

АННОТАЦИЯ

Объектами исследования в представленной работе являются ингибиторы, содержащие азаиндольный скаффолд.

В настоящей работе разработан синтетический подход к получению производного 3-(1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-ил)-1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридина, которое представляет интерес как вещество, обладающее биологической активностью, и был синтезирован ряд новых соединений, которые охарактеризованы посредством ЯМР-спектроскопии.

ABSTRACT

The title of the graduation work is “Synthesis and cytotoxicactivity of azaindole derivatives”.

This work is devoted to obtaining 3-(1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-4-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives, assessing their cytotoxicity and biological activity. The key issue of the graduation work is the development of a methodology for these derivatives.

We studied a large literature corpus in order to find out what azaindole derivatives inhibit kinases and find the optimal synthesis method of such compounds. We then perform the experimental part of the work and analyze the obtained substances.

This graduation work consists of an introduction on 1 page, a conclusion, the list of 146 references all of which are foreign sources. The text of the work contains 37 schemes of chemical reactions, 8 figures, 2 tables and 196 structural formulas.

The first part of the work illustrates the growing use of azaindole derivatives as kinase inhibitors. The different protein kinases which have served as targets and the known molecules which have emerged from medicinal chemistry and Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) programs are presented. The various synthetic routes are used to access these compounds and the chemical pathways leading to their synthesis are also discussed.

In the second part, the synthetic way is presented and its relevance is proved. By the example of one of the target products, its NMR spectra are considered.

The experimental part describes the procedures of the synthesis of original compounds and reaction products. All the substances obtained were analyzed by NMR (¹H).

In conclusion, we emphasize that a synthetic approach to the construction of these 3-(1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-4-yl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine derivatives has been developed, and a number of new compounds have been obtained, exhibiting biological activity.

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

| | |
|---|----|
| ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ | 6 |
| ВВЕДЕНИЕ | 9 |
| 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР | 10 |
| 1.1 Введение | 10 |
| 1.2 Азаиндолы как ингибиторы киназ | 13 |
| 1.2.1 Ингибиторы ALK киназы | 13 |
| 1.2.2 Ингибиторы Auroга киназы | 13 |
| 1.2.3 Ингибиторы Cdc7 | 17 |
| 1.2.4 Ингибиторы CHK1 | 22 |
| 1.2.5 Ингибиторы c-Met киназы | 23 |
| 1.2.6 Ингибиторы DYRK1A киназы | 25 |
| 1.2.7 Ингибиторы FAK | 28 |
| 1.2.8 IKK2 ингибиторы | 28 |
| 1.2.9 Ингибиторы JAK2 | 30 |
| 1.2.10 Двойные ингибиторы KIT/FMS киназы | 32 |
| 1.2.11 Ингибиторы PAK1 киназы | 33 |
| 1.2.12 Ингибиторы p38 α MAP киназы | 34 |
| 1.2.13 Ингибиторы PIMкиназы | 37 |
| 1.2.14 Ингибиторы P13 киназы | 38 |
| 1.2.15 Ингибитор B-Raf киназы | 39 |
| 1.2.16 Ингибиторы Rho-киназы (ROCK) | 40 |
| 1.2.17 Ингибитор m-TORкиназы | 42 |
| 1.2.18 Ингибитор TtkАкиназы | 44 |
| 1.2.19 Способ связывания азаиндола | 45 |
| 1.2.20 Натуральные продукты как ингибиторы киназы | 48 |
| 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ | 57 |
| 2.1 Синтез ингибитора | 57 |
| 2.2 Биологические испытания | 59 |
| 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 60 |
| 3.1 Реагенты и оборудование | 60 |
| 3.2 Синтез целевых соединений | 61 |

| | | |
|-------|-------------------------------------|-----|
| 3.3 | Биологические испытания | 63 |
| 3.3.1 | Культивирование клеток..... | 63 |
| 3.3.2 | Исследования цитотоксичности..... | 63 |
| | ВЫВОДЫ | 645 |
| | СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 66 |

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

| | |
|------------------|--|
| Asp | аспарагиновая кислота |
| aq. | водный |
| Ar | арил |
| Boc | <i>трет</i> -бутоксикарбонил |
| BOM | бензилоксиметил |
| Bu | бутил |
| CDKs | циклин-зависимые киназы |
| DABCO | 1,4-диазабцикло[2.2.2]октан |
| DBU | диазабциклоундецен |
| DCE | 1,2-дихлорэтан |
| DCM | дихлорметан |
| DEAD | диэтилазодикарбоксилат |
| DIPEA | диизопропилэтиламин |
| DMAP | 4-диметиламинопиридин |
| DME | 1,2-диметоксиэтан |
| DMF | диметилформамид |
| DMSO | диметилсульфоксид |
| dppf | 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен |
| equiv. | эквивалент |
| Et | этил |
| FGFR | рецепторы фактора роста фибробластов |
| Glu | глутаминовая кислота |
| h ν | облучение светом |
| IC ₅₀ | концентрация полумаксимального ингибирования |
| <i>in silico</i> | компьютерное моделирование |
| <i>in situ</i> | без выделения |
| <i>in vitro</i> | в лабораторных условиях |
| <i>in vivo</i> | в живом организме |
| <i>i</i> -Pr | изопропил |
| KDR | рецептор домена включения киназы |
| LDA | диизопропиламид лития |
| Lys | лизин |

| | |
|----------------|--|
| MAP | активированный митогеном белок |
| MAPK | митоген-активированная протеинкиназа |
| <i>m</i> -CPBA | <i>m</i> -хлорпербензойная кислота |
| Me | метил |
| Met | метионин |
| Ms | мезил |
| MW | микроволновое излучение |
| NBS | <i>N</i> -бромсукцинимид |
| NIS | <i>N</i> -йодосукцинимид |
| NMP | <i>N</i> -метил-2-пирролидон |
| PDGFR | рецептор тромбоцитарного фактора роста |
| Ph | фенил |
| PLKs | подобные поло киназы |
| POMCl | пивалоксиметилхлорид |
| Py | пиридин |
| QSAR | количественные модели отношения структура-активность |
| refl | кипячение с обратным холодильником |
| r.t. | комнатная температура |
| SAR | отношение структура-активность |
| SEM | [2-(триметилсилил)этокси]метильная группа |
| SEMCl | 2-(триметилсилил)этоксиметилхлорид |
| SMILES | спецификация упрощённого представления молекул в строке ввода |
| <i>S</i> -Phos | 2-дициклогексилфосфин-2' , 6'-диметоксибифенил |
| TBAF | фторид тетрабутиламония |
| TBTU | O-(бензотриазол-1-ил) - <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ' , <i>N</i> '-тетраметилуридий тетрафторборат |
| Tf | трифлат |
| TFA | трифторуксусная кислота |
| THF | тетрагидрофуран |
| THP | 2-тетрагидропиранил |
| Thr | треонин |
| TMSCl | триметилхлорсилан |
| TMS | тетраметилсилан |

| | |
|-------|--|
| TMSI | триметилйодсилан |
| Ts | тозил |
| Tyr | тирозин |
| Val | валин |
| VEGFR | фактор ростаэндотелиясосудов |
| АТФ | аденозинтрифосфат |
| ГЦК | гепатоцеллюлярная карцинома |
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ПОМ | полиоксиметилен |
| ХОБЛ | хроническая обструктивная болезнь лёгких |

ВВЕДЕНИЕ

Производные азаиндола занимают важное место в медицинской химии, потому что обладают биологической активностью. Они проявляют антионкогенную, противоопухолевую и антибактериальную активность. К сожалению, такие болезни как онкология и туберкулез остаются серьёзной проблемой здравоохранения во всем мире. Поэтому для повышения эффективности лечения этих заболеваний требуются новые лекарства и терапевтические стратегии. До сих пор ведутся активные поиски новейших, более эффективных и безопасных лекарственных веществ с азаиндолным scaффолдом [1]. На данный момент наиболее значимым противоопухолевым средством является препарат вемурафениб, продаваемый как Зельбораф[2].

На основании вышеизложенного, вполне очевидно, что синтез новых комбинаторных библиотек низкомолекулярных производных азаиндола с последующим скринингом их биологической активности является крайне актуальной задачей.

Целью настоящей работы является разработка синтетического подхода к получению полифункциональных азаиндолов в качестве ингибиторов протеинкиназ.

Для успешной реализации цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать синтетическую методологию получения производных 3-(1,2,3,6-тетрогидропиридин-4-ил)-1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридина;
2. Синтезировать библиотеку данных производных азаиндола;
3. Исследовать цитотоксичность представителей синтезированной комбинаторной библиотеки в отношении клеточной линии сверхэкспрессирующей EGFR киназу.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

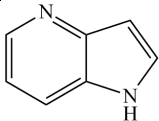
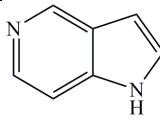
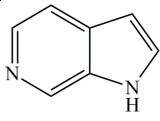
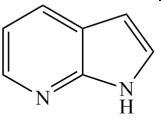
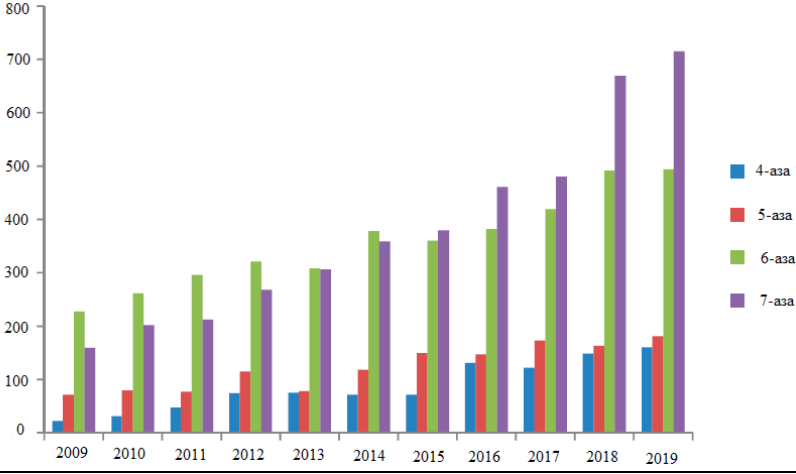
1.1 Введение

Азаиндолы и их производные обладают широким спектром биологической активности, поэтому использование этих структур применяется в создании новых лекарственных средств. Четыре позиционных изомера азаиндола, которые по своему строению связывают пиридин и пиррольное кольцо посредством конденсированной связи C-C, обладают всеми необходимыми критериями, чтобы быть хорошими биоизостерами для индольной или пуриновой систем. Такие структуры отличаются заменой sp^2 гибридизованного фрагмента CH на sp^2 гибридизованный атом азота.

