4-триамин (17) и DIPEA в DCM дают osimertinib (18)[43].

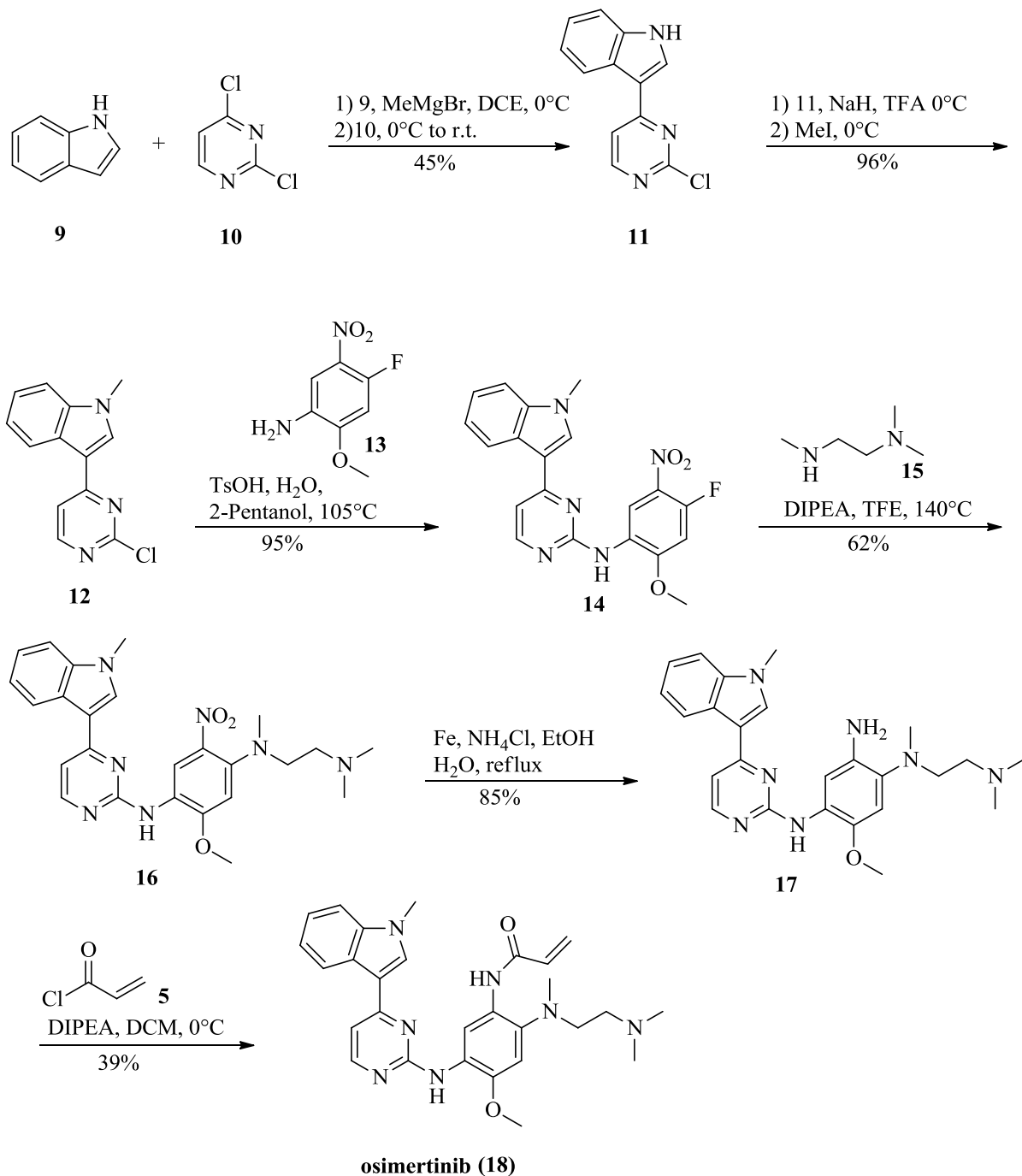


Схема 2. Синтез Osimertinib

1.2.3 Olmutinib (HM61713)

HM61713 является необратимым ингибитором киназы и ковалентно связывается с остатком цистеина вблизи киназного домена мутантного EGFR. HM61713 имеет период полувыведения более 24 ч для ингибирования EGFR [29,30,44-48]. HM61713 вызывал сильное ингибирование в клеточных линиях H1975 (L858R и T790M) и HCC827 (делеция 19 экзона). HM61713 обладает низкой эффективностью для клеточной линии HCLX H358, содержащей EGFR дикого типа [29,30]. В исследованиях *in vivo* моделей ксенотрансплантатов с трансплантатами H1975 и HCC827 HM61713 был активен против опухолей без каких-либо побочных эффектов [29,30].

Olmutinib был одобрен Корейским министерством по безопасности пищевых продуктов и наркотиков (MFDS) в мае 2016 года [53,54]. Первоначально он был обнаружен Ханми, а затем лицензирован для Boehringer Ingelheim в области развития и прав на глобальную коммерциализацию, за исключением Южной Кореи, Китая и Гонконга в июле 2015 года, и лицензировал ZAI Lab исключительные права в Китае (включая Гонконг и Макао) в ноябре 2015 года [55]. Olmutinib является ингибитором тирозинкиназы EGFR для лечения пациентов с мутационно-позитивным немелкоклеточным раком легкого с локально продвинутым или метастатическим рецептором эпидермального фактора роста T790M [56].

Ча и другие сообщили о синтезе olmutinib (схема 3) [57]. Соединение (19) подвергают реакции конденсации с мочевиной (20) в органическом растворителе (например, N,N-диметилформамиде) с получением конденсированного соединения (21). Полученное таким образом соединение (21) представляет собой процесс кипячения с обратным холодильником в присутствии хлорирующего агента (оксихлорида фосфора или тионилхлорида) с получением хлорированного соединения (22). Соединение (22) с последующей реакцией в органическом растворителе в присутствии неорганического основания с 3-нитрофенолом (23) при температуре от

комнатной температуры до 100°C, индуцируя замещение в положении С-4 соединения (24). Соединение (24), подвергнутое взаимодействию с 4-(4-метилпиперазин-1-ил)анилином (25) в спиртовом растворе или органической кислоте в присутствии палладиевого катализатора, дало соединение (26). Соединение (26) подвергали восстановлению с железом, для получения соединения (27). Соединение анилина (27) подвергают реакции с акрилоилхлоридом (5) в органическом растворителе при низкой температуре, давая olmutinib (28)[57].

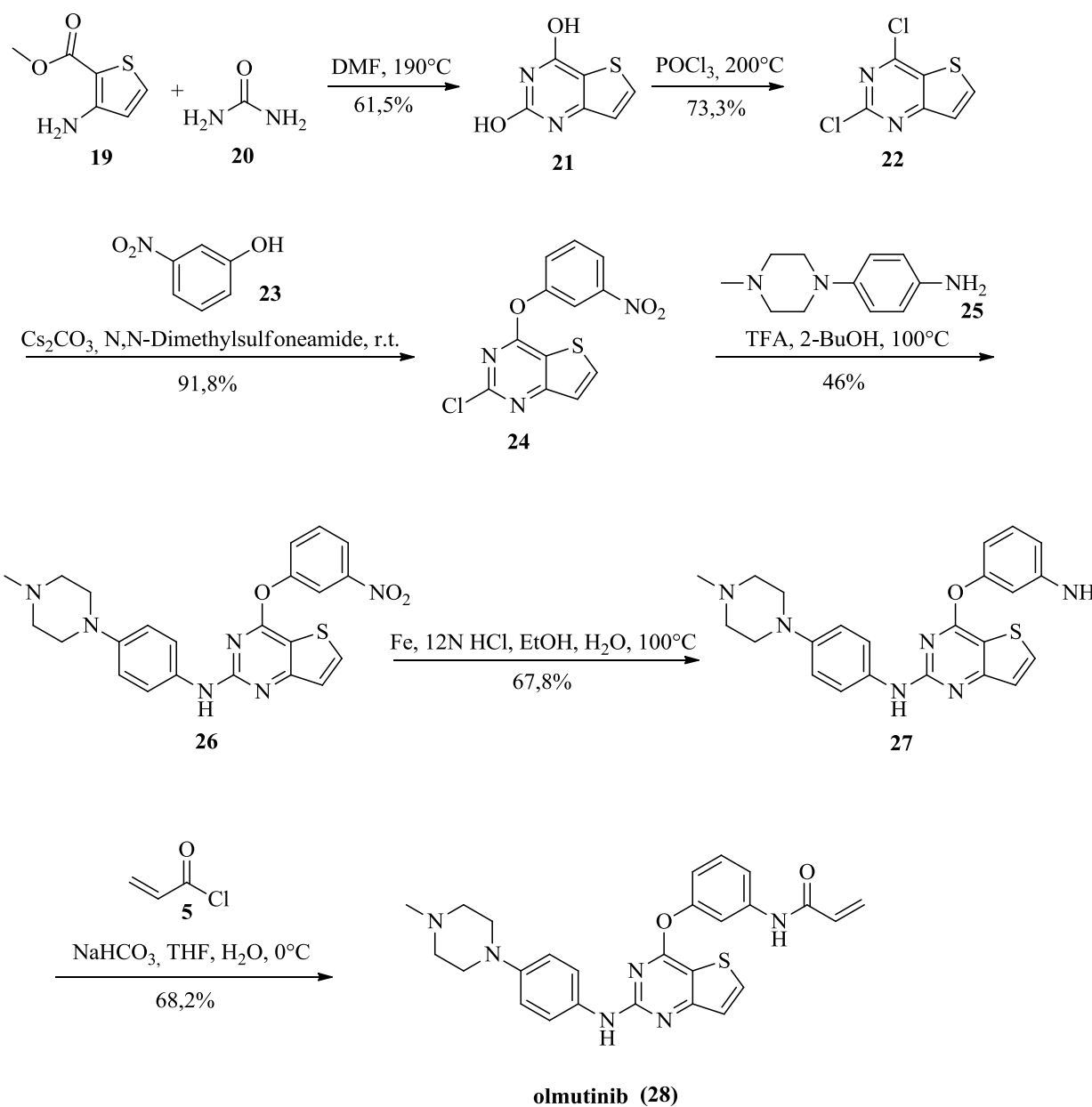


Схема 3. Синтез Olmutinib

1.2.4 Nazartinib (EGF816)

Nazartinib, также известный как EGF816, представляет собой перорально доступное, необратимое, третьего поколения, мутантно-селективный ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с потенциальной противоопухолевой активностью[58]. EGF816 ковалентно связывает и ингибирует активность мутантных форм EGFR, включая мутант EGFR T790M, тем самым предотвращая опосредованную EGFR сигнализацию[59]. Это может приводить к гибели клеток и ингибировать рост опухоли в EGFR-сверхэкспрессирующих опухолевых клетках. EGF816 предпочтительно ингибирует мутированные формы EGFR, включая T790M, вторично приобретенную резистентную мутацию и может обладать терапевтическими преимуществами в опухолях с резистентностью T790M по сравнению с другими ингибиторами тирозинкиназы EGFR[60]. Целевые профили EGF816 предполагают, что он представляет собой альтернативный и лучший вариант терапии против T790M мутации[29,30]. EGF816 (Novartis Pharmaceuticals) имеет доклиническую активность, нацеленную на сенсibiliзирующие мутанты EGFR, а также мутанты T790M с 60-кратной селективностью по сравнению с WF EGFR[29,30]. EGF816 находится в клинических испытаниях фазы II Novartis для лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) в сочетании с nivolumab, а также в клинических испытаниях фазы I / II для лечения солидных опухолей[61-64].

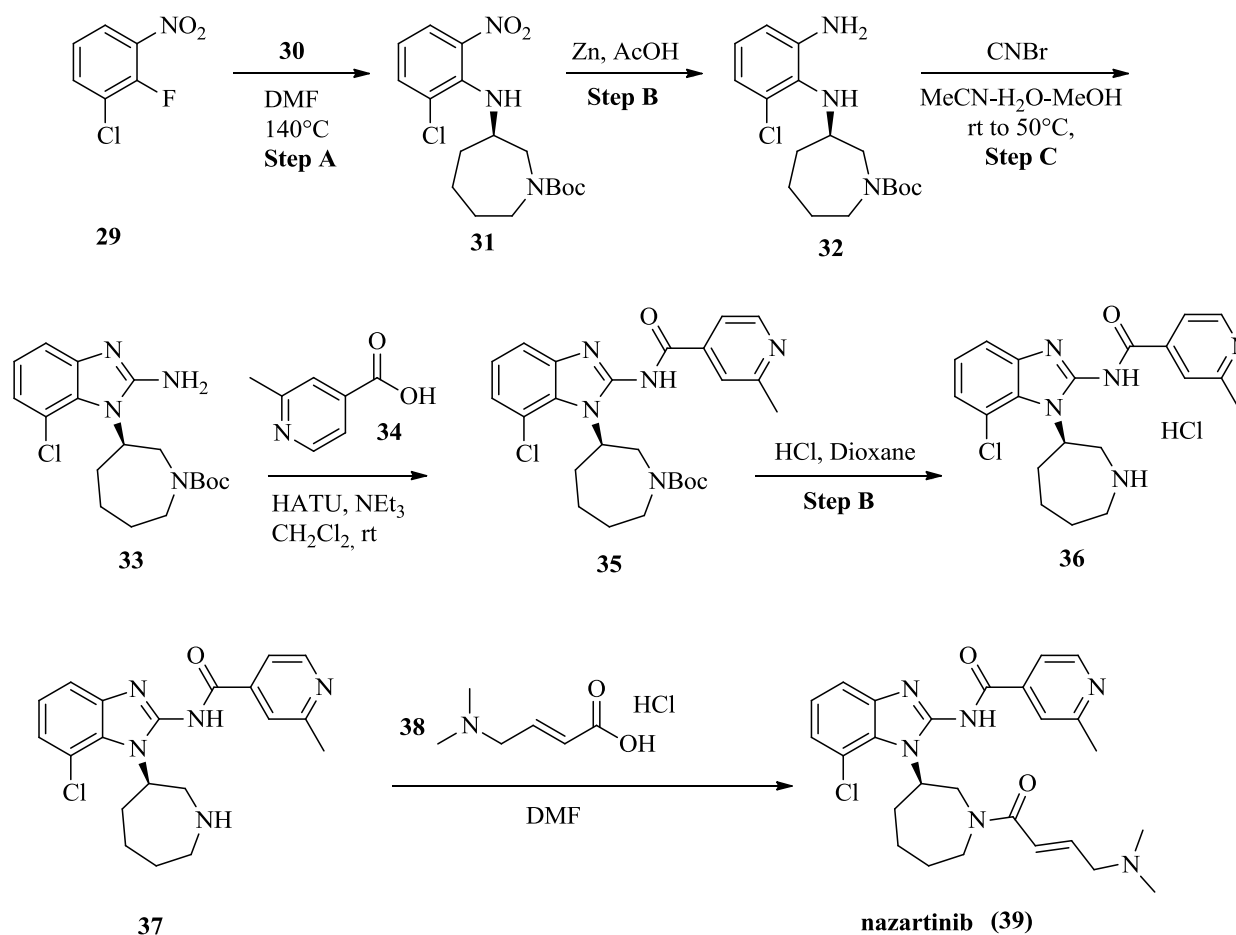


Схема 4. Синтез Nazartinib.

Лелаис и другие сообщили о синтезе nazartinib, как указано на схеме 4[65]. 1-Хлор-2-фтор-3-нитробензол (29) взаимодействует с Вос-защищенным азокан-3-амином (30) в ДМФА с получением защищенного Вос (R) -N-(2-хлор-6-нитрофенил) азепан-3-амина (31). Смесь защищенного Вос (R)-N-(2-хлор-6-нитрофенил) азепан-3-амина (31) восстанавливали с использованием Zn в AcOH с получением (R)-трет-бутил-3-((2-амино-6-хлорфенил)амино)азепан-1-карбоксилата (32), который далее подвергли взаимодействию с получением трет-бутил (R) -3-(2-амино-7-хлор-1H-бензо[d]имидазол-1-ил)азепан-1-карбоксилата (33).