Редко встречающиеся в природе азаиндолы представляют интерес с точки зрения стратегий оптимизации лекарств [3-5]. Правило Липински, растворимость, pK_a и липофильность, связывание с мишенью и свойства ADME-tox можно модулировать точно доработать при использовании азаиндольного ядра вместо других бициклических конденсированных гетероциклов [6-15]. Азаиндолы были признаны привилегированными структурами в модуляции биологических процессов, в области медицинской химии и программах по обнаружению лекарств [16-21]. Такие соединения становятся коммерчески доступными, и происходит внедрение инноваций. Специализированные исследовательские центры химических структур исследуют азаиндолы с постоянно появляющимися новыми синтезами и неизвестными структурами.

При рассмотрении вопроса об использовании азаиндольного скаффолда вместо индольного в активных препаратах на первый взгляд чаще встречается 5-азаиндольный изомер, по-видимому, из-за его сильной гомологии с 5-гидроксииндолом - главным метаболитом индола, который присутствует в нескольких биомолекулах (например, серотонин, мелатонин, 5-НИА, 5-ОНДРАТ), но это мнение ошибочно. Самыми популярными азаиндолами являются *N*-7 изомеры, для которых было получено больше, чем 100000 структур, а число коммерчески доступных производных в два раза больше, чем всех других изомеров в отдельности. Поэтому они являются запатентованными структурами (Таблица 1).

Таблица 1–Статистические данные о структуре азаиндола в химической литературе.

| Каркас азаиндола | 4-азаиндол | 5-азаиндол | 6-азаиндол | 7-азаиндол |
|---|---|---|---|---|
| Прямое исследований подструктуры ^a |  |  |  |  |
| Scifinder | | | | |
| Химические структуры | 16505 | 13632 | 34762 | 100384 |
| Коммерчески доступные | 2517 | 2006 | >2749 | 4273 |
| Список литературы (патенты) | 2158 (1187) | 2923 (961) | 10497 (1756) | 6576 (2863) |
| Динамика изменения ссылок с 2009 по 2019 |  | | | |
| Reaxys | | | | |
| химические структуры | 9701 | 8058 | 27,655 | 58,082 |
| Коммерчески доступные | 707 | 639 | 1116 | 3503 |
| Ссылки (патенты) | 583 (586) | 724 (477) | 3461 (890) | 3951 (2026) |
| E молекулы | 128 | 150 | 138 | 2300 |
| Ambinter | 1105 | 1395 | 4132 | > до 10000 |

^a: Поиск, проведенный 5 июля 2014 года с использованием азаиндольного каркаса в качестве химической подструктуры.

Составить подробный обзор, охватывающий все биологически активные производные азаиндола практически невозможно. Существует несколько обзоров, в которых собраны методы, ведущие к этим соединениям, основанные на особенной биологической активности [22–25]. Для поиска синтеза ингибиторов киназ исследователи используют добровольно выбранные домены. И с 2009 года исследователи принимали участие в открытии новых ингибиторов киназы, в результате было получено несколько сильно активных и оригинальных серий [26–31].

Среди различных биологических мишеней для производных азаиндола предпочтительными являются киназы, так как присутствие дополнительного атома азота увеличивает возможные места в активном центре АТФ, что требует хорошо расположенных водородных связей донорно-акцепторных систем [32]. Несколько

производных азаиндола появились по программе медицинской химии и некоторые из них являются кандидатами в качестве лекарств для лечения заболеваний человека.

Геном человека состоит из более чем 500 членов протеинкиназы, тем самым, делая его одним из самых больших семейств генов. Протеинкиназы играют преобладающую регуляторную роль практически во всех аспектах клеточной биологии. Они регулируют апоптоз, клеточный цикл, перестройку цитоскелета, дифференцировку клеток, иммунную реакцию, функции нервной системы и транскрипцию. По этим причинам нарушение регуляции протеинкиназ встречается при различных заболеваниях, включая диабет [33,34], воспалительные процессы [35,36], сердечно-сосудистые [37–39] и нервные расстройства [40,41]. Более того, общепризнанно, что протеинкиназы являются отличными мишенями в онкологии. Ингибирование киназ клеточного цикла применяется в исследованиях рака [42]. Новые подходы к разработке ингибиторов тирозинкиназы и их роли в борьбе с раком широко обсуждаются с целью открытия микро-целевых методов лечения [43]. Среди тирозинкиназ, наблюдаемых в митохондриях, Src-киназы являются наиболее важными по модуляции окислительного фосфорилирования и апоптоза [44]. Аберрантный рост раковых клеток объясняется нарушением регуляции клеточного цикла и деления клеток. Ядерные киназы, ответственные за прогрессирование клеточного цикла, включая циклинзависимые киназы (CDK), киназы контрольных точек (CHKs), авроракиназы, полоподобные киназы (PLK), были исследованы в качестве мишеней для лекарств [45]. В биологии протеинкиназы Erb B/HER являются одними из наиболее изученных семейств клеточных сигналов. Нисходящие сигнальные модули Erb B включают путь фосфатидилинозитол-3-киназы/AkT (PKB), путь Ras/Raf/Met/Erk1/2 и путь фосфалипазы C [46]. P1M киназы принадлежат к семейству серин-треониновых протеинкиназ, состоящих из 3 членов. P1M киназы ответственны за регуляцию клеточного цикла, антиапоптотическую активность, хоминг и миграцию рецепторных тирозинкиназ, опосредованных через JAK/STAT-путь. Также было обнаружено, что P1M-киназы активируются при многих гематологических злокачественных новообразованиях и серьёзных опухолях. Перечисление всех киназ, которые являются или однажды станут мишенью в онкологии - задача не из легких. Их число ежегодно увеличивается, и во многих случаях они впервые связаны с различными патологиями. Чтобы проиллюстрировать в какой степени производные азаиндола используются в качестве ингибиторов киназы, и их вклад в открытие лекарств, опишем различные протеинкиназы, которые служат мишенями, и известные молекулы, появившиеся в результате программы медицинской химии и программы обнаружения лекарств на основе фрагментов (FBDD). Представлены общие структурные особенности, которые необходимы для

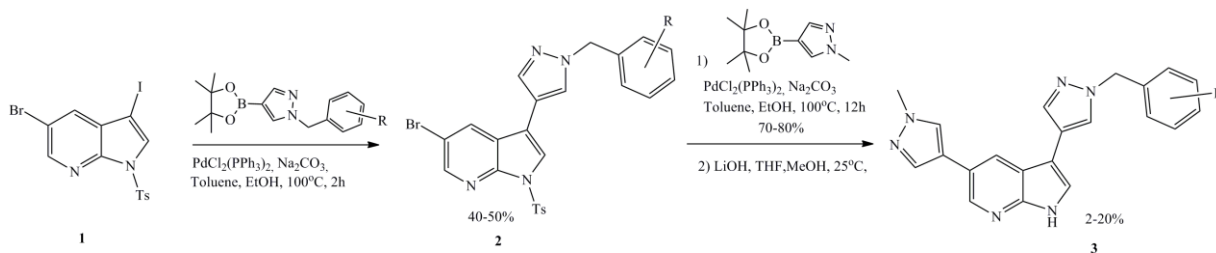
способа действия оптимизированных лекарств. Также описано исследование анализа режима связывания, которое помогает лучше понять взаимодействие азаиндольных гетероциклов с сайтом связывания АТФ.

1.2 Азаиндолы как ингибиторы киназ

1.2.1 Ингибиторы ALK киназы

Анаплазматическая киназа лимфомы (ALK) представляет собой трансмембранную рецепторную тирозинкиназу (RTK), фармакологически участвующую в развитии мозга, которая оказывает свое влияние на специфические нейроны нервной системы. Эта киназа является возможной мишенью в онкологии, и несколько азаиндолов были признаны хорошими ингибиторами [47,48]. Производные 3,5-дизамещенного 7-азаиндола (**3**) получают в две стадии из 5-бром-3-йод-1-тозил-7-азаиндола (**1**) после двух последовательных реакций перекрестного сочетания, катализируемых палладием, с использованием 1- (замещенного)бензил- и 1-метил-3-боронат имидазолов. Первая региоселективная реакция идет по положению C-3, а вторая – по положению C-5 (схема 1).

Схема 1 – Получение нескольких производных 3,5-дизамещенного-7-азаиндола



| | ALK WT | ALK (L1196M) |
|---------------------|--------|--------------|
| 3a R=3-F | 5.6 | 35 |
| 3b R=3-OH | 41 | 200 |
| 3c R=2,5-diF | 29 | 124 |
| 3d R=3,5-diF | 6 | 47 |

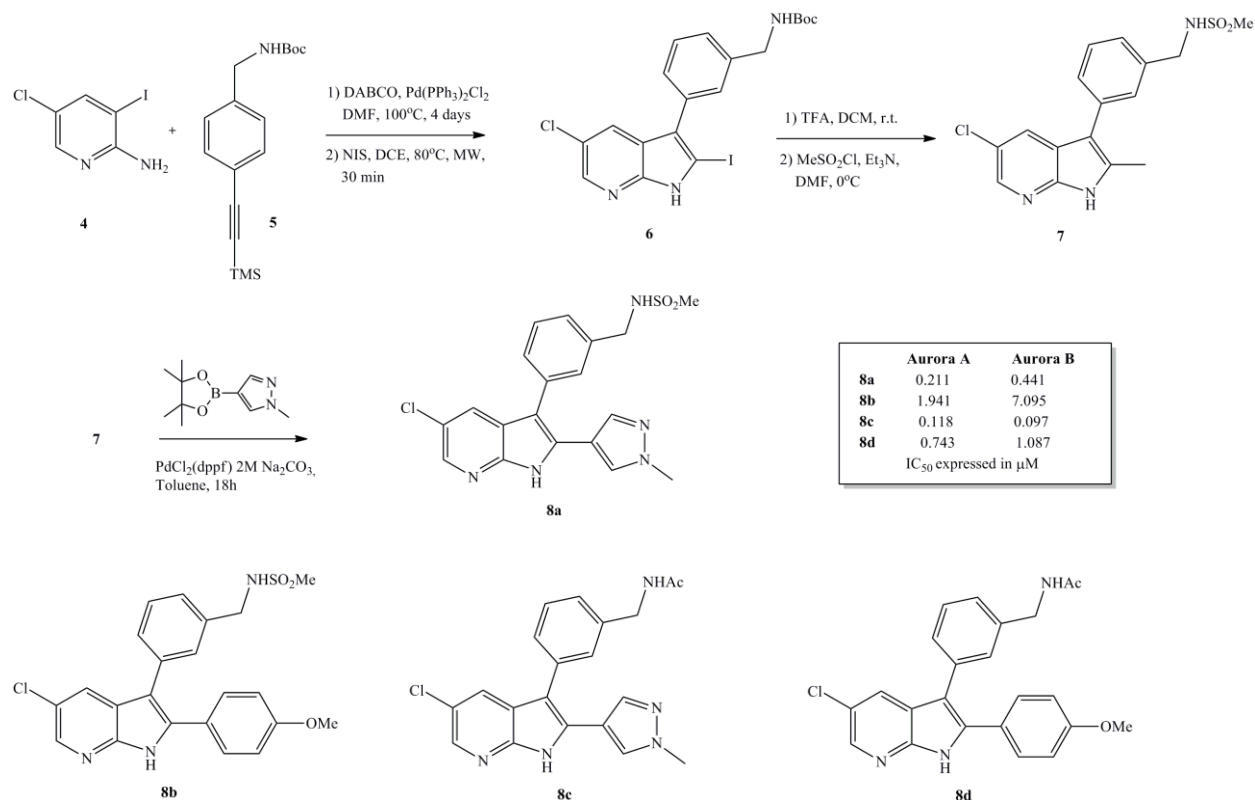
IC₅₀ expressed in nM

1.2.2 Ингибиторы Auroга киназы

Auroга киназа была открыта и изучена как противораковая мишень в 1990-х годах [49]. Это семейство состоит из трех киназ, обозначенных как Auroга А, В и С, которые играют ключевую и особую роль на разных стадиях митоза [50]. Зарегистрировано много различных типов активных ингибиторов Auroга киназы, и среди них есть достаточно конкурентоспособные 7-азаиндолы. Образование азаиндольного скелета осуществляется путем конденсации алкина **5** с 2-амино-3-йод-5-хлорпиридином (**4**) в присутствии DABCO и Pd(PPh₃)₂Cl₂ (схема 2) [51]. Удаление триметилсилана (TMS) в присутствии NIS дает 2-йодпроизводное **6**. Снятие защиты N-Вос с последующим образованием сульфонида приводит к образованию соединения **7**, которое вводят в

реакцию перекрестного сочетания Сузуки-Мияуры со сложным эфиром гетер(арил)бороната. Соединение **8a** получают с помощью системы *N*-метилпиразола в *C*-2. Таким образом, получают еще три соединения по аналогичной стратегии, и испытания показали, что **8c** является наиболее активным производным.

Схема 2 – Синтез соединения **8**



В другом примере пиразольный скаффолд добавлен к 7-азаиндольному фрагменту в положение *C*-4, что приводит к селективному ингибитору Aurora B/C GSK 1070916 (**15**) [52,53]. Синтез этого соединения основывается на селективном перекрестном сочетании Сузуки 4-бром-2-йод-1-(фенилсульфонил)-1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридина (**9**) с разнообразными фенилбороновыми кислотами с получением 2-арильных промежуточных соединений **10** с хорошим выходом (схема 3).

Синтез GSK 1070916 проводят с 4-бром-2-(3-формилфенил)-1-фенилсульфонил-1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридином (**11**) во второй реакции сочетания с пинаколиновым эфиром *N*-этилиндзобороната (**12**). При этом получается нитропроизводное **13** с выходом 81%. Восстановительное аминирование формильной группы в **14** достигается с помощью диметиламина и триацетоксиборгидрида натрия с выходом 87%. Восстановление нитрогруппы в **14** цинком в уксусной кислоте сопровождается введением функциональной группы мочевины для получения соединения **15**. Интересно, что первое ключевое арилирование по Сузуки проводилось избирательно в положение *C*-2 путем замещения

атома йода на атом брома в положение C-4 азаиндольного фрагмента, несмотря на стерическое затруднение, вызванное защитной группой в азаиндоле [54]. Синтез **18** осуществляется из 4-боронатного пинаколинового сложного эфира-7-азаиндола (**16**), который реагирует с функционализированным бромпроизводным **17** с получением соединения **18**, выход которого составляет 49%.

Соединение **22** незамещенное в C-2 7-азаиндольного фрагмента и соединение **27** без мочевиной цепи в пиразольном кольце получают для того, чтобы формально установить минимальный фармакофор GSK1070916 (схема 4) [55]. Таким образом, 4-бром-7-азаиндол (**20**) и (1-этил-3-(4-нитрофенил)пиразол-4-ил)бороновый эфир пинакола (**19**) связывают в присутствии $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ и карбоната калия с получением **21** с выходом 85%. Восстановление нитрогруппы достигается использованием цинка в уксусной кислоте с последующей реакцией аминогруппы с диметилкарбамоилхлоридом с получением желаемого производного **22** (схема 4) [52]. Аналогично, синтез соединения **27** возможен посредством двух последовательных катализируемых $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ реакций сочетания с последующей функционализацией ароматического альдегида путем восстановительного аминирования.

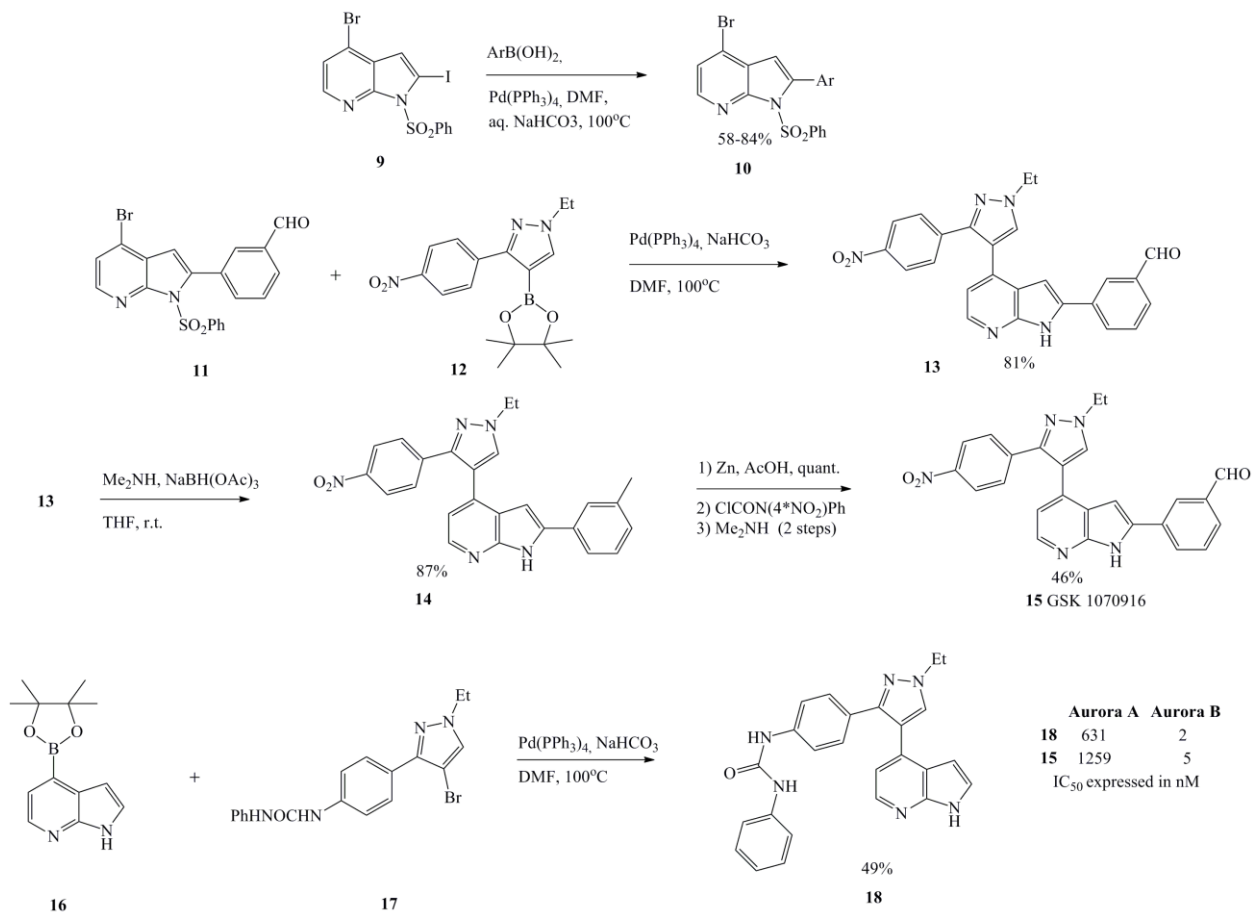


Схема 4 – Синтез **22** и **27** соединений

Подавление арилмочевины приводит к исчезновению селективности (**27**, IC₅₀ Aurora A/Aurora B 128/5,7 нМ). Предполагается, что замена атома хлора в C-5 ароматического кольца может нарушить копланарность пиразольного и азаиндольного колец, чтобы более точно имитировать конформацию GSK1070916. Из производного 2-амино-3-йодпиридина **28** в результате реакции перекрестного сочетания Соногаширы с последующим индуцированием кольца основанием получают конечное производное

азаиндола **30** (схема 5 и таблица 2), которое можно рассматривать как полностью селективный двойной ингибитор Aurora A и B, и эффективной отправной точкой для разработки другого класса ингибиторов Aurora B. Исследователями сообщалось о 3D QSAR и молекулярном докинге, а также клеточных эффектах и флуоресцентно-активированном анализе сортировки клеток [56].