2-метилизоникотиновую кислоту (34) добавляют к 33 с использованием SATU в качестве катализатора с получением (R) -тетбутил-3-(7-хлор-2-(2-метилизоникотинамидо)-1H-бензо[d]имидазол-1-ил)азепан-1-карбоксилата (35) в виде светло-желтой пены. Раствор 35 в MeOH обрабатывали HCl в

диоксане для снятия защиты с Вос с получением указанного в заголовке соединения (36). К соединению 37 в ДМФ добавляли гидрохлорид 4-(диметиламино)-бут-2-еновой кислоты (38) с получением указанного в заголовке соединения nazartinib (39).

1.2.5 Naquotinib (ASP8273)

ASP8273 представляет собой еще одну небольшую молекулу, необратимый ингибитор ТКИ, который ингибирует киназную активность мутаций EGFR, включая T790M, с ограниченной активностью против EGFR дикого типа (WT) НМПЛ.[29]. В ферментативных и клеточных анализах *in vitro* ASP8273 оценивали против EGFR мутанты (L858R, делеция 19 экзона, L858R / T790M и del19 / T790M) и WT EGFR.[30] ASP8273 были обнаружены с помощью масс-спектрометрии для ковалентного связывания с мутантным EGFR (L858R / T790M) через остаток цистеина 797 в киназном домене EGFR с длительным ингибированием фосфорилирования EGFR в течение 24 часов. В клеточных линиях НМПЛ, содержащих вышеуказанные EGFR, ASP8273 имел значения IC_{50} от 8 до 33 нМ к мутантам EGFR, более сильно, чем у WT EGFR (значение IC_{50} 230 нМ). В моделях ксенотрансплантата мыши ASP8273 индуцировал полную регрессию опухолей после 14 дней лечения[66]. Было показано, что ASP8273 подавляет сигнальный путь через ERK и Akt. ASP8273 даже показал активность в клеточной линии мутантного EGFR, которая устойчива к другим ТКИ EGFR, включая AZD9291 и CO1686.[67]. Поэтому ASP8273 представляет собой уникальный агент, активный в НМПЛ с EGFR

Мутация T790M. ASP-8273 находится в клинических испытаниях III фазы для перорального лечения рецептора эпидермального фактора роста фактора роста (EGFR) с немелкоклеточным раком легкого (НМПЛ) .[68] Синтез naquotinib еще не раскрыт.

1.2.6 PF06747775

PF06747775 является еще одним ингибитором малых молекул EGFR T790M. Эта молекула изучается в клинических испытаниях фазы I / II (NCT02349633) у продвинутых пациентов с НМРЛ с мутациями EGFR (del 19 или L858R ± T790M)[29]. Агент будет вводиться в виде непрерывного ежедневного дозирования в 21-дневном цикле. Начальная доза PF06747775 будет составлять 25 мг РО ежедневно. Пациент, которому требуется пройти курс лечения, должен подтвердить сенсбилизирующие мутации EGFR и развился в предыдущем EGFR TKI. В компоненте II фазы всем пациентам необходимо подтвердить мутацию T790M.69 Behenna и другие сообщили о синтезе PF06747775 (схема 5)[70,71].

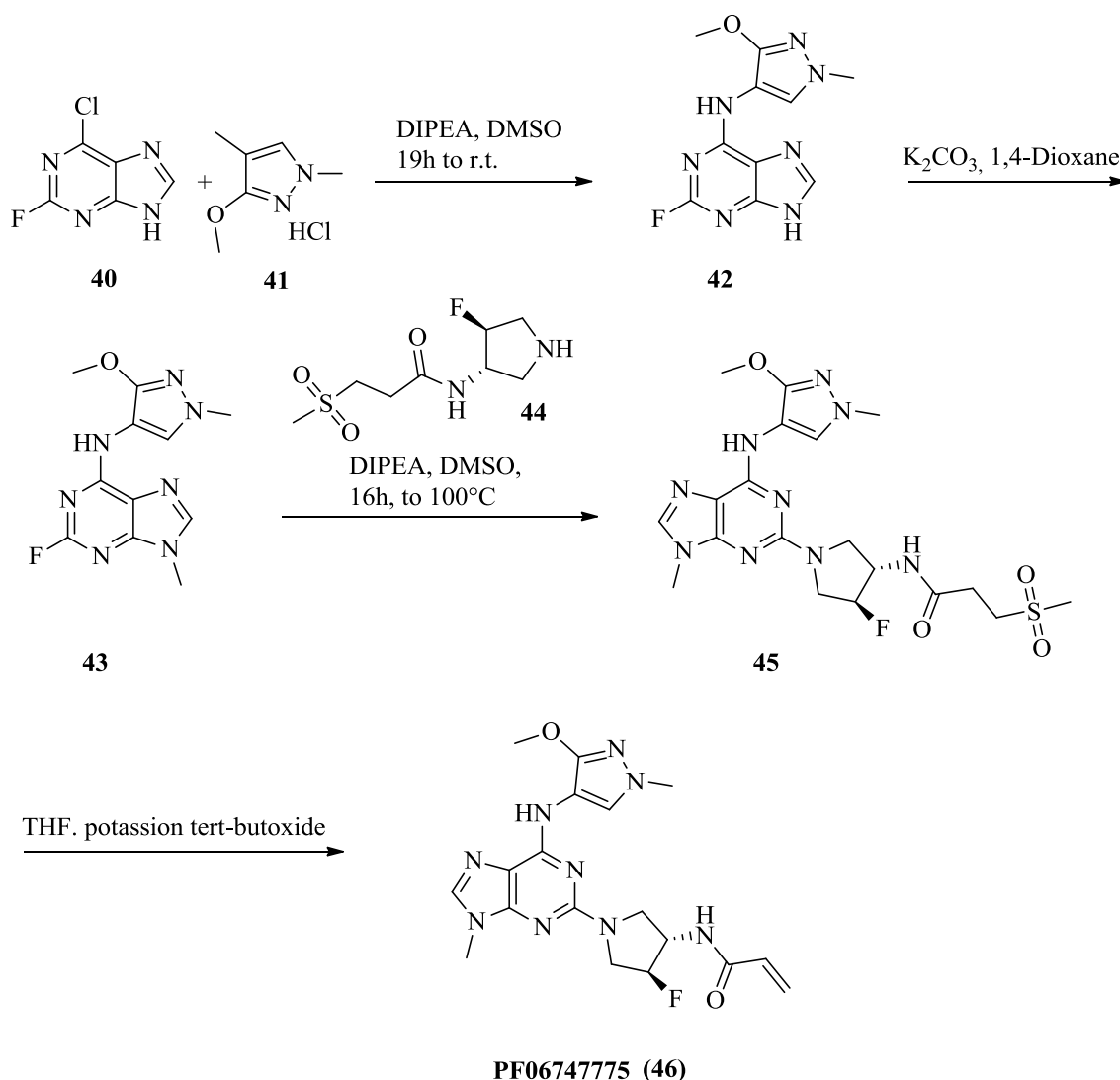


Схема 5. Синтез PF06747775

Суспензию гидрохлорида 6-хлор-2-фтор-9Н-пурина (40), 3-метокси-1-метил-1Н-пиразол-4-амин (41) и N, N-диизопропилэтиламина в ДМСО перемешивали при комнатной температуре с получением указанного в заголовке соединения (42). Метилирование 2-фтор-N- (3-метокси-1-метил-1Н-пиразол-4-ил) -9Н-пурин-6-амин (42) проводили с использованием диметилсульфата в 1,4-диоксане с получением указанного в заголовке соединения 2-фтор-N- (3-метокси-1-метил-1Н-пиразол-4-ил) -9-метил-9Н-пурин-6-амин (43). К перемешиваемой суспензии (43) и N - ((3R, 4R) -4-фторпирролидин-3-ил)-3-(метилсульфонил) пропанамид (44) в ДМСО добавляли N,N-диизопропилэтиламин с получением промежуточного соединения 45. Затем реакцию смесь обрабатывали трет-бутоксидом калия с получением указанного в заголовке соединения (PF-06747775) (46)[70,71].

1.2.7 Avitinib (AC0010)

Avitinib находится в фазе I / II клинических испытаний АСЕА Biosciences (Ханчжоу) для лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ)[72] . Avitinib, также известный как AC0010 или AC0010MA, является перорально доступным, необратимым рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) с потенциальной противоопухолевой активностью[72]. При пероральном введении avitinib ковалентно связывает и ингибирует активность мутантных форм EGFR, включая резистентный к лекарственным средствам Т790М EGFR-мутант, который предотвращает передачу сигналов, опосредованную мутантными формами EGFR. Это может приводить к гибели клеток и ингибировать рост опухоли в опухолевых клетках, модифицированных EGFR. EGFR, рецептор тирозинкиназа, которая мутируется во множестве видов рака, играет ключевую роль в опухолевых клетках пролиферации и опухолевой васкуляризации[73]. Поскольку этот агент является селективным по отношению к мутантным формам EGFR, его

профиль токсичности может быть уменьшен по сравнению с неселективными ингибиторами EGFR, которые также ингибируют EGFR дикого типа[73]. Синтез avitinib еще не раскрыт.

1.2.8 Brigatinib (AP26113)

Brigatinib, также известный как AP-26113, представляет собой активный, мощный и селективный ингибитор двойного ALK / EGFR. AP26113 связывает и ингибирует слитые белки ALK киназы и ALK, а также EGFR и мутантные формы[74]. Это приводит к ингибированию ALK-киназы и EGFR-киназы, нарушает их сигнальные пути и в конечном итоге ингибирует рост опухолевых клеток в восприимчивых опухолевых клетках[75,76]. Кроме того, AP26113, похоже, преодолевает сопротивление, основанное на мутации. ALK относится к надсемейству рецепторов инсулиновых рецепторов и играет важную роль в развитии нервной системы. Диссервация ALK и перегруппировка генов связаны с рядом опухолей[77].

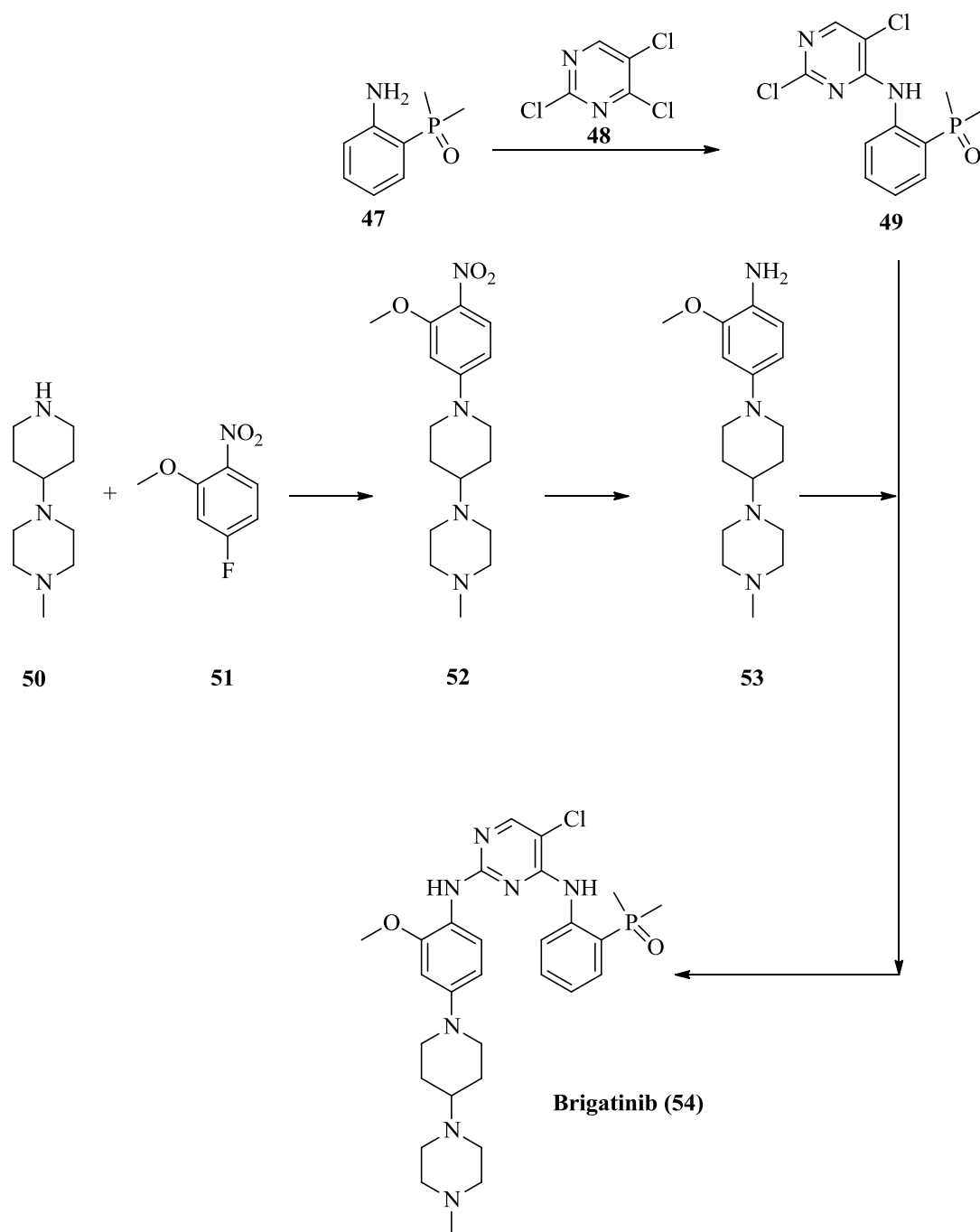


Схема 6. Синтез Brigatinib

Brigatinib был зарегистрирован Ariad в США для лечения пациентов с анапластическими лимфомами киназы (ALK) -положительный локально продвинутый или метастатический немелкоклеточный рака легкого (НМРЛ), который был устойчив к crizotinib[78].

Brigatinib получил прорывную терапию от FDA для лечения пациентов с ALK-НМРЛ, у которых опухоли устойчивы к crizotinib, а FDA назначили FDA для лечения ALK + НМРЛ.[79]. Компания ищет ускоренное одобрение

brigatinib из FDA и планирует запросить приоритетное рассмотрение заявки[80,81].

Розамус и другие сообщили о синтезе brigatinib, как указано на схеме 5[82]. 4,5-трихлорпириминдин (48) в ДМФА подвергали взаимодействию с 4-(диметилфосфорил)анилином (47) с получением конечного продукта 49. К 4-фтор-2-метокси-1-нитробензолу (51) в ДМФА добавили 1-метил-4-(пиперидин) пиперазин (50) и карбонат калия с получением 52. Восстановление (52) палладием дает соединение 53. Добавление 2,5-дихлор-N-[4-(диметилфосфорил) фенил] пиримидин-4-амин (49) в 2-метоксиэтанол до 2-метокси-4-[4-(4-метилпиперазин-1-ил) пиперидин-1-ил] анилина (53) дал brigatinib (54).

1.3 Механизм резистентности к ингибиторам третьего поколения

Несмотря на то, что ТКИ третьего поколения EGFR очень активны, прогрессирование все еще происходит. Несколько механизмов приобретенной резистентности к osimertinib и rociletinib были описаны *in vitro* и в клинических условиях. Было показано, что мутация C797S, находящаяся в тирозинкиназном домене EGFR, является ведущим механизмом устойчивости к необратимым ингибиторам EGFR третьего поколения, нацеленным на мутацию T790M[83-86]. Амплификация HER2[83], амплификация SMET[83] и мутация EGFR L718Q[87] также отвечали за приобретенную резистентность к ингибиторам EGFR третьего поколения без мутации T790M или C797S. Недавно были выявлены амплификации мутации MET, HER2 или KRAS G12S у пациентов с НМРЛ, которые прогрессировали с обработкой AZD9291 или CO1686 [88], как показано на рисунке 3.

1.3.1 Мутация EGFR L718Q

Берсанели и другие представили случай продвинутого НМРЛ с сосуществующими первичными L585R и вторичными мутациями EGFR T790M, которые приобрели резистентность к AZD9291 (osimertinib) из-за появления третичной мутации L718Q. С появлением ингибиторов тирозинкиназы эпидермального фактора роста третьего поколения (EGFR), таких как AZD9291 и CO1686, появляются новые механизмы лекарственной резистентности, такие как мутации C797S и L884V EGFR, у пациентов с EGFR T790M-положительным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Это первый клинический отчет для этой новой мутации как EGFR-зависимый механизм устойчивости к AZD9291 (рис. 3)[89].