Схема 5 – Синтез **30** соединения

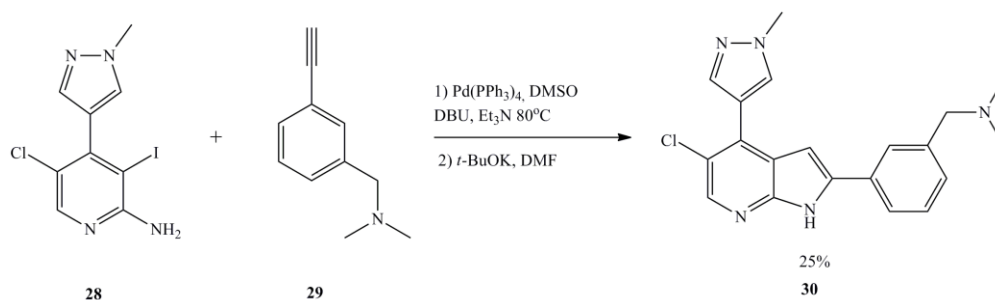


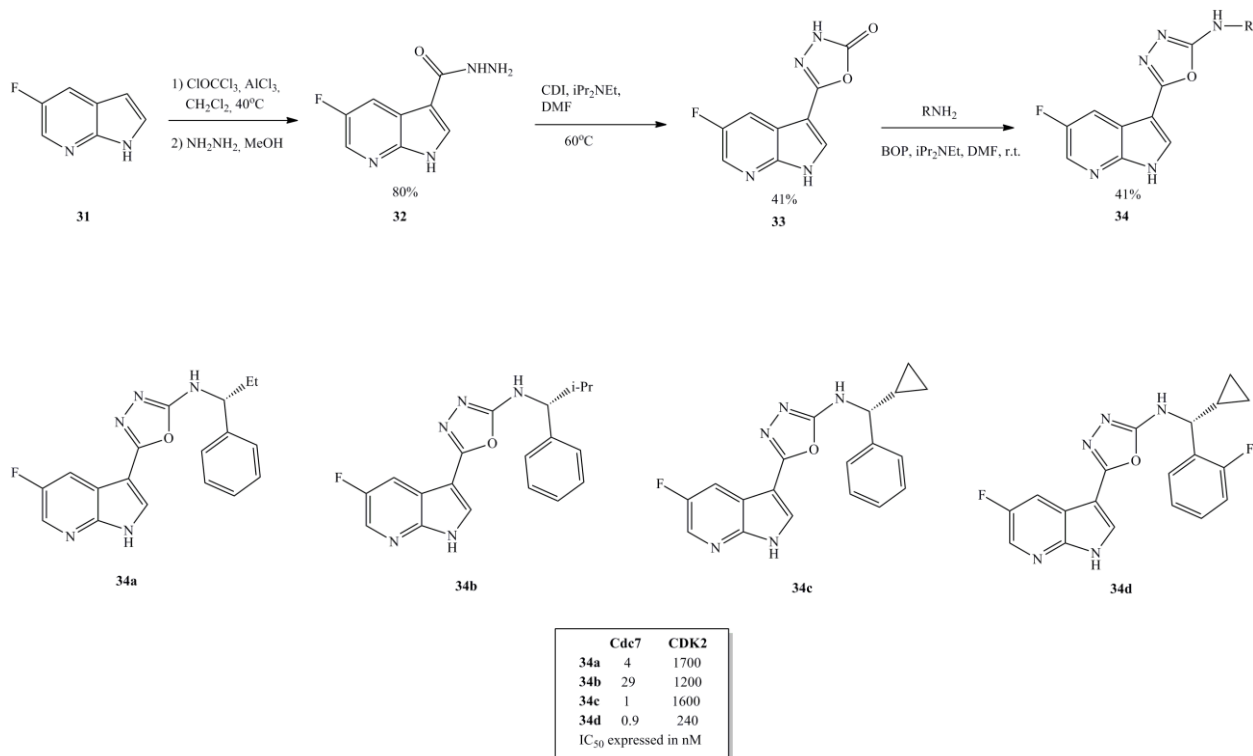
Таблица 2 – Aurora A и B ингибирование, значения IC_{50} для соединений **22**, **27**, **30**, GSK1070916

| IC_{50} μ M | 22 | 27 | 30 | GSK1070916 |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Aurora A | 10000 | 128 | 6.2 | 1100 |
| Aurora B | 26 | 5.7 | 0.51 | 3.2 |

1.2.3 Ингибиторы Cdc7

Цикл клеточного деления 7 (Cdc 7) представляет собой протеинкиназу серина/треонина, участвующую в инициации репликации ДНК, главным образом, в S-фазе. Ингибиторы Cdc7 могут быть использованы в качестве отдельных агентов или в сочетании с другими видами химиотерапии [57]. Были разработаны перорально активные ингибиторы 7-азаиндола Cdc7 (схема 6). Начиная с 5-фтор-7-азаиндола (**31**), ацилирование идет по положению C-3 трихлорацетилхлоридом с последующей реакцией с гидразином. При этом получается производное гидразина **32** с выходом 80%. Дальнейшая реакция с 1,1'-карбонилдиимидазолом приводит к соединению **33** с выходом 41%. Это соединение конденсируют с различными первичными аминами в условиях пептидного сочетания с получением библиотеки из 12 производных типа **34**. Лучший ингибитор **34d** направлен на желаемый фермент в наномолярном спектре с очень высокой селективностью между CDK1, 2 и 9 (IC_{50} 240, 1600, 31 нМ соответственно). Также были описаны данные ADME-тох и клеточные эффекты [57].

Схема 6 – Синтез ингибитора Cdc7 **34**



В поисках ингибиторов Cdc7, проявляющих селективность в отношении функционально связанной CDK2 киназы, был исследован синтез различных производных 5-азаиндола (схема 7 и таблица 3). Первоначальный высокопроизводительный скрининг (HTS) выявил, что замещённый в положении C-6 атомом хлора индол **38** обладает хорошей селективностью в отношении Cdc7 по сравнению с CDK2. 3-Йод-5-азаиндол (**35**) сначала *N*-арилуют 4-хлорпиримидином по реакции *S_NAr*, получая соединение **36**. Сочетание Сузуки с различными арил- или гетероарилбороновыми кислотами в присутствии Pd(PPh₃)₄ даёт соединение **37** с выходом 5–49%. Затем получают замещённые производные 5-азаиндола **39** и **40**, которые, к сожалению, не обладают хорошей активностью. Другие изомерные 4-,6-,7-азаиндолы показали более низкую ингибирующую активность/селективность и не улучшали метаболическую стабильность [58]. Можно предположить, что потеря активности могла быть вызвана тем, что пиримидин в шарнирном связующем ориентирован вне предпочтительной конформации связывания из-за внутримолекулярного отталкивания азота/азота азаиндола/пиримидина. Двугранное исследование предсказало эффективность ингибиторов, которые требовали как планарной, так и *син*-конформации [58].

Схема 7 – Синтез Cdc7 ингибитора **37**

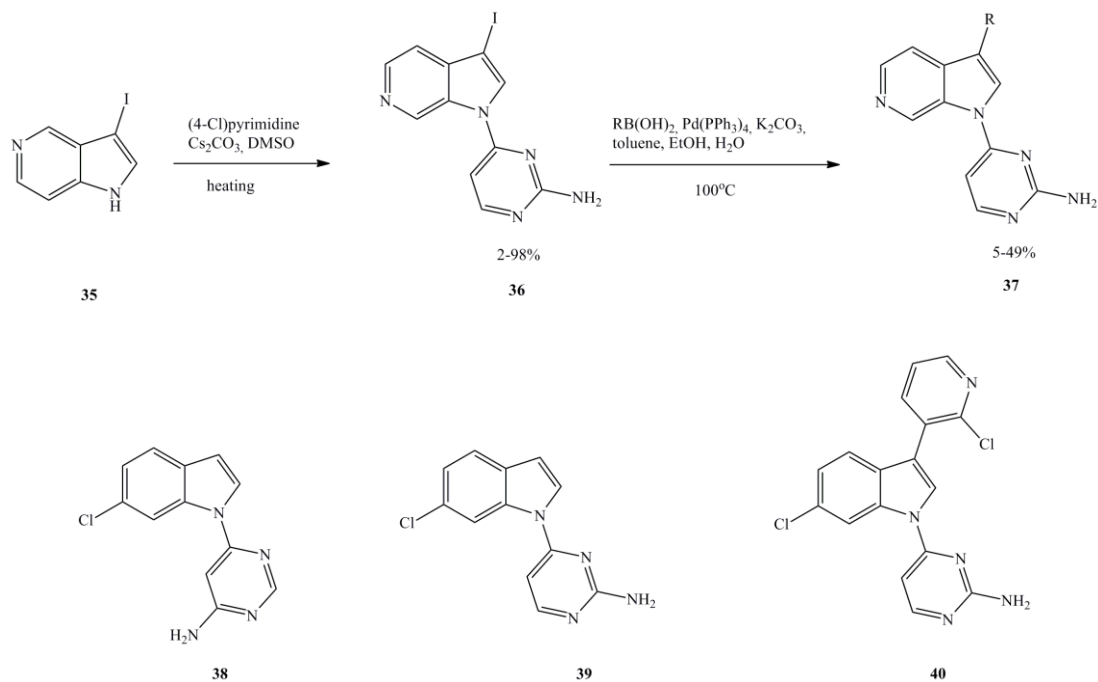


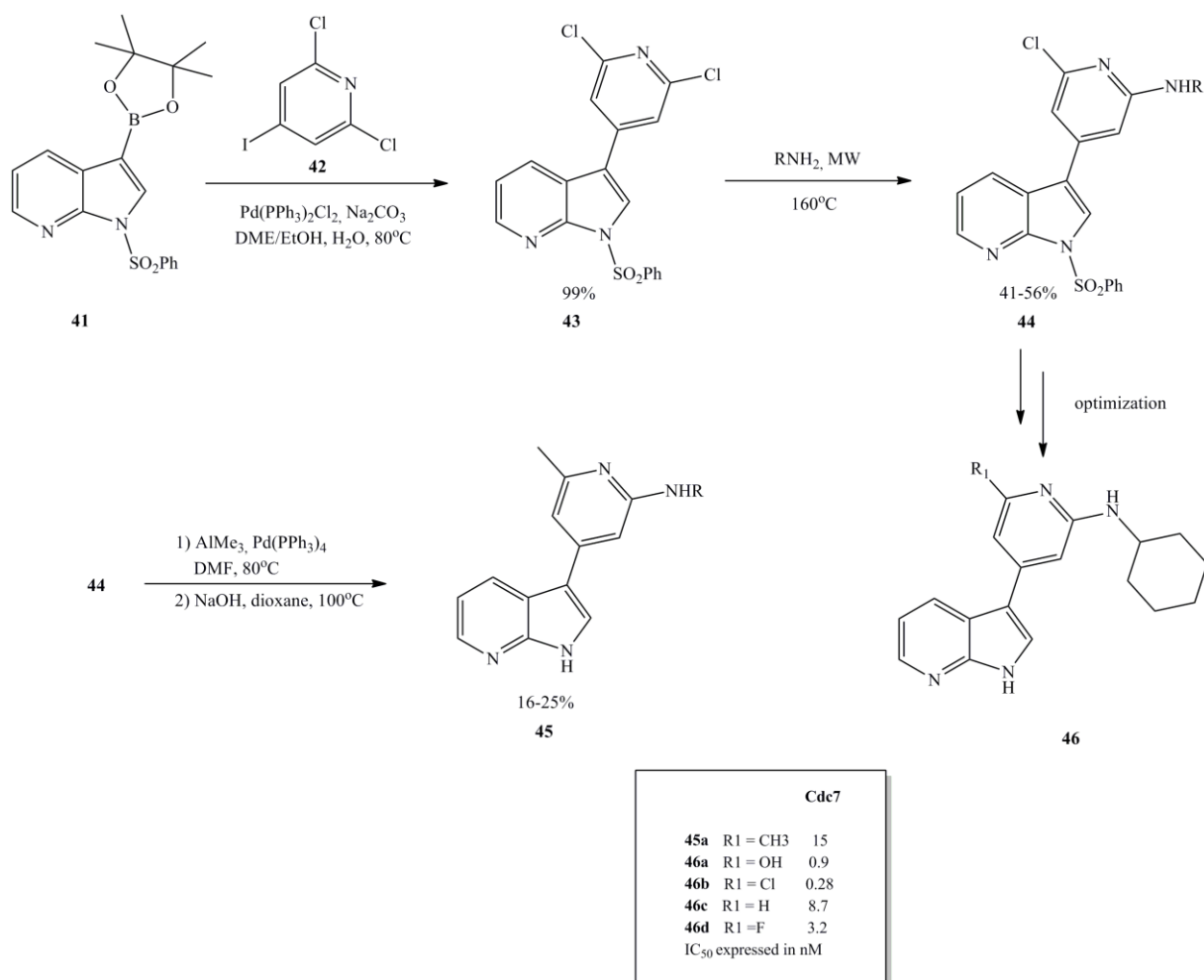
Таблица 3 – SAR ингибиторов Cdc7 **37–40**

| Соединение | R | IC ₅₀ Cdc7 (μM) | IC ₅₀ CDK2 (μM) |
|------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 37a | H | 0.98 | 3.7 |
| 37b | C ₆ H ₄ | 0.10 | 0.31 |
| 37c | 2-ClC ₆ H ₄ | 0.011 | 0.11 |
| 37d | 3-ClC ₆ H ₄ | 0.16 | >83 |
| 37e | 4-ClC ₆ H ₄ | 0.33 | 0.06 |
| 37f | 3-пиридинил | 0.16 | 1.1 |
| 37g | 3-(2-хлорпиридинил) | 0.007 | 0.31 |
| 37h | 4-пиридинил | 0.25 | 0.16 |
| 37i | 3-фуранил | 0.12 | 0.10 |
| 37j | 3-пиразол | 0.58 | 0.55 |
| 38 | - | 0.066 | 3.7 |
| 39 | - | 0.66 | 38 |
| 40 | - | 0.03 | >80 |

Также исследователи сообщили о своем процессе оптимизации, который успешно привел к тому, что ингибиторы Cdc7 имеют ядро 7-азаиндола [59]. Незамещенный у атома азота пиррол необходим для повышения активности. 7-азаиндол-3-боронат (**41**) подвергают взаимодействию с 4-йод-2,6-дихлорпиридином (**42**) с получением соединения **43** с выходом 99% (схема 8). Различные первичные амины, такие как циклогексиламин, 4-гидроксициклогексиламин и бензиламин, подвергаются микроволновому облучению при 160°C с получением соединения **44**, выход которого составляет 41-56%. Введение метильной группы достигается с помощью триметилалюминия в присутствии Pd(PPh₃)₄. Отщепление бензолсульфонильной группы в основных средах дает простой синтез соединений типа **45** с низкими выходами (16–25%). Модификация 7-азаиндола не

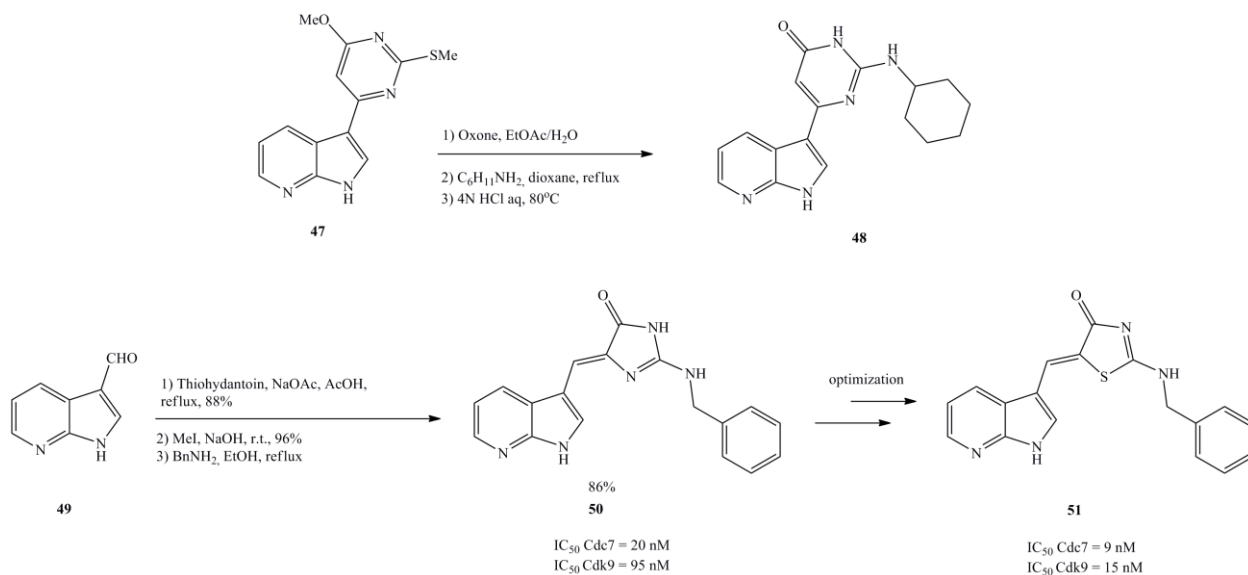
проводилась, и другие производные, которые дополнили библиотеку, были сосредоточены на модуляции фракции C-3 пиридина. Использование атома фтора, циано-, гидроксил и первичного амида, и наилучшее ингибирование Cdc7 имеет место с заместителями циклопропиламина и гидроксилпиридина. Попытки кристаллизовать Cdc7 не увенчались успехом. Информация о структуре получена в результате стыковки лиганда в гомологические модели киназ Cdc7. Так же при использовании кристаллографических исследований лиганд-связанных рекомбинантных киназ, таких как PIM или GSK3 β . Способ связывания был выяснен с помощью сокристаллической рентгеновской структуры **50** (X = Cl) в рекомбинантной белке GSK3 β , подтверждающей, что 7-азаиндольный фрагмент молекулы является шарнирно-связывающим мотивом с пиридином, направленным к сохранившемуся остатку лизина. Изгиб пиридинового кольца относительно азаиндола более плоский, примерно на 10 ° от ожидаемого для бисарильной системы. Замена атома хлора на атом водорода или метильную группу приводит к более слабым гидрофобным взаимодействиям с Met 134 и Val 195, что снижает ингибирование Cdc7.

Схема 8 – Синтез ингибитора Cdc7 **45**



Аналогичным образом, соединение **48** получают путем замещения группы SO₂Me в соединении **47** циклогексиламино в кипящем диоксане с последующим образованием пиримидона в кислой среде (схема 9). Соединение **47** связывается с Cdc7 и имеет значение K_i 0,07 нМ [60]. Производные 1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридина также были идентифицированы как ингибиторы Cdc7 [61]. 7-азаиндолилиденимидазолы **50** получают конденсацией тиогидантоина с 7-азаиндол-3-карбоксальдегидом (**49**). Соединение **50** с *N*-бензильным заместителем в положении *C*-2 из имидазолонового кольца имеет значение IC₅₀ 20 нМ и является более активным производным, чем производное с фенилом. *E* или *Z* конфигурация двойной связи влияют на процесс связывания с киназой с изомером *Z*, что приводит к лучшим взаимодействиям. Тио производное **51** является лучшим активным лекарственным средством (IC₅₀ Cdc7 = 9 нМ), но с пониженной селективностью по отношению к CDK9 (IC₅₀ = 15 нМ).