1.3.2 Мутация L718Q, L844V и C797S

Эркан и другие идентифицировали 3 основных мутации резистентности к лекарственным средствам. EGFR L718Q, L844V и C797S вызывают устойчивость как к WZ4002, так и к rociletinib (CO1686), в то время как только EGFR C797S приводит к сопротивлению osimertinib (AZD9291). Клетки, содержащие сенсibiliзирующую мутацию EGFR, Del 19 или L858R, в сочетании с L718Q, L844V или C797S сохраняют чувствительность к ингибиторам EGFR на основе хиназолина и afitinib. Мутация C797S в присутствии Del 19 или L858R и T790M вызывает устойчивость ко всем текущим ингибиторам EGFR, но L858R / T790M / C797S остается частично чувствительной к cetuximab, что приводит к нарушению димеризации EGFR[90].

1.3.3 Мутация C797S

1.3.3.1 Мутация C797S вызывает резистентность к Osimertinib (AZD9291)

В первом исследовании I / II AURA, проведенном в I-II фазе AZD9291, системная прогрессия у пациентов с НМРЛ наблюдалась после лечения для

медианы 9,6 месяцев[91]. Сообщалось о характеристике механизмов резистентности у 22 пациентов, которые стали резистентными к AZD9291[92]. Эти пациенты с прогрессированием по AZD9291 в исследовании AURA имели парные образцы предварительной обработки и после лечения плазмой.

Благодаря изучению T790M-положительных пациентов с приобретенной резистентностью к AZD9291 были выявлены три молекулярных подтипа резистентности AZD9291: (1) приобретенный C797S вместе с мутацией T790M[93]. Эта новая мутация является «третичной» мутацией замещения на сайте связывания AZD9291, смены цистеина 797 на серин (EGFR C797S), что приводит к блокированию связывания лекарственного средства, (2) мутации T790M без мутации C797S и (3) потерю мутации T790M без мутации C797S. В докладе также было обнаружено, что в некоторых случаях у одних и тех же пациентов наблюдались две разные нуклеотидные мутации (от T до A и от G до C), приводящие к мутации аминокислот C797S. Поскольку только 6 из 15 случаев приобрели мутацию C797S, должны присутствовать дополнительные механизмы устойчивости к AZD9291 (рис. 3)[94].

1.3.3.2 Мутация C797S вызывает резистентность к Olmutinib (HM61713)

Сонг и другие сообщили о первом случае мутации C797S как механизма сопротивления olmutinib (HM61713), который блокирует ингибирование EGFR и способствует устойчивости к TKI EGFR третьего поколения. Этот случай также подчеркивает важность повторной биопсии для оценки основного механизма резистентности у пациентов, у которых развивается резистентность к TKI EGFR третьего поколения, и принимать решения о лечении. Известно, что приобретенная резистентная мутация

C797S является одним из механизмов сопротивления osimertinib (AZD9291), о котором еще не сообщалось для NM61713 (рисунок 3)[95].

1.3.3.3 Цис- и Транс- C797S

Нидерст и другие демонстрируют, что аллельный контекст, в котором был получен C797S, может прогнозировать реакцию на альтернативные методы лечения. Если мутации C797S и T790M находятся в транс, клетки будут устойчивы к TKI третьего поколения EGFR, но будут чувствительны к комбинации TKI первого и третьего поколений. Если мутации находятся в цис, ни один из EGFR TKI или в комбинации не может подавлять активность. Если C797S развивается в клетках дикого типа для T790 (когда TKI третьего поколения вводятся в настройках первой линии), клетки устойчивы к TKI третьего поколения, но сохраняют чувствительность к TKI первого поколения. Контекст, в котором C797S развивается по отношению к другим аллелям EGFR, влияет на эффективность последующих обработок (рисунок 3)[96].

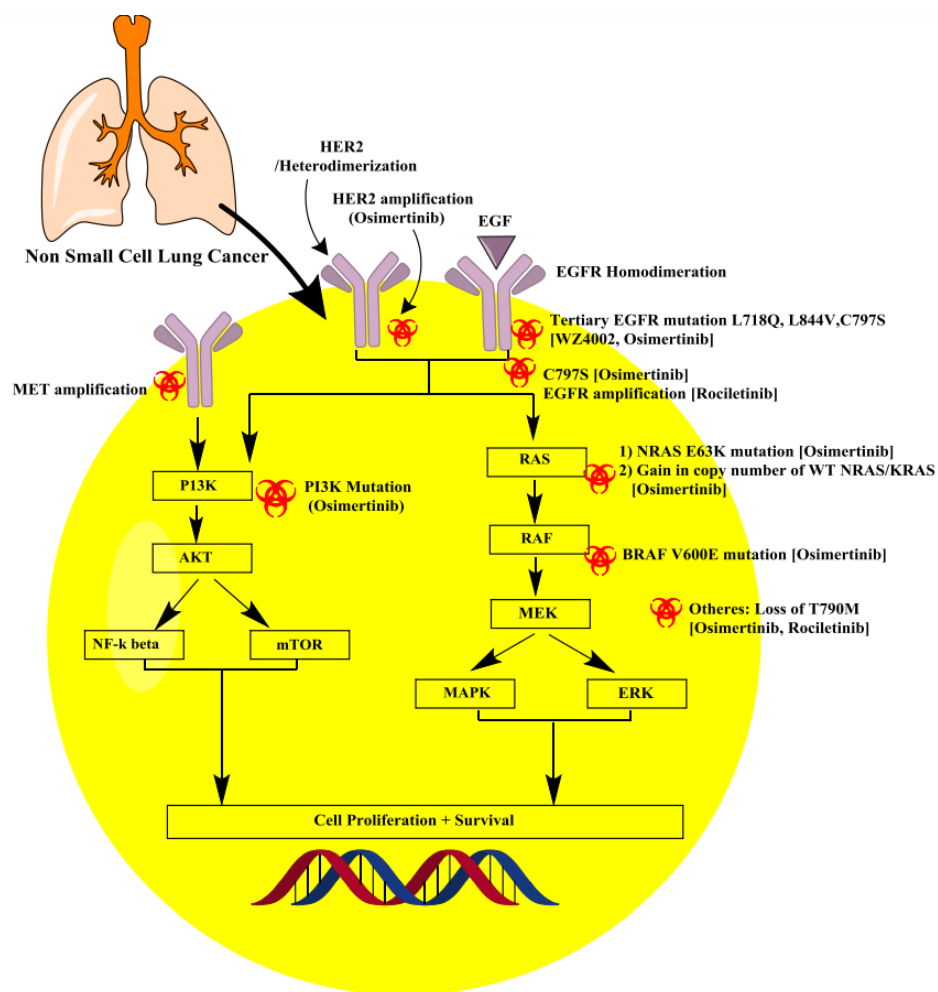


Рисунок 3: Механизм резистентности к ингибиторам EGFR третьего поколения

1.3.4 Усиление HER2 и MET сопровождается резистентностью к Osimertinib (AZD9291)

Поскольку некоторые пациенты, которые прогрессировали на AZD9291, были отрицательными для мутации C797S, должны присутствовать дополнительные механизмы сопротивления. В отчете о случаях 54-летний мужчина с аденокарциномой IV стадии обнаружил, что мутация T790M после прогрессирования лечения второй линии gefitinib[97]. Заболевание прогрессировало после 12 месяцев лечения AZD9291 в исследовании AURA. Усиление HER2 был идентифицирован без мутации C797S от биопсии опухоли.

Вторым пациентом из того же отчета была 60-летняя женщина, никогда не курящая, у которой была диагностирована аденокарцинома стадии IV с

плевральными метастазами. Анализ мутаций выявил известную мутацию активации EGFR в экзоне 21, L858R. Она получала erlotinib и gefitinib последовательно в течение 12 месяцев. После прогрессирования заболевания T790M был идентифицирован NGS, и она была обработана AZD9291 в исследовании AURA. Она имела частичную регрессию опухоли и оставалась свободной от прогрессирования в течение 10 месяцев. Повторная биопсия резистентной к AZD9291 опухоли выявила мутацию активации EGFR и усиление SMET без мутации T790M или C797S. Эти два случая показали, что в рефрактерном НМРЛ без T790M или C797S, дополнительные механизмы мутации гена или амплификации тирозинкиназ, отличных от EGFR, могут быть механизмами резистентности. Требуется дополнительное лечение, нацеленное на мутации (рисунок 3)[99].

1.3.5 RAS-сигнальная зависимость Osimertinib (AZD9291)

Эберлейн и другие отметили повышенную зависимость от сигналов RAS, включая новую мутацию NRAS (E63K), прирост количества копий WT NRAS и KRAS в доклинических исследованиях приобретенной резистентности к osimertinib. Ингибирование MEK (с селуметинибом) в дополнение к osimertinib приводило к регрессии опухоли в трансгенной модели (рис. 3)[100].

1.4 Открытие аллостерических ингибиторов C797S четвертого поколения

Для поиска аллостерического ингибитора, который связывается с EGFR вдали от участка связывания АТФ, Джиа и другие получили человеческие EGFR мутантные пептиды, охватывающие остатки 696-1022 (включая дикого типа, L858R, L858R / T790M, T790M и T790M / V948R мутант)[101]. Очищенный мутантный фермент EGFR L858R / T790M использовали для скрининга библиотеки из 2,5 миллионов соединений при

концентрации 1 мкМ АТФ. Из этого раунда скрининга было найдено 1322 лучших хита. Затем лучшие хиты анализировали на их значения IC_{50} как на 1 мкМ, так и на 1 мМ АТФ для отделения конкурентной способности АТФ от неконкурентных соединений. Лучшие хиты также были экранированы против EGFR дикого типа, чтобы выбрать тех, у кого больше специфичность для мутантного EGFR.

Первое соединение, EAI001 (EGFR аллостерический ингибитор-1) (рис. 4), было обнаружено с такой эффективностью и селективностью для мутантного EGFR (половина максимальной ингибирующей концентрации (при 1 мМ АТФ, IC_{50} 0.024 мкМ для L858R/T790M, $IC_{50} > 50$ мкМ для дикого -тип EGFR)). Тем не менее, он имел только умеренную активность против отдельных мутантов L858R и T790M. После медикаментозной оптимизации EAI001 было обнаружено, что ингибитор EAI045 обладает высокой эффективностью и селективностью для мутации L858R / T790M (рисунок 4). Глубокую селективность для мутанта EGFR подтверждали путем профилирования группы из 250 протеинкиназ. Поэтому EAI045 был подтвержден как аллостерический, не-АТФ-конкурентный ингибитор мутантного EGFR[101].

В мутантных клетках H1975 и HMP1 L858R / T790M EAI045 уменьшался, но полностью не отменял автофосфорилирование EGFR. В стабильно трансфицированных клетках NIH-3T3, несущих мутант EGFR L858R / T790M, EAI045 показал ту же активность. В мутантных L858R клетках H3255 EAI045 проявлял умеренную активность (рисунок 4)[101]. В клетках HaCaT клеточная линия кератиноцитов с EGFR дикого типа EAI045 не проявляла активности ингибирования фосфорилирования EGFR. Это снова подтвердило селективность EAI045 для мутантного EGFR. Поскольку для его активации требуется димеризация EGFR, эти исследователи предположили, что аллостерический ингибитор неактивен для этих асимметричных димеров / димеров между пептидами дикого типа и

мутантного EGFR[101]. Исследователи подтвердили, что EAI045 был заметно более активен в мутантах с дефектом димеризации EGFR. В сочетании с cetuximab моноклональное антитело, которое может блокировать димеризацию EGFR, предотвращая связывание EGF-лиганда, EAI045 заметно ингибирует пролиферацию клеток Ва / F3, несущих мутацию L858R / T790M. Эти исследования *in vitro* доказали, что EAI045 является активным и селективным для T790M-содержащих EGFR мутантов, которые находятся в мономерном состоянии[101].

В генетически модифицированной мышинной модели рака легких L858R / T790M-мутантов эффективность EAI045 тестировалась сама по себе и в сочетании с cetuximab. Замечательная регрессия опухоли наблюдалась у мышей L858R / T790M-мутантов, обработанных комбинацией EAI045 и cetuximab. Никакого ответа не было обнаружено у тех мышей, которые получали только EAI045.

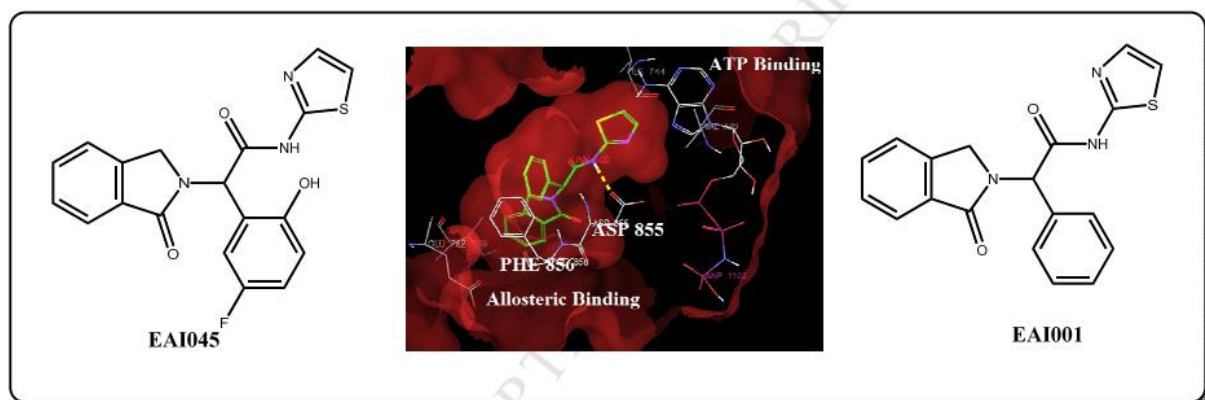


Рисунок 4. Четвертое поколение C797S ингибиторов EGFR

Тот же эффект наблюдался как в L858R / T790M / C797S, так и в клетках Ва / F3, а также у мышей, несущих ксенотрансплантаты опухолей L858R / T790M / C797S. Эти анализы ясно показали, что EAI045 может преодолеть резистентность от приобретенных мутаций T790M и C797S[101].

1.5 U-Y Аллостерическая стратегия борьбы с резистентностью C797S EGFR

Сокристаллическая структура (код PDIK 3IKA и 4ZAU) киназного домена EGFR T790M в комплексе с WZ4002 и AZD9291 показала, что «U-образная» конфигурация пиримидинового ядра вместе с анилиновым кольцом, несущим гидрофильную группу и акриламидную группу, благоприятно связывается с целевой EGFR (рис. 4 и 5)[102-104]. Было разработано и синтезировано большое количество малых молекул в качестве селективных ингибиторов EGFR против мутации EGFR T790M на основе этого механизма связывания.

Аналогичным образом было изучено связывание аллостерических ингибиторов EAI045 с использованием PDB ID 5D41.[105]. EAI045 был аллостерическим конкурентным ингибитором АТФ мутантного T790M EGFR, имеющим конфигурацию в форме Y, как показано на рис. 4 и 5. Сосредоточение внимания на этих молекулах и рассмотрение их стратегий проектирования (конфигурация U до Y) вместе с их типичной противоопухолевой активностью даст ценные подсказки для дальнейшей разработки более активных ингибиторов EGFR T790M.