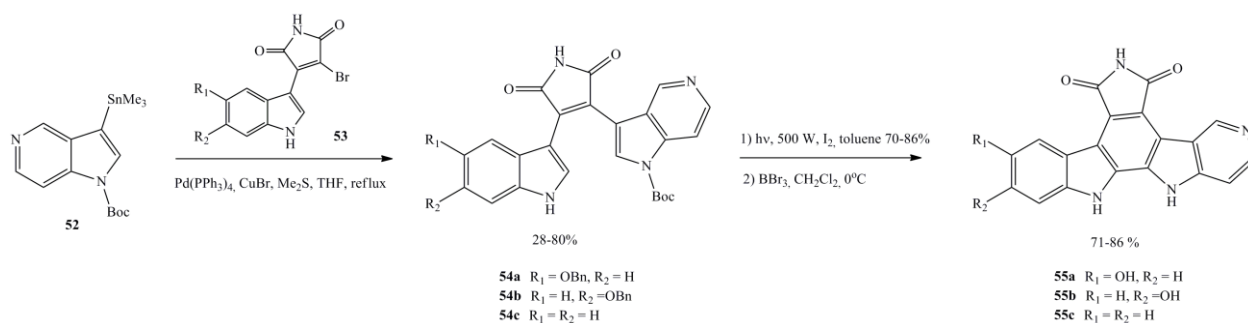
Схема 9 – Синтез Cdc7 ингибиторов **48** и **50**



1.2.4 Ингибиторы ЧНК1

Киназа контрольной точки клеточного цикла 1 (ЧНК1) представляет собой серин/треонинкиназу, занимающую центральное место в механизмах регуляции клеток и репарации ДНК. Известно о синтезе 5-азаиндолокарбазолов **55** в качестве цитотоксических агентов и ингибиторов ЧНК1 [30]. Реакция Стилле 1-Вос-3-триметилстаннил-5-азаиндола (**52**) с индолброммалеимидами **53** дает 3-(5-азаиндолил)-5-индолилмалеимиды **54** с выходами 28-80% (схема 10). Циклизация с образованием карбазольного каркаса **55** достигается ультрафиолетовым облучением в присутствии йода с хорошими выходами (70–86%). Удаление бензильной группы достигается реакцией с избытком трибромида бора в дихлорметане при 0° С, присутствие гидроксизаменителей в соединении **55** дает больше активных производных, чем незамещенных. Соединение **55b** является наиболее активным по отношению к Chk1 ($IC_{50} = 14 nM$), отсутствие замещения в индольном кольце ($R_1 = R_2 = H$) снижает активность до микромолярного диапазона (**55c**, Chk $IC_{50} = 1,5 \mu M$).

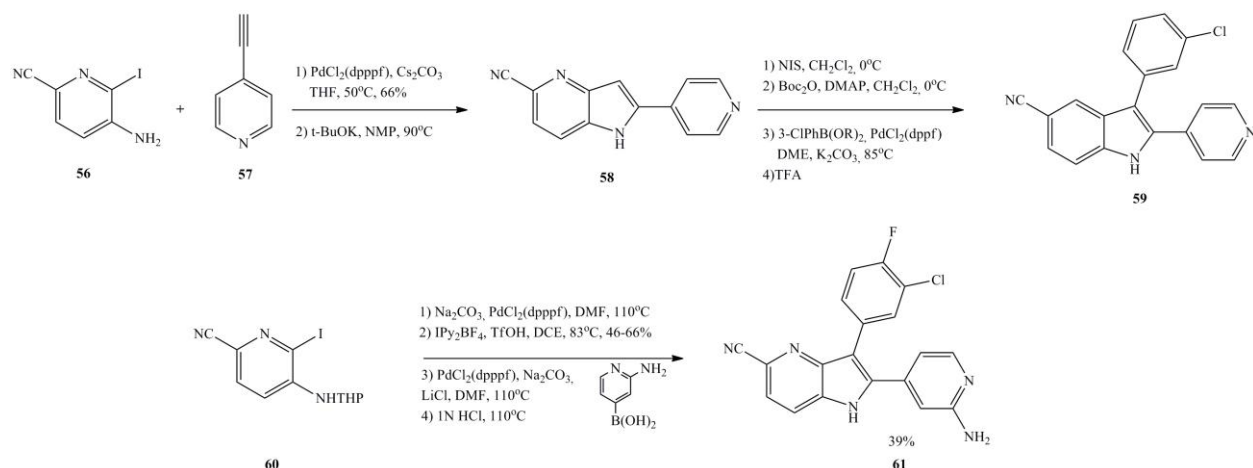
Схема 10 – Синтез ЧНК1 ингибитора **55**



1.2.5 Ингибиторы с-Met киназы

с-Met киназа представляет собой рецепторную тирозинкиназу, присутствующую как в нормальных, так и в злокачественных клетках. Этот фермент способствует активации сигнального пути и участвует в регенерации тканей, ангиогенезе и улучшенной подвижности клеток. При различных типах рака с-Met сверхэкспрессируется и приводит к высокому распространению рассеяния, инвазивности и развитию метастазирования. Конкурентные АТФ-ингибиторы с-Met киназы, такие как соединение **59**, описаны в литературе [62]. Реакция Соногаширы 4-пиридинилэтина (**57**) с йодпиридином **56** дает производное 5-циано-2-(4-пиридинил)-4-азаиндола **58** после циклизации с трет-бутоксидом калия (схема 11). Йодирование в положение С-3 эффективно с NIS. После введения защитной группы к атому азота следует сочетание Сузуки и обработка трифторуксусной кислотой с получением 2,3-диарил-7-азаиндола **59**. С другой стороны, последовательность ТНР защищающая анилины, приводит к С-2 замещенным производным пиридина, таким как соединение **60**. Только несколько производных были активны по отношению к с-Met, лучшие из них ингибировали киназу при $IC_{50} = 40$ нМ (соединение **59**) и 130 нМ (соединение **61**). Примечательно, что небольшие структурные модификации дают сильный диапазон активности.

Схема 11 – Синтез ингибиторов киназы с-Met, соединения **59** и **61**



Два производных *N*-нитробензолсульфонил-4-азаиндолов **62** и **63** идентифицированы как ингибиторы с-Met с $IC_{50} = 70$ и 20 нМ соответственно [63]. Впервые были разработаны С-3 серосодержащие и сульфоксидные азаиндолы в рамках программы медицинской химии, но наиболее многообещающей серией остается *N*-1-замещенный скаффолд. Внутри этого семейства дальнейшая оптимизация показала, что возможно замещение в 6 положение азаиндольного кольца и группа пиперазина дает наилучшие

результаты. Были предприняты попытки изостерического замещения нитрофенильного фрагмента при получении аналогов бензофуразана и хлоримидазо[2.1-*b*]тиазола **64** и **65** (схема 12). Активность была значительно увеличена с $IC_{50}=9$ нМ для обеих молекул. Стыковка соединения **64** с с-Met киназой показала возможные взаимодействия мотива имидазотиазола с Asp 1222 и Tyr1230. К сожалению, методы, приводящие к конечным производным, были плохо описаны. Чтобы увеличить сродство сайта связывания и вероятность установления водородных связей с двумя атомами азота, работники Bristol-Myers Squibb выбрали скаффолд 7-азаиндола для разработки новых ингибиторов с-Met [64]. 4-(2-фтор-4-нитрофенокси)-7-азаиндол (**66**) защищают с помощью SEM. Затем бромуют с помощью NBS с получением соединения **67** с выходом 92%. Введение пиридинильной группы в положение C-3 проводят посредством реакции перекрестного сочетания Сузуки с соответствующей бороновой кислотой. Восстановление нитрогруппы цинком с последующим отщеплением группы SEM и окончательным образованием мочевины приводит к соединению **68** с общим выходом 24% (схема 13). Это соединение имеет значение $IC_{50}=2$ нМ, его позиционный изомер **69** с пиридинильным заместителем в положении C-2 показал точно такую же активность по отношению к с-Met. Соединения **68** и **69** занимают сайт связывания АТФ, где белок находится в неактивной конформации, то есть петля активации сворачивается обратно к карману для связывания АТФ. Атом азота N-7 принимает водородную связь от основной области шарнира NH Met 1160. Атом азота N-1 отдает водородную связь карбонилу Met 1160. Положение C-3 мотива 7-азаиндола направлено в сторону рибозного кармана, а положение C-2 ведет к открытой шарнирной области. Производные **70–72** представлены, чтобы продемонстрировать «лекарственную способность» ряда, дающего несколько молекул, действующих в наномолярном диапазоне [65,66].