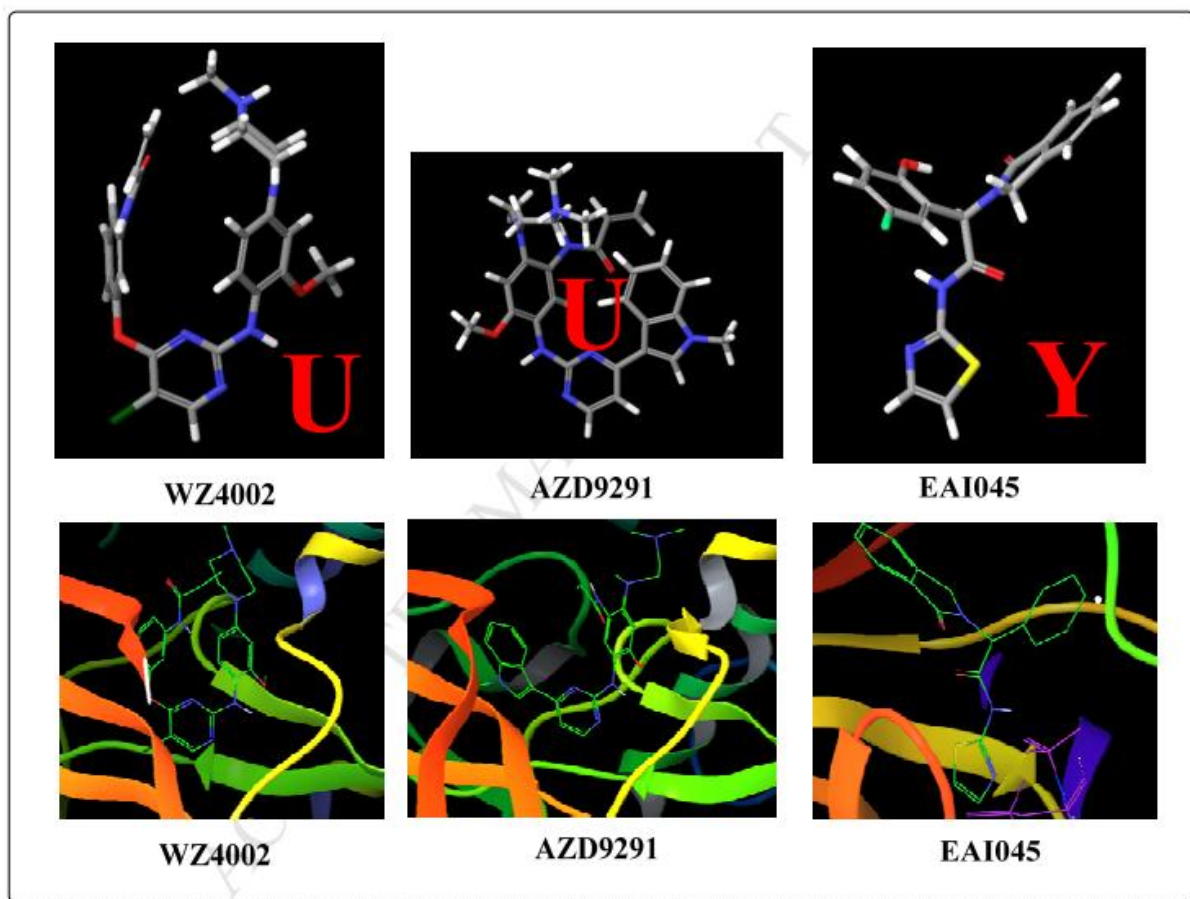


Рисунок 5. U-образная и Y-образная конфигурация агентов третьего и четвертого поколений.

1.6 Заключение и перспективы на будущее

Ингибиторы тирозинкиназы являются первым подход к выбору наиболее продвинутого НМРЛ. Мутация T790M экзона 20 EGFR является наиболее распространенным механизмом приобретенной резистентности к TKI первого и второго поколения EGFR. AZD9291 (osimertinib), rociletinib (C0686) и HM61713 (B11482694) являются ингибиторами EGFR третьего поколения против мутации T790M. AZD9291 одобрен для положительного продвинутого НМРЛ T790M. Однако резистентность возникает быстро, обычно в течение 9-13 месяцев. Исследования биомаркеров и анализ мутаций играют все более важную роль в руководстве диагностикой рака и клиническим развитием новых терапевтических агентов. Благодаря этим

подходам мутация EGFR C797S была быстро идентифицирована как ведущий механизм устойчивости к ингибиторам третьего поколения. Сообщалось о дополнительных механизмах сопротивления. Мутация C797S представляется идеальной мишенью для преодоления приобретенного сопротивления ингибиторам третьего поколения. EAI045 до сих пор является первым аллостерическим TKI, специально разработанным для преодоления мутаций T790M и C797S. Мутации в C797S не должны влиять на эффективность EAI045, поскольку остаток находится вдали от аллостерического связывающего кармана. Однако аллостерический ингибитор неэффективен только из-за димеризации рецептора. Однако комбинация с cetuximab делает EAI045 полностью активным против T790M и C797S. Клиническая эффективность этого соединения в настоящее время остается неизвестной. Мутация C797S не является единственным механизмом устойчивости к TKI третьего поколения EGFR. Хотя реже, мутация EGFR L718Q представляет собой еще один механизм устойчивости к AZD9291. Следовательно, можно разработать TKI, нацеленные на этот конкретный мутант. Комбинация EGFR TKI с другими агентами должна быть одним из будущих направлений для преодоления разнообразных резистентных клонов опухоли. Помимо cetuximab, MET и ингибиторы MEIK могут иметь значение в комбинированной терапии. Иммуные блокаторы контрольных точек были одобрены для лечения различных видов рака. Они могут рассматриваться для комбинированной терапии для преодоления резистентности к TKI.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Построение виртуальной комбинаторной библиотеки

Ранее в нашей лаборатории в ходе биологического скрининга была обнаружена структура 4-амино-5-цианопиримидина в качестве активного цитотоксического соединения. В представленном исследовании с целью разработки синтетической комбинаторной библиотеки производных 4-амино-5-цианопиримидина, нами осуществлён высокопроизводительный молекулярный докинг виртуальной комбинаторной библиотеки (VCL) в активный сайт киназного домена рецептора эпидермального фактора роста. На рисунке 6 представлено описание построенной комбинаторной библиотеки.

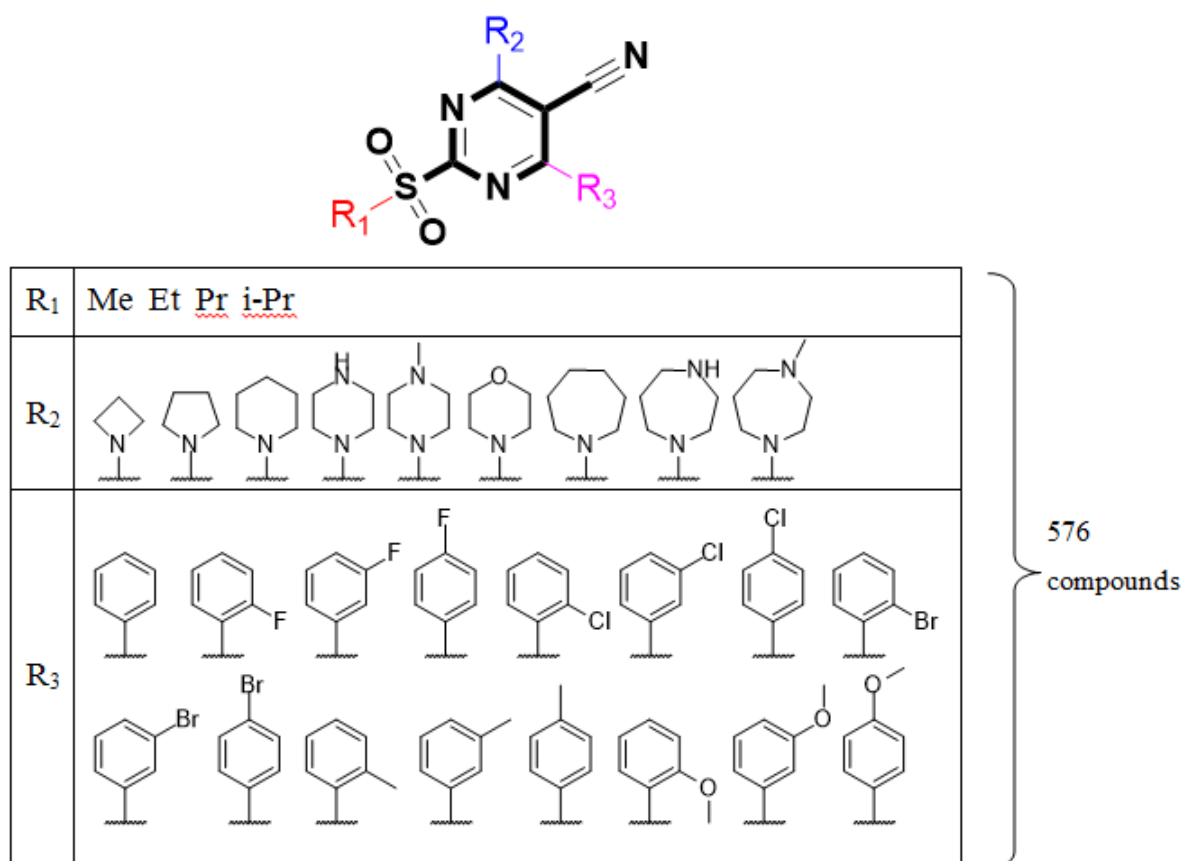


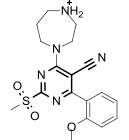
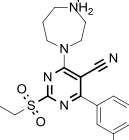
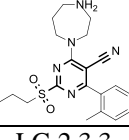
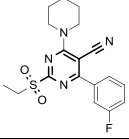
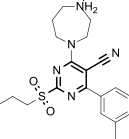
Рисунок 6. Описание комбинаторной библиотеки

Библиотека насчитывала 576 соединений, построенных на основе варьирования билдинг-блоков, представленных в большинстве случаев

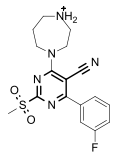
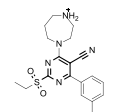
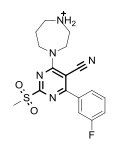
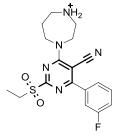
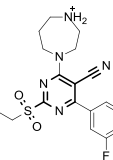
остатками циклических аминов (азетидин, пирролидин, пиперидин, морфолин, пиперазин, гомопиперазин), алкильных (метил, этил, пропил и изопропил) и арильных фрагментов.

В таблице 1 представлены физико-химические характеристики представителей VCL. Как можно видеть представители библиотеки в полной мере подчиняются правилам Липински и в большинстве случаев правилу трех, и построены в логике drug like.

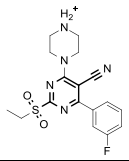
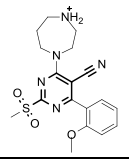
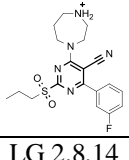
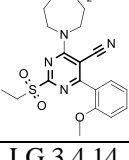
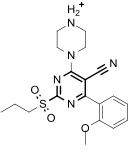
Таблица 1. Физико-химические характеристики представителей библиотеки

Формула	Volume	PSA	SASA	RuleOfThree	WPSA	FOSA	QPlogPo/w	FISA	RuleOfFive	Mol MW	PISA
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<p>LG 1.8.14</p> 	1207.273	108.816	671.876	0	1.168	364.994	1.170	151.003	0	387.456	154.710
<p>LG 2.8.12</p> 	1244.993	101.218	695.801	0	0.000	408.335	1.761	141.559	0	385.483	145.907
<p>LG 3.8.11</p> 	1284.297	101.172	706.361	0	0.259	398.449	1.982	147.780	0	399.510	159.874
<p>LG 2.3.3</p> 	1170.023	86.370	653.344	0	46.993	313.451	2.470	134.064	0	374.432	158.836
<p>LG 3.8.12</p> 	1284.283	100.279	709.341	0	1.136	409.220	1.924	153.871	0	399.510	145.115

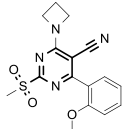
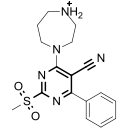
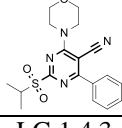
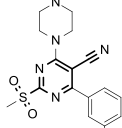
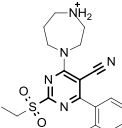
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.8.3 	1143.707	103.224	645.995	0	47.216	268.549	1.165	167.805	0	375.420	162.425
LG 2.8.12 	1244.993	101.218	695.801	0	0.000	408.335	1.761	141.559	0	385.483	145.907
LG 1.8.3 	1143.707	103.224	645.995	0	47.216	268.549	1.165	167.805	0	375.420	162.425
LG 2.8.3 	1201.680	102.809	675.759	0	46.991	309.202	1.587	157.121	0	389.447	162.444
LG 2.8.3 	1201.680	102.809	675.759	0	46.991	309.202	1.587	157.121	0	389.447	162.444

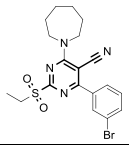
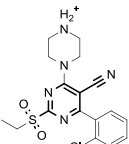
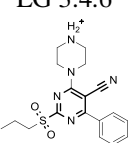
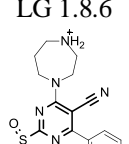
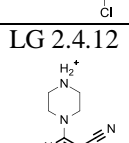
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.4.3 	1154.566	102.377	654.797	0	47.112	292.608	1.273	159.890	0	375.420	155.187
LG 1.8.14 	1207.273	108.816	671.876	0	1.168	364.994	1.170	151.003	0	387.456	154.710
LG 3.8.3 	1253.831	101.286	700.896	0	46.989	332.495	1.877	160.816	0	403.473	160.596
LG 2.8.14 	1254.034	107.349	699.877	0	0.531	411.598	1.603	128.898	0	401.482	158.851
LG 3.4.14 	1282.634	109.710	717.193	0	0.000	408.532	1.592	154.217	0	401.482	154.444

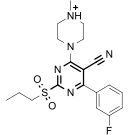
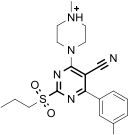
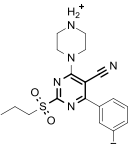
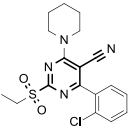
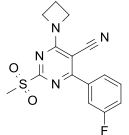
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.1.15 	1085.798	97.506	627.611	0	0.231	328.924	1.531	145.862	0	344.387	152.593
LG 1.8.1 	1121.424	102.039	631.242	0	1.158	265.029	0.934	163.554	0	357.429	201.501
LG 4.6.1 	1161.195	95.811	642.099	0	0.000	319.407	1.515	124.789	0	372.441	197.903
LG 1.4.3 	1098.970	103.179	620.620	0	47.203	245.390	0.902	167.117	0	361.393	160.909
LG 2.8.8 	1225.883	102.754	676.983	0	56.497	303.501	1.805	153.672	0	450.352	163.314

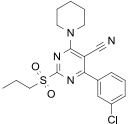
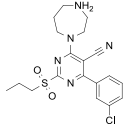
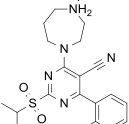
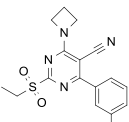
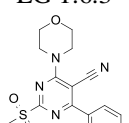
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.7.9 	1249.938	87.371	693.175	1	77.090	341.148	3.153	125.609	0	449.364	149.328
LG 2.4.5 	1157.017	102.101	634.294	0	51.443	265.914	1.328	159.839	0	391.874	157.098
LG 3.4.6 	1228.777	102.080	682.635	0	71.654	305.209	1.821	158.971	0	405.901	146.801
LG 1.8.6 	1171.672	103.214	660.992	0	71.841	268.652	1.416	167.698	0	391.874	152.801
LG 2.4.12 	1198.622	102.579	674.864	0	0.528	376.033	1.343	159.891	0	371.456	138.414

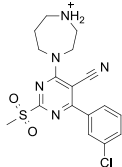
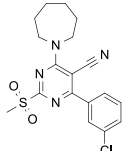
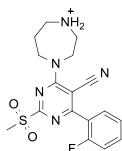
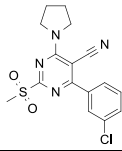
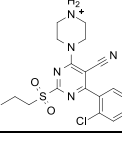
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 3.5.3 	1253.084	90.515	695.368	0	47.792	356.218	1.520	133.088	0	403.473	158.271
LG 3.5.3 	1253.084	90.515	695.368	0	47.792	356.218	1.520	133.088	0	403.473	158.271
LG 3.4.3 	1201.311	102.054	667.881	0	47.009	305.677	1.574	158.701	0	389.447	156.495
LG 2.3.5 	1179.597	86.313	644.218	0	42.895	302.613	2.521	134.381	0	390.887	164.329
LG 1.1.3 	1026.357	89.455	599.839	0	48.069	236.237	1.716	145.233	0	332.352	170.300