Схема 12 – Ингибиторы с-Met киназы **62–65** после оптимизации

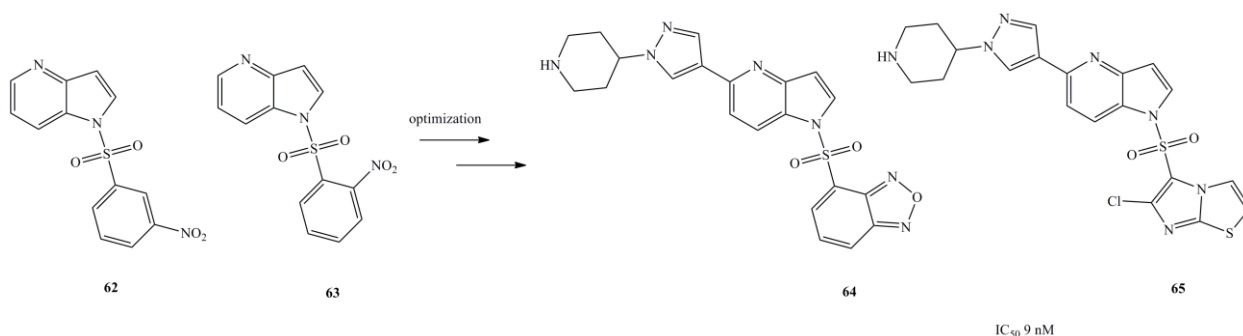
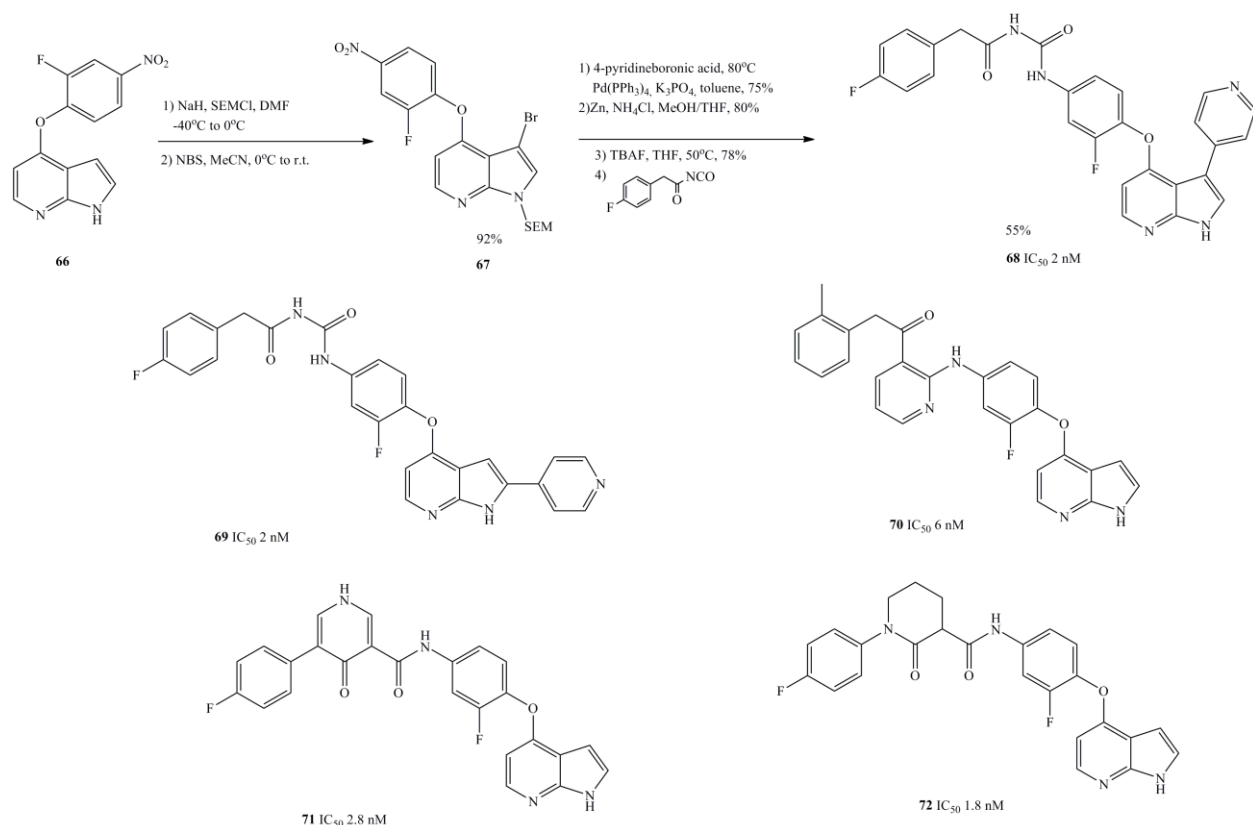


Схема 13 – Синтез ингибитора с-Met киназы **68** и его аналогов

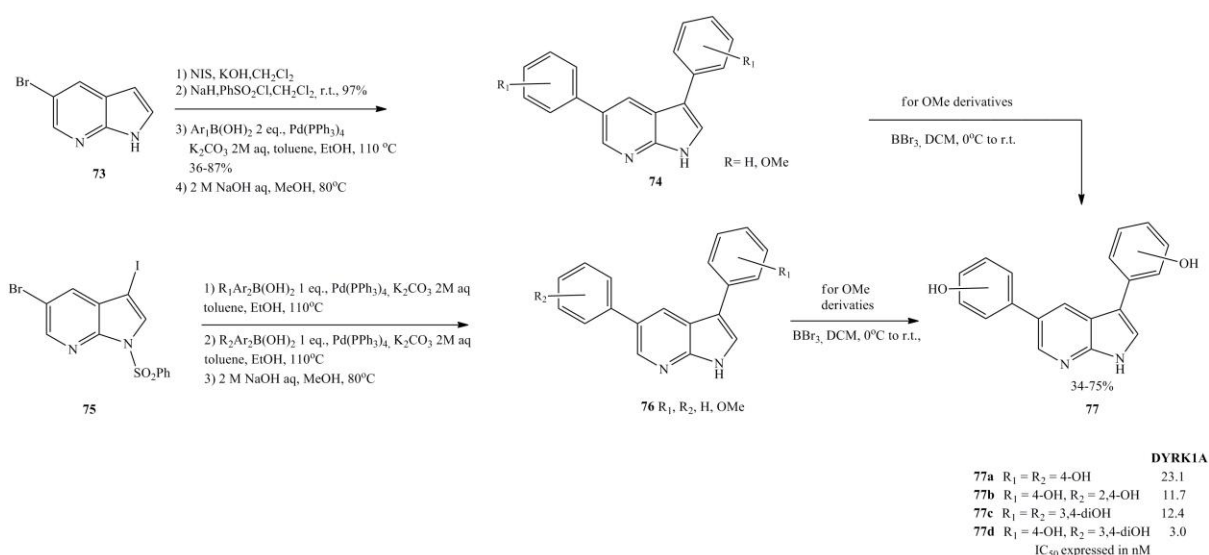


1.2.6 Ингибиторы DYRK1A киназы

Киназа 1а, регулируемая фосфорилированием тирозина с двойной специфичностью (DYRK1A), относится к подсемейству DYRK протеинкиназ, которые присутствуют в зародышах и человеческом мозгу. Наряду с циклинзависимыми киназами (CDK), митоген-активируемыми протеинкиназами (MAPK), гликогенсинтазинкиназами (GSK) и CDK-подобными киназами (CLK), семейство DYRK является частью группы CMGC. Ген, кодирующий DYRK1A, расположен в 21 хромосоме, гиперэкспрессия хорошо охарактеризована, и эта мишень подтверждена для нескольких патологий, таких как синдром Дауна, болезнь Альцгеймера, а также в онкологии [67–76]. Производные 6- и 7-азаиндола были специально разработаны в качестве ингибиторов DYRK1A [77]. Для получения 3,5-диариллированных-7-азаиндолов используют стандартный путь синтеза (схема 14). 5-Бром-7-азаиндол (**73**) йодируют по положению 3 с NIS, затем следует N-защита бензолсульфонильной группой с почти количественным выходом. Симметричные диариллированные соединения **74** получают с использованием двух эквивалентов арилбороновой кислоты. Несимметричные 3,5-диариллированные производные **76** получают двумя последовательными реакциями перекрестного сочетания Сузуки-Мияуры, начиная с **75** соединения. Снятие защиты с атома азота в соединениях **74** и **76** в

основной среде сопровождается де-О-метилованием с BBr_3 (3 эквивалента на одну метильную группу) с образованием гидроксильных производных **77**. Молекулярное моделирование в сайте связывания АТФ показало множественные взаимодействия водородных связей с пептидным остовом (Glu 239, Leu 241) для 7-азаиндольного ядра, в то время как гидроксильные заместители взаимодействуют с Lys 188 и Phe 165. Гидроксильные производные более активны, чем соответствующие метоксильные. В ряду 6-азаиндолов также проводился синтез, но производные имеют значительно меньшую активность, чем производные 7-азаиндолов. Когда эти производные были протестированы на репрезентативной панели киназы, появилась относительная селективность в отношении соединений, действующих в основном на семейство DYRK1A.

Схема 14 – Синтез ингибиторов DYRK1A **77**



Группа исследователей успешно разработала ингибиторы DYRK1A с несколькими оригинальными гетероциклическими ядрами, включая 4-азаиндолы [29,78]. Эти синтезы были проведены с помощью новой реакции Фишера, основным преимуществом которой является синтез функционализированного 4-азаиндольного структурного элемента в одну стадию. Начиная с 5-гидразинил-2-метоксипиридина (**78**), при конденсации пиридинацетофенонов в кислой среде удобно получать производные **79** (схема 15). Удаление метокси-группы возможно с помощью образованного *in situ* TMSI. Конечные соединения анализируют на панели из 5 киназ, чтобы оценить их селективность, и на семи линиях раковых клеток, чтобы определить их *in vitro* эффективность и цитотоксичность. Были обнаружены только ингибирования c-Raf и DYRK1A. Исследования докинга полностью объясняют эти результаты, и SAR показал, что

присутствие метоксигруппы в основном дает ингибиторы DYRK1A, лучший из которых - **79d**, тогда как соответствующая гидроксильная замена в соединении **80** дает только ингибирование c-Raf.