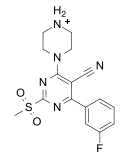
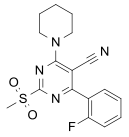
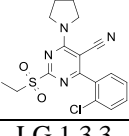
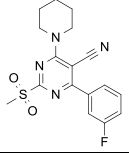
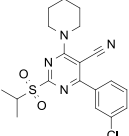
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 3.3.6 	1259.808	87.874	704.381	1	71.615	353.805	3.185	127.623	0	404.913	151.338
LG 3.8.6 	1281.782	101.285	715.874	0	71.609	332.536	2.130	160.772	0	419.928	150.957
LG 4.8.5 	1244.958	99.069	670.224	0	53.391	307.637	1.924	152.583	0	419.928	156.613
LG 2.1.15 	1135.491	97.854	647.829	0	0.327	361.177	1.915	136.842	0	358.414	149.484
LG 1.6.3 	1074.586	97.549	602.275	0	47.215	252.373	0.969	141.749	0	362.378	160.938

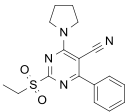
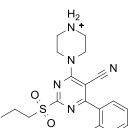
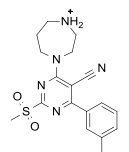
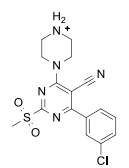
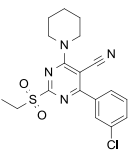
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.8.6 	1171.672	103.214	660.992	0	71.841	268.652	1.416	167.698	0	391.874	152.801
LG 1.7.6 	1183.557	87.897	654.432	0	71.826	300.143	2.636	134.607	0	390.887	147.856
LG 1.8.2 	1127.626	102.751	629.926	0	30.984	260.870	1.061	163.226	0	375.420	174.845
LG 1.2.6 	1102.052	88.404	637.075	0	71.816	263.615	2.047	144.502	0	362.833	157.142
LG 3.4.5 	1230.940	103.292	682.739	0	51.438	311.192	1.807	154.922	0	405.901	165.186

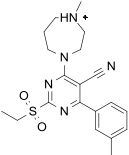
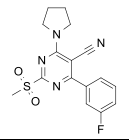
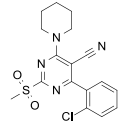
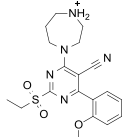
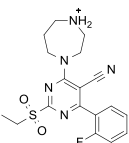
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.4.3 	1098.970	103.179	620.620	0	47.203	245.390	0.902	167.117	0	361.393	160.909
LG 1.3.2 	1114.321	87.687	631.239	0	32.066	284.269	2.023	140.537	0	360.405	174.367
LG 2.2.5 	1131.985	87.177	628.590	0	55.777	280.956	2.248	134.814	0	376.860	157.043
LG 1.3.3 	1115.439	87.663	626.046	0	47.199	280.111	2.073	139.973	0	360.405	158.762
LG 4.3.6 	1247.697	85.635	690.936	1	72.081	343.923	3.124	125.086	0	404.913	149.844

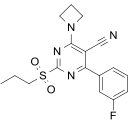
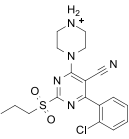
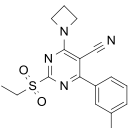
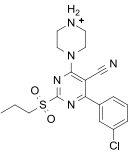
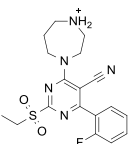
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.2.1 	1116.232	87.969	643.338	0	0.000	304.651	1.994	133.976	0	342.415	204.711
LG 3.4.11 	1217.023	102.155	657.983	0	1.115	335.810	1.500	160.972	0	385.483	160.085
LG 1.8.12 	1182.784	103.425	659.830	0	0.218	351.195	1.221	165.307	0	371.456	143.110
LG 1.4.6 	1126.875	103.183	635.545	0	71.825	245.351	1.151	167.147	0	377.848	151.222
LG 2.3.6 	1197.992	86.364	668.306	0	71.614	313.424	2.735	134.056	0	390.887	149.213

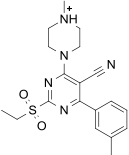
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.9.12 	1285.587	91.002	701.693	0	0.073	432.742	1.516	133.993	0	399.510	134.885
LG 1.2.3 	1074.051	88.402	622.063	0	47.193	263.602	1.781	144.516	0	346.378	166.752
LG 1.3.5 	1135.327	88.508	634.166	0	55.222	281.142	2.274	134.841	0	376.860	162.961
LG 2.8.14 	1254.034	107.349	699.877	0	0.531	411.598	1.603	128.898	0	401.482	158.851
LG 2.8.2 	1070.590	87.790	617.048	0	33.686	267.559	2.016	137.141	0	346.378	178.662

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 3.1.3 	1140.720	88.305	659.790	0	47.359	311.112	2.558	131.030	0	360.405	170.289
LG 3.4.5 	1230.940	103.292	682.739	0	51.438	311.192	1.807	154.922	0	405.901	165.186
LG 2.1.12 	1123.016	88.330	647.359	0	0.000	359.958	2.232	132.702	0	342.415	154.699
LG 3.4.6 	1228.777	102.080	682.635	0	71.654	305.209	1.821	158.971	0	405.901	146.801
LG 2.8.2 	1186.398	102.285	660.701	0	30.628	301.370	1.485	152.822	0	389.447	175.881

Продолжение таблицы 1

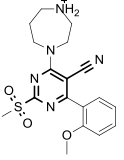
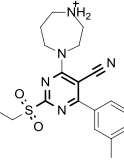
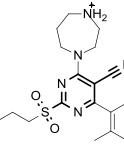
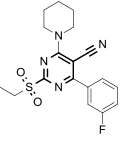
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.5.12 	1225.170	90.790	675.013	0	1.117	393.632	1.103	138.506	0	385.483	141.758

2.2 Высокопроизводительный молекулярный докинг

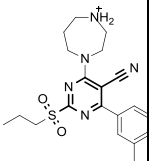
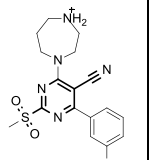
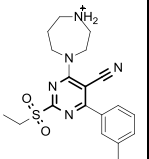
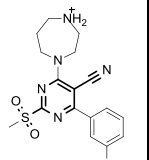
Молекулярный докинг производили с применением оригинального алгоритма Glide в программном пакете Schrodinger. Для анализа режимов стыковки исследуемых лигандов использовались два разных протокола стыковки, протокол стандартной точности (SP) и протокол дополнительной точности (XP). Для оценки относительной аффинности лигандов используется метод молекулярной механики с обобщенной поверхностью (MM/GBSA). Кристаллическую структуру тирозинкиназы EGFR, связанную с хиназолинсодержащим лигандом, разрешение 2.4 Å, загружали из банка данных белков RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (PDB id 4i23).

В таблице 2 представлены результаты молекулярного докинга.

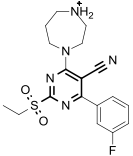
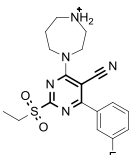
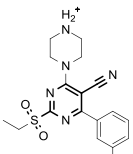
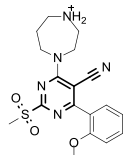
Таблица 2. Результаты молекулярного докинга

Формула	Glide Gscore	Docking Score	Xp Gscore	MMGBSA dG Bind	MMGBSA dG Bind Coulomb	MMGBSA dG Bind Covalent	MMGBSA dG Bind Hbond	MMGBSA dG Bind Lipo	MMGBSA dG Bind Solv GB	MMGBSA dG Bind vdW
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 1.8.14 	-6.216	-6.207	-6.216	-47.803017	-12.363883	4.667732	-1.283097	-12.094850	23.557175	-50.286094
LG 2.8.12 	-6.126	-6.117	-6.126	-42.958927	-6.756021	1.144556	-1.053099	-15.684947	22.105926	-42.715341
LG 3.8.11 	-6.080	-6.071	-6.080	-44.486845	-12.579362	8.689296	-0.934426	-15.272647	23.770360	-48.160065
LG 2.3.3 	-5.971	-5.971	-5.971	-41.460242	2.446442	3.880510	-0.714647	-13.225190	14.937146	-48.784504

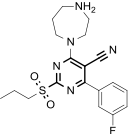
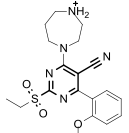
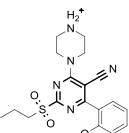
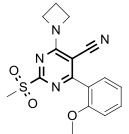
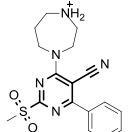
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 3.8.12 	-5.943	-5.934	-5.943	-48.789336	-8.331330	4.375828	-0.871816	-16.564980	22.089327	-49.486365
LG 1.8.3 	-5.916	-5.908	-5.916	-44.012292	-5.931815	3.153366	-0.669961	-12.346670	22.031184	-50.248395
LG 2.8.12 	-5.912	-5.903	-5.912	-49.697969	-6.136327	2.270783	-0.449417	-15.794492	21.348339	-50.936854
LG 1.8.3 	-5.902	-5.893	-5.902	-44.032790	-5.878170	3.010763	-0.669802	-12.347432	22.071083	-50.219233

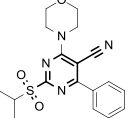
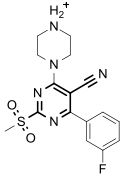
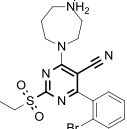
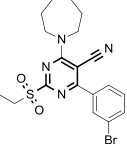
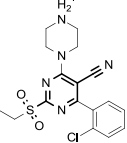
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 2.8.3 	-5.891	-5.883	-5.891	-44.958059	-5.767502	3.647733	-1.097051	-15.205023	23.363131	-49.899347
LG 2.8.3 	-5.873	-5.865	-5.873	-44.927976	-5.829564	3.706557	-1.094516	-15.214955	23.422466	-49.917963
LG 2.4.3 	-5.879	-5.857	-5.879	-43.845469	-5.804262	3.703327	-1.165018	-13.971639	22.066650	-48.674528
LG 1.8.14 	-5.845	-5.836	-5.845	-45.955609	-15.521087	7.719319	-1.166806	-12.218496	25.261274	-50.029812

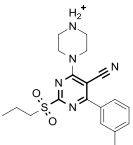
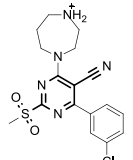
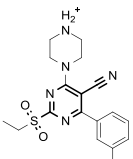
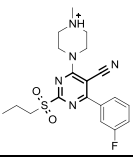
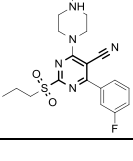
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 3.8.3 	-5.834	-5.826	-5.834	-38.995229	-3.722512	4.311356	-0.661393	-16.611173	20.754120	-43.065627
LG 2.8.14 	-5.831	-5.822	-5.831	-47.903443	-10.968980	5.977290	-1.361957	-15.217231	23.260394	-49.592960
LG 3.4.14 	-5.842	-5.820	-5.842	-47.498408	-11.319384	7.767114	-1.279936	-16.745031	23.720928	-49.642100
LG 1.1.15 	-5.818	-5.818	-5.818	-40.923348	2.827609	0.737944	-0.987087	-12.382376	8.184369	-39.303807
LG 1.8.1 	-5.796	-5.788	-5.796	-41.348706	-9.315898	5.672795	-1.038353	-11.506754	20.811839	-45.972335

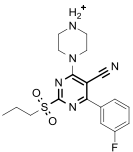
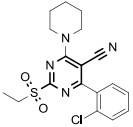
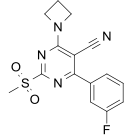
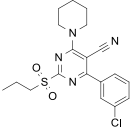
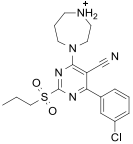
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 4.6.1 	-5.785	-5.785	-5.785	-36.926415	13.449106	4.711255	-1.602046	-15.071426	3.968224	-41.847504
LG 1.4.3 	-5.798	-5.776	-5.798	-42.354698	-7.051347	2.569162	-1.159727	-11.606355	22.783167	-47.889598
LG 2.8.8 	-5.784	-5.775	-5.784	-39.564717	-10.378672	8.990982	-1.076872	-14.852764	25.219875	-47.467266
LG 2.7.9 	-5.752	-5.752	-5.752	-49.346806	0.549932	2.392940	-0.509073	-15.150916	6.886087	-43.515775
LG 2.4.5 	-5.769	-5.747	-5.769	-46.215695	-6.907278	4.965211	-1.177891	-16.203877	19.821319	-46.713180

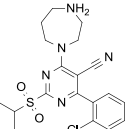
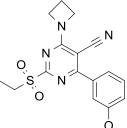
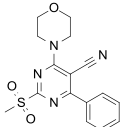
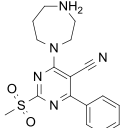
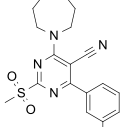
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 3.4.6 	-5.761	-5.739	-5.761	-45.396556	-6.643204	1.491801	-0.958041	-15.520948	24.018523	-47.784687
LG 1.8.6 	-5.740	-5.731	-5.740	-43.815668	-5.152869	1.891581	-0.468937	-13.604598	24.339276	-50.820121
LG 2.4.12 	-5.753	-5.731	-5.753	-47.563861	-7.145137	2.105406	-1.008451	-15.148043	21.400214	-47.767849
LG 3.5.3 	-5.906	-5.730	-5.906	-48.113384	-7.433666	1.469787	-1.135223	-15.296975	24.930644	-50.647951
LG 3.5.3 	-5.906	-5.730	-5.906	-48.113384	-7.433666	1.469787	-1.135223	-15.296975	24.930644	-50.647951

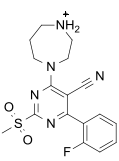
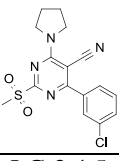
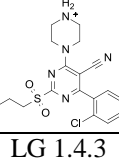
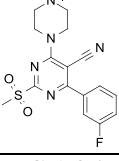
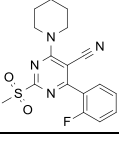
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 3.4.3 	-5.751	-5.729	-5.751	-42.539674	-5.963413	5.437065	-1.186462	-15.277189	23.433324	-48.983000
LG 2.3.5 	-5.715	-5.715	-5.715	-41.234697	1.810539	3.834201	-0.725025	-14.351618	15.928137	-47.730932
LG 1.1.3 	-5.709	-5.709	-5.709	-36.675698	2.026513	1.564974	-0.677090	-9.653178	14.624923	-44.561840
LG 3.3.6 	-5.700	-5.700	-5.700	-44.798313	2.752861	-0.182852	-0.443426	-14.553530	17.652839	-50.024205
LG 3.8.6 	-5.706	-5.697	-5.706	-48.045841	-4.403030	2.286873	-0.427628	-16.454223	24.375006	-53.422838

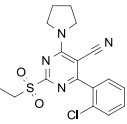
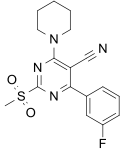
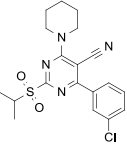
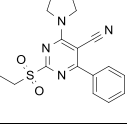
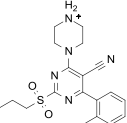
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 4.8.5 	-5.699	-5.691	-5.699	-41.071575	-5.928024	4.459567	-1.172644	-17.444717	23.072896	-44.058652
LG 2.1.15 	-5.688	-5.688	-5.688	-42.289919	0.588556	4.954771	-0.458631	-13.482660	10.260540	-44.152493
LG 1.6.3 	-5.685	-5.685	-5.685	-41.322839	1.262485	3.110411	-0.673411	-10.914694	13.927930	-48.035560
LG 1.8.6 	-5.693	-5.685	-5.693	-41.840206	-5.499790	3.259912	-0.468935	-13.557821	24.314561	-49.888133
LG 1.7.6 	-5.682	-5.682	-5.682	-43.988454	5.603537	6.347145	-0.570836	-13.845507	12.449114	-53.971906

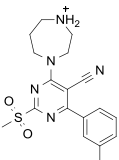
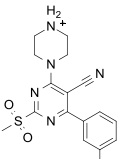
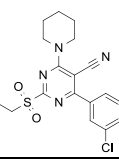
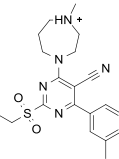
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 1.8.2 	-5.682	-5.673	-5.682	-44.682433	-6.621109	-0.286388	-0.796351	-11.158162	17.268981	-43.089404
LG 1.2.6 	-5.671	-5.671	-5.671	-38.935110	3.224212	1.951865	-0.584072	-11.042741	14.671072	-47.155446
LG 3.4.5 	-5.677	-5.655	-5.677	-47.608070	-9.375590	-2.496175	-0.948105	-14.479239	24.437997	-44.746958
LG 1.4.3 	-5.674	-5.652	-5.674	-42.327188	-7.052621	2.572592	-1.159710	-11.606041	22.810258	-47.891666
LG 1.3.2 	-5.650	-5.650	-5.650	-44.450770	0.127371	2.133192	-0.688196	-11.992838	12.480585	-46.510885

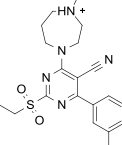
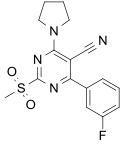
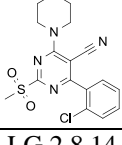
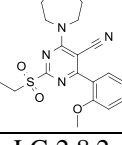
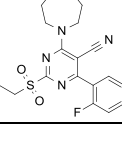
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 2.2.5 	-5.650	-5.650	-5.650	-39.274086	2.431865	3.352882	-0.725944	-13.881408	14.586890	-45.038370
LG 1.3.3 	-5.641	-5.641	-5.641	-42.129941	1.729143	1.845326	-0.707207	-11.965612	14.614725	-47.646315
LG 4.3.6 	-5.641	-5.641	-5.641	-40.030561	5.165323	5.841439	-0.583929	-16.685286	14.606241	-48.374348
LG 2.2.1 	-5.635	-5.635	-5.635	-37.696298	3.254658	0.397036	-0.517326	-12.607168	15.292671	-43.516169
LG 3.4.11 	-5.653	-5.631	-5.653	-46.448369	-8.283281	6.032498	-1.123820	-17.223882	21.223569	-47.073454

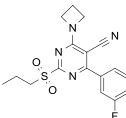
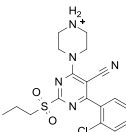
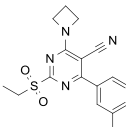
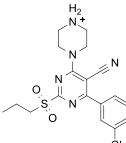
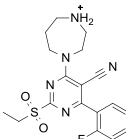
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 1.8.12 	-5.634	-5.626	-5.634	-44.989418	-8.680192	2.374479	-0.848785	-13.882236	23.439878	-47.392562
LG 1.4.6 	-5.646	-5.624	-5.646	-43.289472	-4.197936	1.725931	-0.604095	-12.238888	20.657227	-48.631710
LG 2.3.6 	-5.623	-5.623	-5.623	-41.911416	3.407121	3.814968	-0.597558	-14.020710	15.270835	-49.786072
LG 2.9.12 	-5.624	-5.621	-5.624	-50.976140	-6.570348	2.731852	-0.870351	-17.079733	21.895027	-51.082586

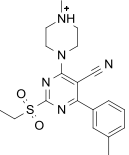
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 2.9.12 	-5.624	-5.621	-5.624	-50.976140	-6.570348	2.731852	-0.870351	-17.079733	21.895027	-51.082586
LG 1.2.3 	-5.616	-5.616	-5.616	-37.859452	1.860052	2.398310	-0.692677	-10.036781	14.226202	-45.614558
LG 1.3.5 	-5.601	-5.601	-5.601	-41.899313	0.980761	1.853760	-0.718654	-13.147775	15.784099	-46.651504
LG 2.8.14 	-5.608	-5.599	-5.608	-49.463740	-11.026893	5.305455	-1.361683	-15.293340	23.320062	-50.407340
LG 2.8.2 	-5.599	-5.599	-5.599	-37.814002	1.099001	2.704377	-0.677547	-10.828138	14.134804	-44.246500

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 3.1.3 	-5.592	-5.592	-5.592	-35.311025	2.064056	1.446515	-0.482532	-11.578944	18.106780	-44.866900
LG 3.4.5 	-5.610	-5.588	-5.610	-42.839409	-8.058173	5.316960	-1.064730	-16.376431	24.609594	-47.266628
LG 2.1.12 	-5.586	-5.586	-5.586	-40.718170	2.248061	3.180382	-0.585637	-12.247897	12.959182	-46.272261
LG 3.4.6 	-5.606	-5.584	-5.606	-50.777982	-6.883807	-2.847625	-0.909337	-15.872368	25.877252	-50.142098
LG 2.8.2 	-5.581	-5.572	-5.581	-46.687167	-4.654752	4.243593	-0.649019	-14.984306	17.932987	-48.575669

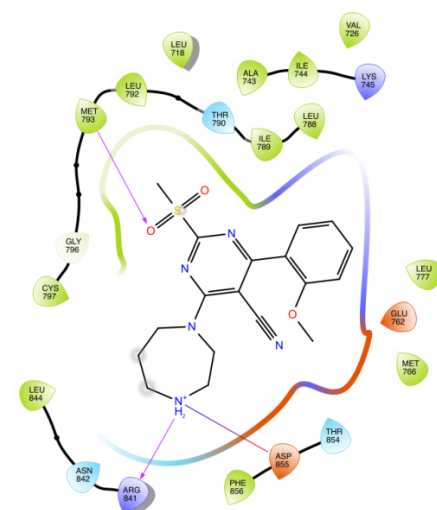
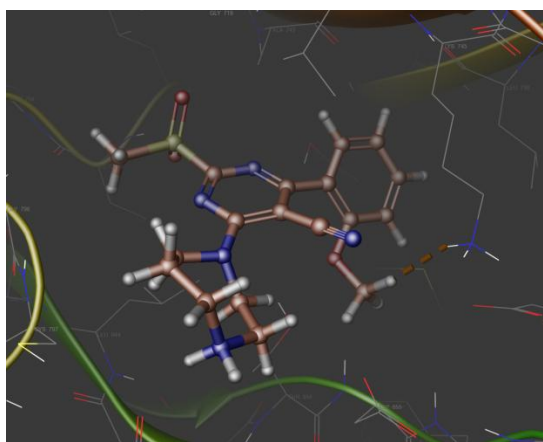
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LG 2.5.12 	-5.746	-5.570	-5.746	-50.204137	-6.840735	3.026373	-1.070182	-16.180802	21.369782	-50.508573

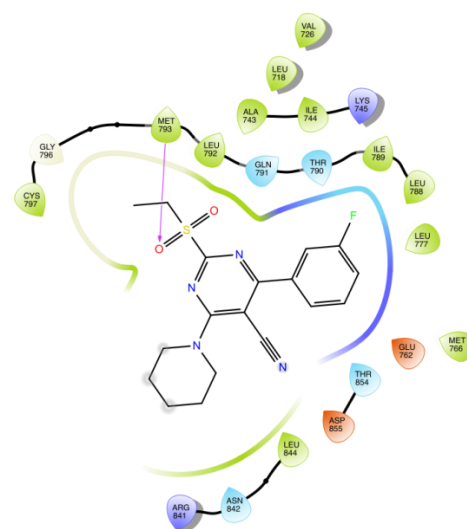
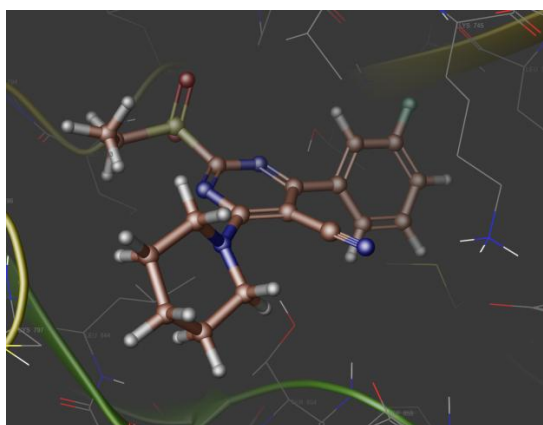
Как видно из представленных данных выявлен ряд соединений-хитов, проявляющих высокую аффинность к исследуемому белку наравне с высокими значения оценочной функции (скоринг). Среди таких соединений стоит отметить производные гомопиперазина (LG 1.8.14), пиперидина (LG 2.3.3), содержащие метил- или пропилсульфонильные группы.

На рисунке 7 представлены структуры комплексов соединений-хитов и базовые межмолекулярные взаимодействия, реализованные в комплексе.

Комплекс LG 1.8.14 – EGFR



Комплекс LG 2.3.3 – EGFR



Комплекс LG 2.8.12 – EGFR

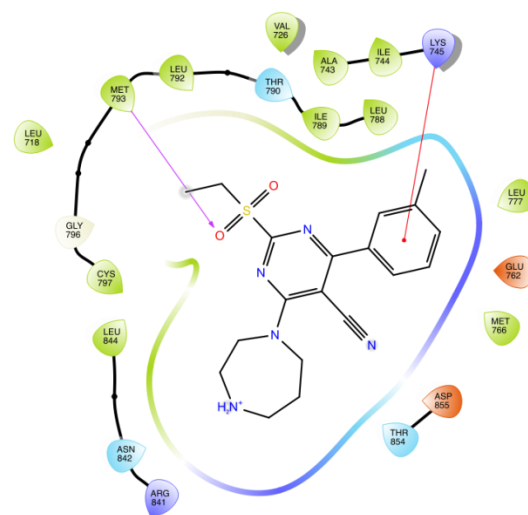
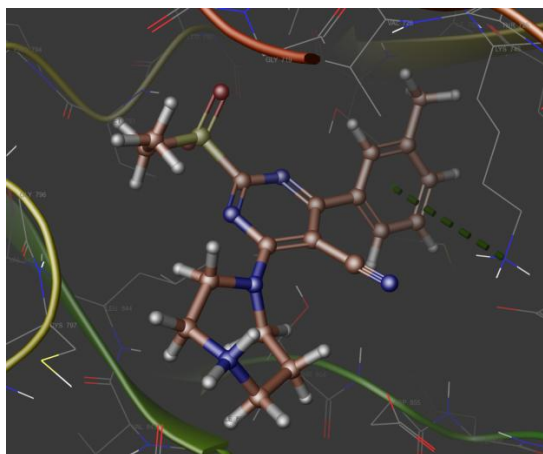


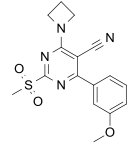
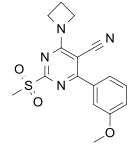
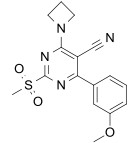
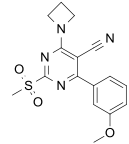
Рисунок 7. Структуры комплексов соединений-хитов и базовые межмолекулярные взаимодействия

Базовым взаимодействием, определяющим высокое значение аффинности исследуемых соединений является образование межмолекулярной водородной связи между остатками Met793 и атомами кислорода сульфонильной группы, а также водородная связь между гомопиперазиновыми фрагментами и остатками Arg841 и Asp855.

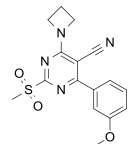
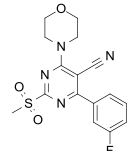
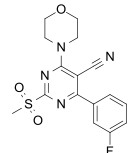
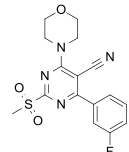
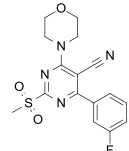
2.3 Индуцированный молекулярный докинг

Стандартные протоколы молекулярный стыковки не учитывают возможную гибкость исследуемого рецептора. Для решения данной проблемы и для получения более корректных данных по исследуемым соединениям нами проведена молекулярная стыковка повышенной точности с учетом конформационной подвижности белковой мишени (EGFR-киназы). Данная возможность реализована в виде протокола induced fit molecular docking, результаты реализации которого представлены в таблице 3.

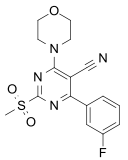
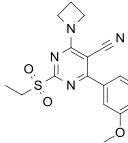
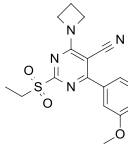
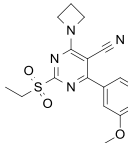
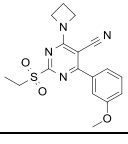
Таблица 3. Результаты индуцированного докинга

Формула	Glide Gscore	Docking Score	Xp Gscore	MMGBSA dG Bind	MMGBSA dG Bind Coulomb	MMGBSA dG Bind Covalent	MMGBSA dG Bind Hbond	MMGBSA dG Bind Lipo	MMGBSA dG Bind Solv GB	MMGBSA dG Bind vdW	IFDScore
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
 <chem>CN1CC1C(=O)N(C#N)C(=O)N(C#N)C2=CC=C(O)C=C2</chem>	-7.499	-7.499	-5.818	-40.923348	2.827609	0.737944	-0.987087	-12.382376	8.184369	-39.303807	-467.084
 <chem>CN1CC1C(=O)N(C#N)C(=O)N(C#N)C2=CC=C(O)C=C2</chem>	-7.055	-7.055	-5.818	-40.923348	2.827609	0.737944	-0.987087	-12.382376	8.184369	-39.303807	-466.279
 <chem>CN1CC1C(=O)N(C#N)C(=O)N(C#N)C2=CC=C(O)C=C2</chem>	-7.644	-7.644	-5.818	-40.923348	2.827609	0.737944	-0.987087	-12.382376	8.184369	-39.303807	-466.089
 <chem>CN1CC1C(=O)N(C#N)C(=O)N(C#N)C2=CC=C(O)C=C2</chem>	-6.454	-6.454	-5.818	-40.923348	2.827609	0.737944	-0.987087	-12.382376	8.184369	-39.303807	-465.927

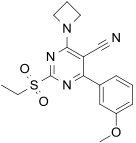
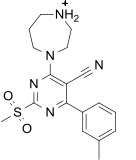
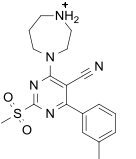
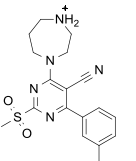
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.1.15 	-7.008	-7.008	-5.818	-40.923348	2.827609	0.737944	-0.987087	-12.382376	8.184369	-39.303807	-465.904
LG 1.6.3 	-8.136	-8.136	-5.685	-41.322839	1.262485	3.110411	-0.673411	-10.914694	13.927930	-48.035560	-466.185
LG 1.6.3 	-8.019	-8.019	-5.685	-41.322839	1.262485	3.110411	-0.673411	-10.914694	13.927930	-48.035560	-465.868
LG 1.6.3 	-6.907	-6.907	-5.685	-41.322839	1.262485	3.110411	-0.673411	-10.914694	13.927930	-48.035560	-465.447
LG 1.6.3 	-7.611	-7.611	-5.685	-41.322839	1.262485	3.110411	-0.673411	-10.914694	13.927930	-48.035560	-465.407

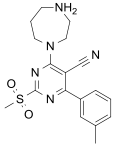
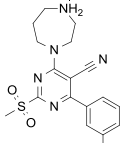
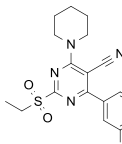
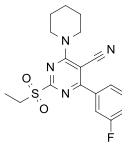
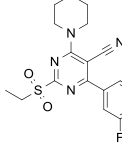
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.6.3 	-7.624	-7.624	-5.685	-41.322839	1.262485	3.110411	-0.673411	-10.914694	13.927930	-48.035560	-465.288
LG 2.1.15 	-7.541	-7.541	-5.688	-42.289919	0.588556	4.954771	-0.458631	-13.482660	10.260540	-44.152493	-465.744
LG 2.1.15 	-6.964	-6.964	-5.688	-42.289919	0.588556	4.954771	-0.458631	-13.482660	10.260540	-44.152493	-465.459
LG 2.1.15 	-6.969	-6.969	-5.688	-42.289919	0.588556	4.954771	-0.458631	-13.482660	10.260540	-44.152493	-465.427
LG 2.1.15 	-6.962	-6.962	-5.688	-42.289919	0.588556	4.954771	-0.458631	-13.482660	10.260540	-44.152493	-464.861

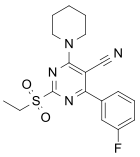
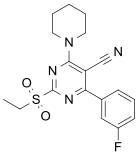
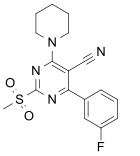
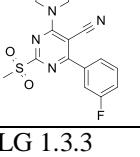
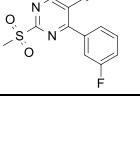
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.1.15 	-6.429	-6.429	-5.688	-42.289919	0.588556	4.954771	-0.458631	-13.482660	10.260540	-44.152493	-464.847
LG 1.8.12 	-9.066	-9.058	-5.634	-44.989418	-8.680192	2.374479	-0.848785	-13.882236	23.439878	-47.392562	-465.731
LG 1.8.12 	-8.706	-8.698	-5.634	-44.989418	-8.680192	2.374479	-0.848785	-13.882236	23.439878	-47.392562	-465.186
LG 1.8.12 	-8.245	-8.237	-5.634	-44.989418	-8.680192	2.374479	-0.848785	-13.882236	23.439878	-47.392562	-465.085

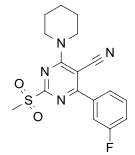
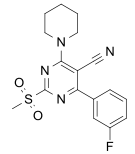
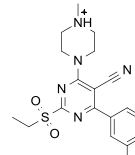
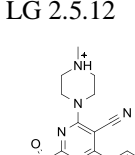
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.8.12 	-7.881	-7.872	-5.634	-44.989418	-8.680192	2.374479	-0.848785	-13.882236	23.439878	-47.392562	-464.852
LG 1.8.12 	-7.792	-7.784	-5.634	-44.989418	-8.680192	2.374479	-0.848785	-13.882236	23.439878	-47.392562	-464.694
LG 2.3.3 	-8.079	-8.079	-5.971	-41.460242	2.446442	3.880510	-0.714647	-13.225190	14.937146	-48.784504	-465.652
LG 2.3.3 	-8.052	-8.052	-5.971	-41.460242	2.446442	3.880510	-0.714647	-13.225190	14.937146	-48.784504	-465.576
LG 2.3.3 	-7.541	-7.541	-5.971	-41.460242	2.446442	3.880510	-0.714647	-13.225190	14.937146	-48.784504	-464.704

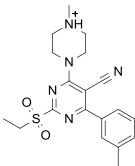
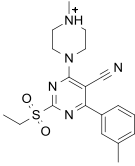
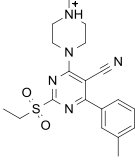
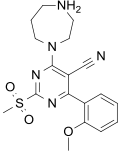
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.3.3 	-7.992	-7.992	-5.971	-41.460242	2.446442	3.880510	-0.714647	-13.225190	14.937146	-48.784504	-464.542
LG 2.3.3 	-7.917	-7.917	-5.971	-41.460242	2.446442	3.880510	-0.714647	-13.225190	14.937146	-48.784504	-464.535
LG 1.3.3 	-7.921	-7.921	-5.641	-42.129941	1.729143	1.845326	-0.707207	-11.965612	14.614725	-47.646315	-465.465
LG 1.3.3 	-7.954	-7.954	-5.641	-42.129941	1.729143	1.845326	-0.707207	-11.965612	14.614725	-47.646315	-464.639
LG 1.3.3 	-6.779	-6.779	-5.641	-42.129941	1.729143	1.845326	-0.707207	-11.965612	14.614725	-47.646315	-464.635

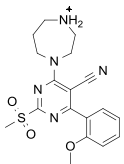
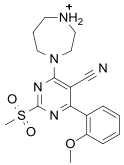
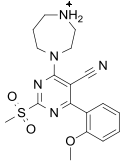
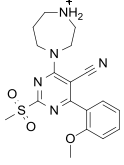
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.3.3 	-7.213	-7.213	-5.641	-42.129941	1.729143	1.845326	-0.707207	-11.965612	14.614725	-47.646315	-464.592
LG 1.3.3 	-7.364	-7.364	-5.641	-42.129941	1.729143	1.845326	-0.707207	-11.965612	14.614725	-47.646315	-464.571
LG 2.5.12 	-8.047	-7.870	-5.746	-50.204137	-6.840735	3.026373	-1.070182	-16.180802	21.369782	-50.508573	-464.911
LG 2.5.12 	-7.554	-7.378	-5.746	-50.204137	-6.840735	3.026373	-1.070182	-16.180802	21.369782	-50.508573	-464.219

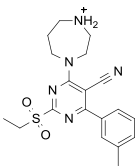
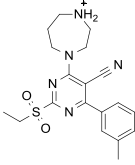
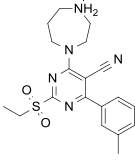
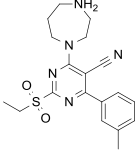
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.5.12 	-8.028	-7.852	-5.746	-50.204137	-6.840735	3.026373	-1.070182	-16.180802	21.369782	-50.508573	-464.096
LG 2.5.12 	-6.873	-6.696	-5.746	-50.204137	-6.840735	3.026373	-1.070182	-16.180802	21.369782	-50.508573	-463.697
LG 2.5.12 	-7.485	-7.308	-5.746	-50.204137	-6.840735	3.026373	-1.070182	-16.180802	21.369782	-50.508573	-463.542
LG 1.8.14 	-8.544	-8.535	-5.845	-45.955609	-15.521087	7.719319	-1.166806	-12.218496	25.261274	-50.029812	-464.902

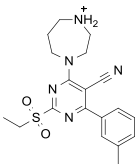
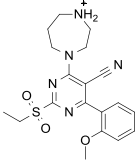
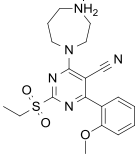
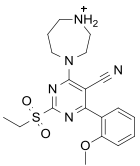
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 1.8.14 	-7.888	-7.880	-5.845	-45.955609	-15.521087	7.719319	-1.166806	-12.218496	25.261274	-50.029812	-464.324
LG 1.8.14 	-8.018	-8.009	-5.845	-45.955609	-15.521087	7.719319	-1.166806	-12.218496	25.261274	-50.029812	-464.064
LG 1.8.14 	-7.878	-7.869	-5.845	-45.955609	-15.521087	7.719319	-1.166806	-12.218496	25.261274	-50.029812	-464.050
LG 1.8.14 	-7.769	-7.761	-5.845	-45.955609	-15.521087	7.719319	-1.166806	-12.218496	25.261274	-50.029812	-463.970

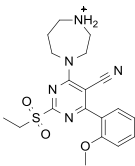
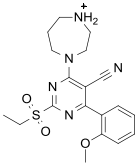
Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.8.12 	-8.777	-8.769	-5.912	-49.697969	-6.136327	2.270783	-0.449417	-15.794492	21.348339	-50.936854	-464.815
LG 2.8.12 	-8.852	-8.844	-5.912	-49.697969	-6.136327	2.270783	-0.449417	-15.794492	21.348339	-50.936854	-464.785
LG 2.8.12 	-8.996	-8.988	-5.912	-49.697969	-6.136327	2.270783	-0.449417	-15.794492	21.348339	-50.936854	-464.762
LG 2.8.12 	-8.179	-8.170	-5.912	-49.697969	-6.136327	2.270783	-0.449417	-15.794492	21.348339	-50.936854	-464.759

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.8.12 	-8.319	-8.310	-5.912	-49.697969	-6.136327	2.270783	-0.449417	-15.794492	21.348339	-50.936854	-464.444
LG 2.8.14 	-8.000	-7.992	-5.831	-47.903443	-10.968980	5.977290	-1.361957	-15.217231	23.260394	-49.592960	-464.702
LG 2.8.14 	-8.339	-8.331	-5.608	-49.463740	-11.026893	5.305455	-1.361683	-15.293340	23.320062	-50.407340	-464.636
LG 2.8.14 	-7.933	-7.924	-5.608	-49.463740	-11.026893	5.305455	-1.361683	-15.293340	23.320062	-50.407340	-464.042

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LG 2.8.14 	-7.314	-7.305	-5.608	-49.463740	-11.026893	5.305455	-1.361683	-15.293340	23.320062	-50.407340	-463.994
LG 2.8.14 	-8.067	-8.058	-5.831	-47.903443	-10.968980	5.977290	-1.361957	-15.217231	23.260394	-49.592960	-463.935

Как видно из представленных данных, учет гибкости белковой мишени приводит к значительному увеличению значений аффинности исследуемых соединений и к увеличению оценочной функции (скоринг-функция) эффективности стыковки.

На рисунке 8 представлено сравнительное строение комплекса LG 1.8.14 – EGFR полученного в рамках конформационно жесткого и гибкого алгоритмов стыковки (по отношению к молекуле белка).

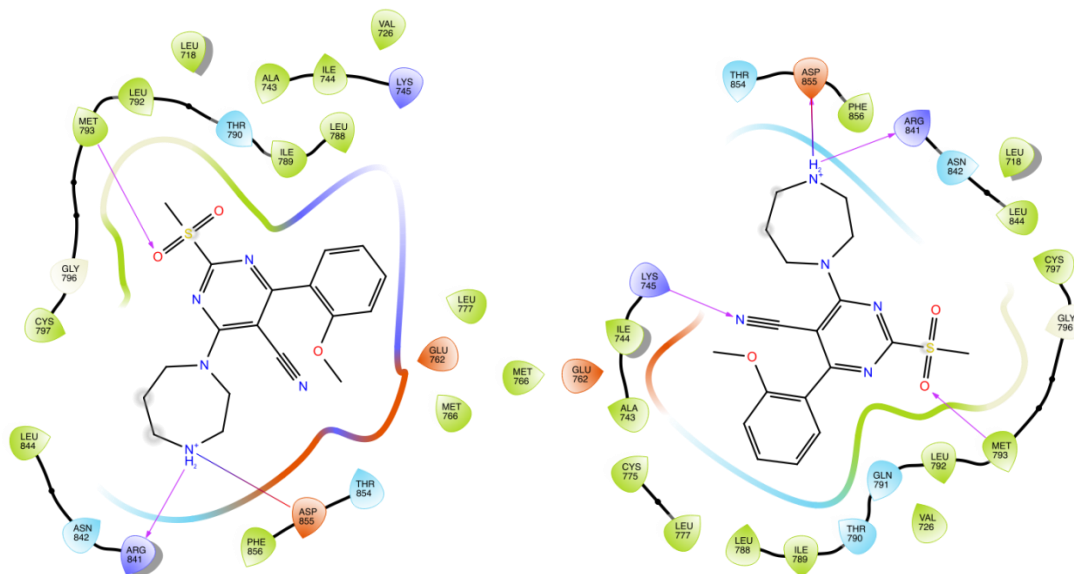


Рисунок 8. Строение комплекса LG 1.8.14 – EGFR полученного в рамках конформационно жесткого и гибкого алгоритмов стыковки

Как видно из визуализации межмолекулярных взаимодействий, второй комплекс дополнительно стабилизирован водородной связью между циангруппой пиримидинового фрагмента с остяками Lys745.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все расчеты в рамках выполненной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2017-1.

3.1 Подготовка комбинаторной библиотеки

Трехмерные структуры исследуемых соединений были построены с использованием панели сборки Maestro в пакете Schrödinger. Модуль Ligprep был использован для генерации всех возможных состояний в физиологическом диапазоне pH 7 ± 2 с учетом наименьшей потенциальной энергии конформации лиганда, с использованием силового поля OPLS_2005. Все полученные структуры соединений были использованы для исследований молекулярной стыковки и свойств ADME с использованием модуля Qikrop.

3.2 Подготовка молекулы белка

Кристаллическую структуру тирозинкиназы EGFR, связанную с хинолинсодержащим лигандом, разрешение 2.4 Å, загружали из банка данных белков RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (PDB id 4i23). Белок был подготовлен с использованием модуля мастера подготовки ProteinPreparationWizard. Все молекулы воды и гетероатомы, кроме нативного лиганда, были удалены и атомы водорода были добавлены к кристаллической структуре. Комплекс был оптимизирован, чтобы уменьшить стерические столкновения, с применением силового поля OPLS_2005. Модуль SiteMap использовался для оценки характеристики функций сайтов связывания. На его основе генерируются карты гидрофобных и гидрофильных взаимодействий, которые определяют донорные, акцепторные и гидрофобные области сайта связывания.

3.3 Молекулярный докинг

Активный сайт для стыковки лигандов определялся с использованием модуля Receptor Grid Generation в Glide. В качестве модельного был выбран сокристаллизованный нативный лиганд, сетка генерировалась вокруг активного участка собственной области EGFR с использованием

масштабирующего коэффициента ван-дер-ваальсовых взаимодействий равного 0.9. Для анализа режимов стыковки исследуемых ингибиторов использовались два разных протокола стыковки, протокол стандартной точности (SP) и протокол дополнительной точности (XP).

3.4 Вычисление Prime MM/GBSA

Для оценки относительной аффинности лигандов используется метод молекулярная механика с обобщенной поверхностью (MM/GBSA). Prime MM/GBSA модуль использовался для расчета свободной энергии связывания для каждой молекулы. Комплексы лиганд-белок, полученные из стыковки XP, были подвергнуты расчетам MM/GBSA.

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. С помощью высокопроизводительного молекулярного докинга и оценочной функции Glide проанализирована виртуальная комбинаторная библиотека, содержащая 576 низкомолекулярных органических производных 4-амино-5-цианопиримидина.
2. На основании современных представлений о drug-like профиле соединений, с применением правил Липински, найдено более 20 высокоаффинных ингибиторов, рекомендованных к синтезу.
3. Для установленных соединений-хитов получены детальные структурные данные об особенностях межмолекулярного взаимодействия с активным сайтом связывания киназного домена рецептора эпидермального фактора роста. Полученные данные имеют большое значение для дальнейшего синтеза и модификации структуры найденных соединений, с целью повышения аффинности к исследуемой биологической мишени.

Список используемой литературы

1. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma / T. S. Mok, Y. L. Wu, S. Thongprasert, C.H. Yang, D.T.Chu, N. Saijo, // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – Т. 361. – №. 10. – С. 947-957.
2. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial/ Т. Mitsudomi [и др.] // *The lancet oncology*. – 2010. – Т. 11. – №. 2. – С. 121-128.
3. Gefitinib or chemotherapy for non–small-cell lung cancer with mutated EGFR / М. Maemondo [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Т. 362. – №. 25. – С. 2380-2388.
4. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial / R. Rosell [и др.] // *The lancet oncology*. – 2012. – Т. 13. – №. 3. – С. 239-246.
5. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations / L.V.Sequist [и др.] // *Journal of clinical oncology*. – 2013. – Т. 31. – №. 27. – С. 3327-3334.
6. Characteristics of lung cancers harboring NRAS mutations / K. Ohashi [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – Т. 19. – С. 2584-2591.
7. EGFR mutation and resistance of non–small-cell lung cancer to gefitinib / S. Kobayashi [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2005. – Т. 352. – №. 8. – С. 786-792.
8. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain / W. Paо [и др.] // *PLoS medicine*. – 2005. – Т. 2. – №. 3. – С. 73.
9. Niederst M. J. Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer / M. J. Niederst, J. A. Engelman // *Sci. Signal*. – 2013. – Т. 6. – №. 294. – С. 1-4

10. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling / J.A. Engelman [и др.] // *science*. – 2007. – Т. 316. – №. 5827. – С. 1039-1043.
11. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation / K. Takezawa [и др.] // *Cancer discovery*. – 2012. – Т. 2. – №. 10. – С. 922-933.
12. Analysis of Mechanisms of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant Lung Cancers / H. Yu [и др.] // *Clinical cancer research*. – 2013. – С. clincanres. 2246.2012.
13. Reduced NF1 expression confers resistance to EGFR inhibition in lung cancer / E. C. de Bruin [и др.] // *Cancer discovery*. – 2014. – Т. 4. – №. 5. – С. 606-619.
14. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors / L. V. Sequist [и др.] // *Science translational medicine*. – 2011. – Т. 3. – №. 75. – С. 1-12.
15. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer / M. J. Niederst [и др.] // *Nature communications*. – 2015. – Т. 6. – С. 6377.
16. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models / D. Li [и др.] // *Oncogene*. – 2008. – Т. 27. – №. 34. – С. 4702.
17. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib / J. A. Engelman [и др.] // *Cancer research*. – 2007. – Т. 67. – №. 24. – С. 11924-11932.
18. A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib / K. L. Reckamp [и др.] // *Cancer*. – 2014. – Т. 120. – №. 8. – С. 1145-1154.

19. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial / V. A. Miller [и др.] // *The lancet oncology*. – 2012. – Т. 13. – №. 5. – С. 528-538.
20. Camidge D. R. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer / D. R. Camidge, W. Pao, L. V. Sequist // *Nature reviews Clinical oncology*. – 2014. – Т. 11. – №. 8. – С. 473.
21. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M / W. Zhou [и др.] // *Nature*. – 2009. – Т. 462. – №. 7276. – С. 1070.
22. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC / A. O. Walter [и др.] // *Cancer discovery*. – 2013. – Т. 3. – №. 12. – С. 1404-1415.
23. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer / D. A. E. Cross [и др.] // *Cancer discovery*. – 2014. – Т. 4. – №. 9. – С. 1046-1061.
24. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer / L. V. Sequist [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 372. – №. 18. – С. 1700-1709.
25. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer / P. A. Jänne [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 372. – №. 18. – С. 1689-1699.
26. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M / K. S. Thress [и др.] // *Nature medicine*. – 2015. – Т. 21. – №. 6. – С. 560.
27. Acquired resistance of EGFR-mutant lung cancer to a T790M-specific EGFR inhibitor: emergence of a third mutation (C797S) in the EGFR tyrosine kinase domain / A. Y. Helena [и др.] // *JAMA oncology*. – 2015. – Т. 1. – №. 7. – С. 982-984.
28. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment

- strategies / M. J. Niederst [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Т. 21. – №. 17. – С. 3924-3933.
29. Cheng H. Recent progress on third generation covalent EGFR inhibitors / H. Cheng, S. K. Nair, B. W. Murray // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2016. – Т. 26. – №. 8. – С. 1861-1868.
30. Wang S. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer / S. Wang, S. Cang, D. Liu // *Journal of hematology & oncology*. – 2016. – Т. 9. – №. 1. – С. 34.
31. Emerging protein kinase inhibitors for non-small cell lung cancer / S. V. Liu [и др.] // *Expert opinion on emerging drugs*. – 2014. – Т. 19. – №. 1. – С. 51-65.
32. New developments in the management of non-small-cell lung cancer, focus on rociletinib: what went wrong? / N. Van Der Steen [и др.] // *OncoTargets and therapy*. – 2016. – Т. 9. – С. 6065.
33. Baevsky M. F., Lee K., Niu D., Petter R. C., Singh J., inventors. WO-2012061299 A1; 2012.
34. Lung cancer: Diverse EGFR mutations explain AZD9291 resistance / A. Thomas [и др.] // *Nature reviews Clinical oncology*. – 2015. – Т. 12. – №. 9. – С. 511-526.
35. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M / K. S. Thress [и др.] // *Nature medicine*. – 2015. – Т. 21. – №. 6. – С. 560.
36. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer / P. A. Jänne [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 372. – №. 18. – С. 1689-1699.
37. Acquired resistance to the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 is associated with increased dependence on RAS signaling in preclinical models / C. A. Eberlein [и др.] // *Cancer research*. – 2015. – Т. 75. – №. 12. – С. 2489-2500.
38. Jiang T. Clinical activity of the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 in patients with EGFR inhibitor-resistant non-small cell lung cancer / T. Jiang, C. Zhou // *Translational lung cancer research*. – 2014. – Т. 3. – №. 6. – С. 370.

39. Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor / M. R. Finlay [и др.] // *J. Med. Chem.* – 2014. – Т. 57. – №. 20. – С. 8249–8267.
40. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer / D. A. E. Cross [и др.] // *Cancer discovery.* – 2014. – Т. 4. – №. 9. – С. 1046-1061.
41. Ayeni D. Emerging agents and new mutations in EGFR-mutant lung cancer / D. Ayeni, K. Politi, S. B. Goldberg // *Clinical Cancer Research.* – 2015. – Т. 21. – №. 17. – С. 3818-3820.
42. Tan C. S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer / C. S. Tan, D. Gilligan, S. Pacey // *The Lancet Oncology.* – 2015. – Т. 16. – №. 9. – С. 447-459.
43. Sam B., Finlay M. R., Richard A. W., Kadambar V. K., Chandrashekar R. C., Murugan A., Redfearn H. M., inventors. WO2013014448 A1; 2013.
44. 190TiP: ELUXA 1: Phase II study of BI 1482694 (HM61713) in patients (pts) with T790M-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) after treatment with an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR TKI) / K. Park [и др.] // *Journal of Thoracic Oncology.* – 2016. – Т. 11. – №. 4. – С. S139.
45. Efficacy and safety of BI 1482694 (HM61713), an EGFR mutant-specific inhibitor, in T790M-positive NSCLC at the recommended phase II dose / K. Park [и др.] // *Journal of Thoracic Oncology.* – 2016. – Т. 11. – №. 4. – С. S113.
46. Wang S. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer / S. Wang, S. Cang, D. Liu // *Journal of hematology & oncology.* – 2016. – Т. 9. – №. 1. – С. 34.
47. Tan C. S. Next-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell lung cancer / C. S. Tan, B. C. Cho, R. A. Soo // *Lung cancer.* – 2016. – Т. 93. – С. 59-68.

48. Acquired C797S mutation upon treatment with a T790M-specific third-generation EGFR inhibitor (HM61713) in non-small cell lung cancer / H. N. Song [и др.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2016. – Т. 11. – №. 4. – С. 45-47.
49. Pirker R. Third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer / R. Pirker // *Current opinion in oncology*. – 2016. – Т. 28. – №. 2. – С. 115-121.
50. Ou S. H. Dacomitinib in lung cancer: a “lost generation” EGFR tyrosine-kinase inhibitor from a bygone era? / S. H. Ou, R. A. Soo // *Drug design, development and therapy*. – 2015. – Т. 9. – С. 5641.
51. Tartarone A. Clinical approaches to treat patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance / A. Tartarone, R. Lerosé // *Therapeutic advances in respiratory disease*. – 2015. – Т. 9. – №. 5. – С. 242-250.
52. Liao B. C. Second and third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer / B. C. Liao, C. C. Lin, J. C. Yang // *Current opinion in oncology*. – 2015. – Т. 27. – №. 2. – С. 94-101.
53. Steuer C. E. The next generation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of lung cancer / C. E. Steuer, F. R Khuri, S. S. Ramalingam // *Cancer*. – 2015. – Т. 121. – №. 8.
54. Peters S. Oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer: comparative pharmacokinetics and drug–drug interactions / S. Peters, S. Zimmermann, A. A. Adjei // *Cancer treatment reviews*. – 2014. – Т. 40. – №. 8. – С. 917-926.
55. Update on recent preclinical and clinical studies of T790M mutant-specific irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors / B. C. Liao [и др.] // *Journal of biomedical science*. – 2016. – Т. 23. – №. 1. – С. 86.
56. Targeting EGFR T790M mutation in NSCLC: from biology to evaluation and treatment / A. Passaro [и др.] // *Pharmacological research*. – 2017. – Т. 117. – С. 406-415.

57. Cha M. Y., Kang S. J., Kim M. R., Lee J. Y., Jeon J. Y., Jo M. G., Kwak E. J., Lee K. O., Ha T. H., Suh K. H., Kim M. S., inventors. WO2011162515 A2; 2011.
58. EGF816 exerts anticancer effects in non–small cell lung cancer by irreversibly and selectively targeting primary and acquired activating mutations in the EGF receptor / Y. Jia [и др.] // *Cancer research*. – 2016. – Т. 76. – №. 6. – С. 1591-1602.
59. Discovery of (R, E)-N-(7-Chloro-1-(1-[4-(dimethylamino) but-2-enoyl] azepan-3-yl)-1 H-benzo [d] imidazol-2-yl)-2-methylisonicotinamide (EGF816), a Novel, Potent, and WT Sparing Covalent Inhibitor of Oncogenic (L858R, ex19del) and Resistant (T790M) EGFR Mutants for the Treatment of EGFR Mutant Non-Small-Cell Lung Cancers / G. Lelais [и др.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2016. – Т. 59. – №. 14. – С. 6671-6689.
60. Update on recent preclinical and clinical studies of T790M mutant-specific irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors / B. C. Liao [и др.] // *Journal of biomedical science*. – 2016. – Т. 23. – №. 1. – С. 86.
61. Wang S. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer / S. Wang, S. Cang, D. Liu // *Journal of hematology & oncology*. – 2016. – Т. 9. – №. 1. – С. 34.
62. Sun J. M. Can we define the optimal sequence of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of epidermal growth factor receptor-mutant nonsmall cell lung cancer? / J. M. Sun, K. Park // *Current opinion in oncology*. – 2017. – Т. 29. – №. 2. – С. 89-96.
63. Kobayashi Y. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy / Y. Kobayashi, T. Mitsudomi // *Cancer science*. – 2016. – Т. 107. – №. 9. – С. 1179-1186.
64. Ou S. H. Dacomitinib in lung cancer: a “lost generation” EGFR tyrosine-kinase inhibitor from a bygone era? / S. H. Ou, R. A. Soo // *Drug design, development and therapy*. – 2015. – Т. 9. – С. 5641-5653.

65. Lelais G., Epple R., Marsilje T. H. III, Michellys P. Y., Mcneill M. H., Long Y., Lu W., Chen B., Bursulaya B., Jiang S., inventors. WO2013184757 A1; 2013.
66. ASP8273, a novel mutant-selective irreversible EGFR inhibitor, inhibits growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells with EGFR activating and T790M resistance mutations / H. Sakagami [и др.] // *Cancer Res.* – 2014. – Т. 74. – №. 19. – С. 1728.
67. ASP8273, a mutant-selective irreversible EGFR inhibitor in patients (pts) with NSCLC harboring EGFR activating mutations: Preliminary results of first-in-human phase I study in Japan / Y. Goto [и др.] // *ASCO Annual Meeting.* – 2015. – Abstract#8014.
68. Phase I dose escalation study of ASP8273, a mutant-selective irreversible EGFR inhibitor, in subjects with EGFR mutation positive NSCLC / H. A. Yu [и др.] // *ASCO Annual Meeting.* – 2015. – Abstract#8083.
69. AP26113 is a dual ALK/EGFR inhibitor: characterization against EGFR T790M in cell and mouse models of NSCLC / V. M. Rivera [и др.] // *Cancer Res.* – 2014. – Т. 74. – №. 19. – С. 1794.
70. Behenna D. C., Cheng H., Schultz S. C., Johnson T. O. Jr., Kath J. C., Nagata A., Nair S. K., Planken S. P., inventors. US 20150141402; 2015.
71. www.apisynthesisint.in
72. Xu X. Parallel phase 1 clinical trials in the US and in China: accelerating the test of avitinib in lung cancer as a novel inhibitor selectively targeting mutated EGFR and overcoming T790M-induced resistance / X. Xu // *Chinese journal of cancer.* – 2015. – Т. 34. – №. 3. – С. 27.
73. AC0010, an irreversible EGFR inhibitor selectively targeting mutated EGFR and overcoming T790M-induced resistance in animal models and lung cancer patients // *Molecular cancer therapeutics* / X. Xu [и др.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2016. – Т. 15 – С. 2586-2597.
74. ALK inhibitors and advanced non-small cell lung cancer / A. Rossi [и др.] // *International journal of oncology.* – 2014. – Т. 45. – №. 2. – С. 499-508.

75. Development of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors and molecular diagnosis in ALK rearrangement-positive lung cancer / E. Iwama [и др.] // *OncoTargets and therapy*. – 2014. – Т. 7. – С. 375.
76. Overcoming the resistance to crizotinib in patients with non-small cell lung cancer harboring EML4/ALK translocation / C. A. Perez [и др.] // *Lung cancer*. – 2014. – Т. 84. – №. 2. – С. 110-115.
77. Solomon B. Current status of targeted therapy for anaplastic lymphoma kinase–rearranged non–small cell lung cancer / B. Solomon, K. D. Wilner, A. T. Shaw // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2014. – Т. 95. – №. 1. – С. 15-23.
78. Helena A. Y. Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancers / A. Y. Helena, G. J. Riely // *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. – 2013. – Т. 11. – №. 2. – С. 161-169.
79. Crizotinib-resistant NPM-ALK mutants confer differential sensitivity to unrelated Alk inhibitors / M. Ceccon [и др.] // *Molecular Cancer Research*. – 2013. – Т. 11. – №. 2. – С. 122-132.
80. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK / R. Katayama [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Т. 108. – №. 18. – С. 7535-7540.
81. Discovery of brigatinib (AP26113), a phosphine oxide-containing, potent, orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase / W. S. Huang [и др.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2016. – Т. 59. – №. 10. – С. 4948-4964.
82. Rozamus L. W., Sharma P., inventors. WO2016065028 A1; 2016
83. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients / D. Planchard [и др.] // *Annals of Oncology*. – 2015. – Т. 26. – №. 10. – С. 2073-2078.
84. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non–small cell lung cancer harboring EGFR T790M / K. S. Thress [и др.] // *Nature medicine*. – 2015. – Т. 21. – №. 6. – С. 560.

85. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies / M. J. Niederst [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Т. 21. – №. 17. – С. 3924-3933.
86. Acquired resistance of EGFR-mutant lung cancer to a T790M-specific EGFR inhibitor: emergence of a third mutation (C797S) in the EGFR tyrosine kinase domain / A. Y. Helena [и др.] // *JAMA oncology*. – 2015. – Т. 1. – №. 7. – С. 982-984.
87. L718Q mutation as new mechanism of acquired resistance to AZD9291 in EGFR-mutated NSCLC / M. Bersanelli [и др.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2016. – Т. 11. – №. 10. – С. 121-123.
88. Heterogeneous mechanisms of primary and acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors / S. Ortiz-Cuaran [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Т. 22. – №. 19. – С. 4837-4847.
89. Binding mode of the breakthrough inhibitor AZD9291 to epidermal growth factor receptor revealed / Y. Yosaatmadja [и др.] // *Journal of structural biology*. – 2015. – Т. 192. – №. 3. – С. 539-544.
90. EGFR mutations and resistance to irreversible pyrimidine-based EGFR inhibitors / D. Ercan [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Т. 21. – №. 17. – С. 3913-3923.
91. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies / M. J. Niederst [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Т. 21. – №. 17. – С. 3924-3933.
92. Structure-and reactivity-based development of covalent inhibitors of the activating and gatekeeper mutant forms of the epidermal growth factor receptor (EGFR) / R. A. Ward [и др.] // *Journal of medicinal chemistry*. – 2013. – Т. 56. – №. 17. – С. 7025-7048.
93. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer / P. A. Jänne [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 372. – №. 18. – С. 1689-1699.

94. AZD9291 in treatment-naïve EGFRm advanced NSCLC: AURA first-line cohort / S. S. Ramalingam [и др.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2015. – Т. 10. – №. 9. – С. 319-320.
95. Acquired C797S mutation upon treatment with a T790M-specific third-generation EGFR inhibitor (HM61713) in non-small cell lung cancer / H. N. Song [и др.] // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2016. – Т. 11. – №. 4. – С. 45-47.
96. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies / M. J. Niederst [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Т. 21. – №. 17. – С. 3924-3933.
97. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients / D. Planchard [и др.] // *Annals of Oncology*. – 2015. – Т. 26. – №. 10. – С. 2073-2078.
98. Heterogeneous mechanisms of primary and acquired resistance to third-generation EGFR inhibitors / S. Ortiz-Cuaran [и др.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Т. 22. – №. 19. – С. 4837-4847.
99. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients / D. Planchard [и др.] // *Annals of Oncology*. – 2015. – Т. 26. – №. 10. – С. 2073-2078.
100. Acquired resistance to the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 is associated with increased dependence on RAS signaling in preclinical models / C. A. Eberlein [и др.] // *Cancer research*. – 2015. – Т. 75. – №. 12. – С. 2489-2500.
101. Overcoming EGFR (T790M) and EGFR (C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors / Y. Jia [и др.] // *Nature*. – 2016. – Т. 534. – №. 7605. – С. 129-132.
102. Challenges and perspectives on the development of small-molecule EGFR inhibitors against T790M-mediated resistance in non-small-cell lung cancer / Z. Song [и др.] // *J. Med. Chem.* – 2016. – Т. 59. – №. 14. – С. 6580-6594.
103. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IKA>

104. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4ZAU>
105. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5D41>