Схема 15 – Синтез ингибиторов DYRK1A **79** и **80**

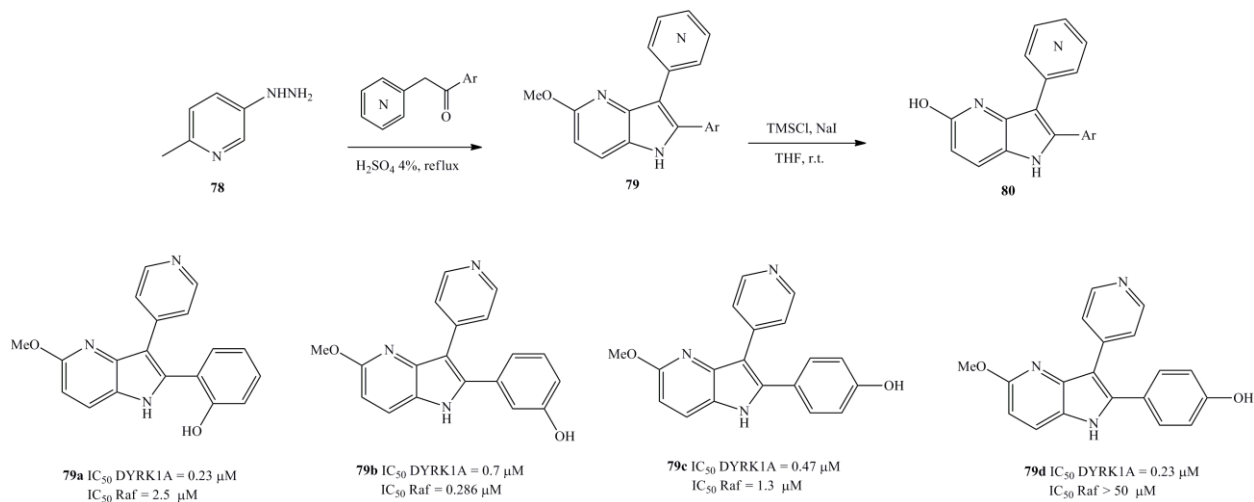
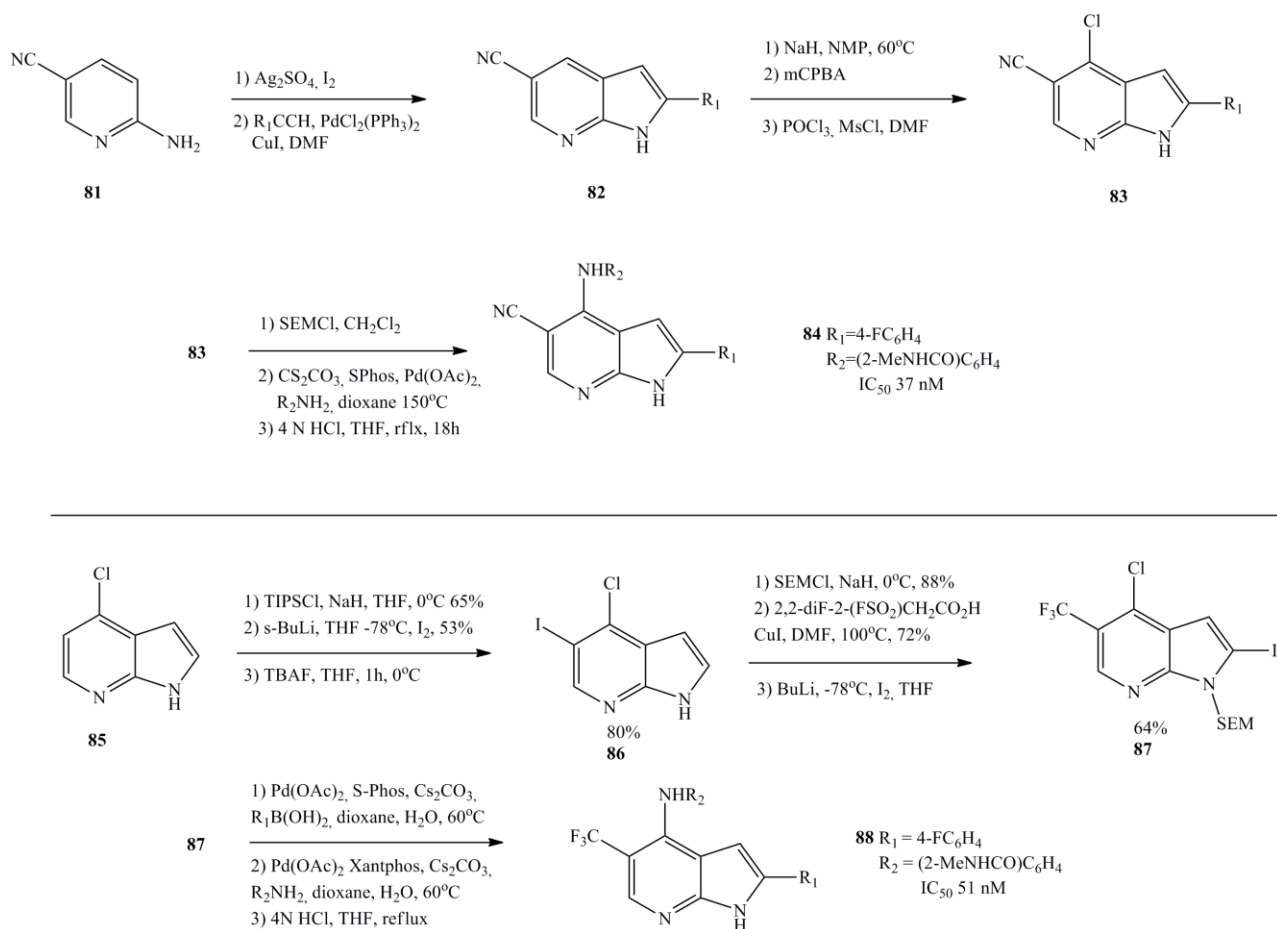


Схема 16 – Синтез фокальных ингибиторов адгезионной киназы



1.2.7 Ингибиторы FAK

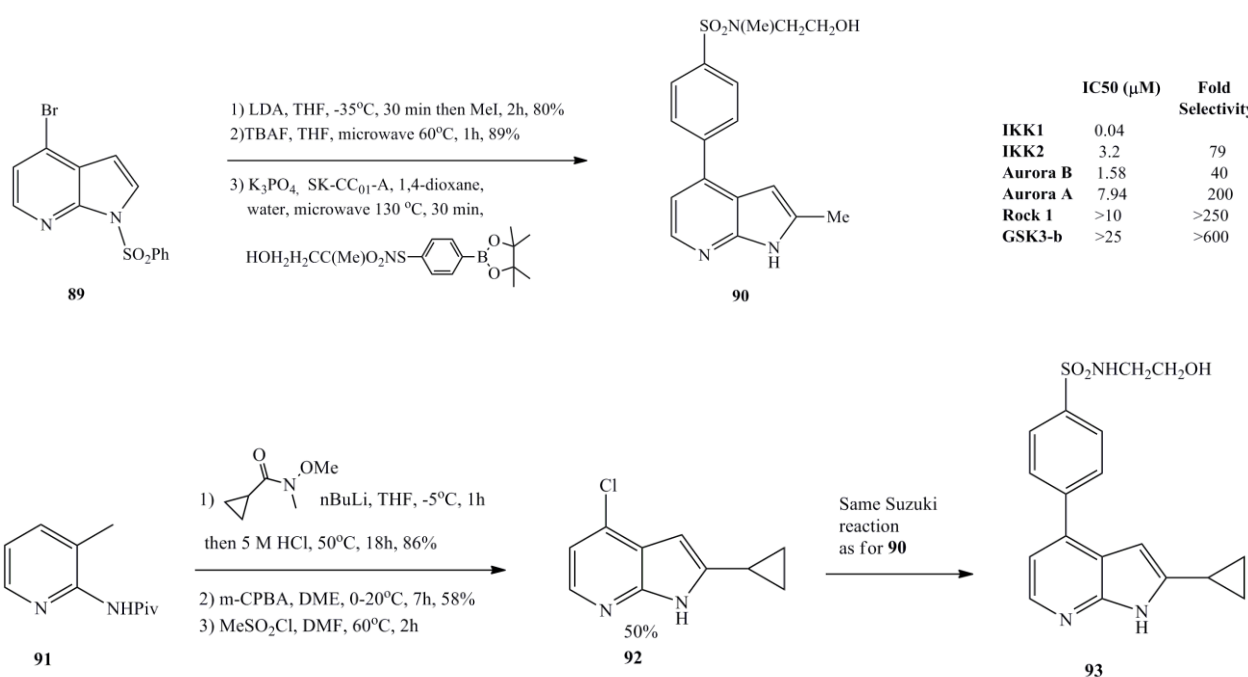
Фокальная адгезионная киназа (FAK) - это нерецепторная тирозинкиназа, которая модулирует клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и выживание в ответ на внеклеточные раздражители. На сегодняшний день FAK считается противоопухолевой мишенью, так как эти ингибиторы вызывают апоптоз и повышают чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии. Известно о нескольких интересных соединениях в рамках программы обнаружения на основе фрагментов [79]. Для получения желаемых производных используют две разные стратегии синтеза: конструирование бициклического азаиндольного ядра с использованием коммерчески доступных 2-аминопиридинов или последовательную селективную функционализацию модели 7-азаиндола (схема 16). Таким образом, 5-циано-аналог **84** синтезируют из 4-цианоанилина йодированием с последующим кросс-сочетанием и аннуляцией Соногаширы в основных средах. Окисление азаиндолпиридинового кольца с последующей обработкой POCl_3 приводит к хлорпроизводному **83**. Финальные стадии заключаются в SEM-защите, аминировании по реакции Бухвальда-Хартвига и удалением защитной группы с получением соединения **84**, значение IC_{50} которого составляет 37 нМ. Во второй последовательности хлор-7-азаиндол **85** защищают объемной защитной группой TIPS (для предотвращения литирования в положение C-2), затем в результате орто-литирования получают 5-йод-4-хлор-7-азаиндол (**86**) после N-снятия защиты с фторидом тетрабутиламмония. Соединение **86** защищают группой SEM затем введение трифторметильной группы в положение C-5 достигается с помощью 2,2-дифтор-2-(фторсульфонил)уксусной кислоты в присутствии CuI с выходом 72%. Йодирование в положение C-2 с BuLi/I_2 при -78°C дает соединение **87** с выходом 64%. Введение фенильной группы в положение C-2 осуществляется в присутствии ацетата палладия и *S*-Phos и соответствующей арилбороновой кислоты. Аминирование по Хартви-Бухвальду различными аминами идет по положению 4 с каталитическим ацетатом палладия и ксантофосом с последующим снятием защиты с помощью SEM в кислой среде с получением соединения **88**, которое имеет значение IC_{50} 51 нМ.

1.2.8 IKK2 ингибиторы

Известны две изоформы IKK 1 и 2. IKK киназа (IKK) представляет собой серин/треонин протеинкиназу, расположенную в цитоплазме, которая дестабилизирует комплекс IKK/NF κ B путем фосфорилирования и регулирует митотическую Aurora A киназу. Прямым следствием является подтверждение семейства IKK в качестве важнейших мишеней при воспалительных (ревматоидный артрит, ХОБЛ и астма) и аутоиммунных расстройствах, а также при раковых заболеваниях посредством регуляции

клеточного цикла. В этой области АТФ-конкурентные 4-[4-(алкилсульфонамидо)-арил]-7-азаиндолы представляют собой новый класс ингибиторов ИКК2. Первое соединение получается после трех стандартных стадий с направленным региоселективным металлизированием в положение С-2, снятием защиты и реакцией Сузуки, катализируемой палладием (схема 17). Инновация произошла от природы используемого эфира бора [80]. Производное **90** показало хорошую активность ИКК2, и наблюдалась почти 80-кратная селективность по отношению к ИКК1. Профиль селективности соединения **90** также определяют в отношении панели из 36 киназ. Только две киназы (ИКК1 и AurB) были ингибированы в пределах 100-кратного ИКК2.

Схема 17 – Синтез ингибиторов ИКК2

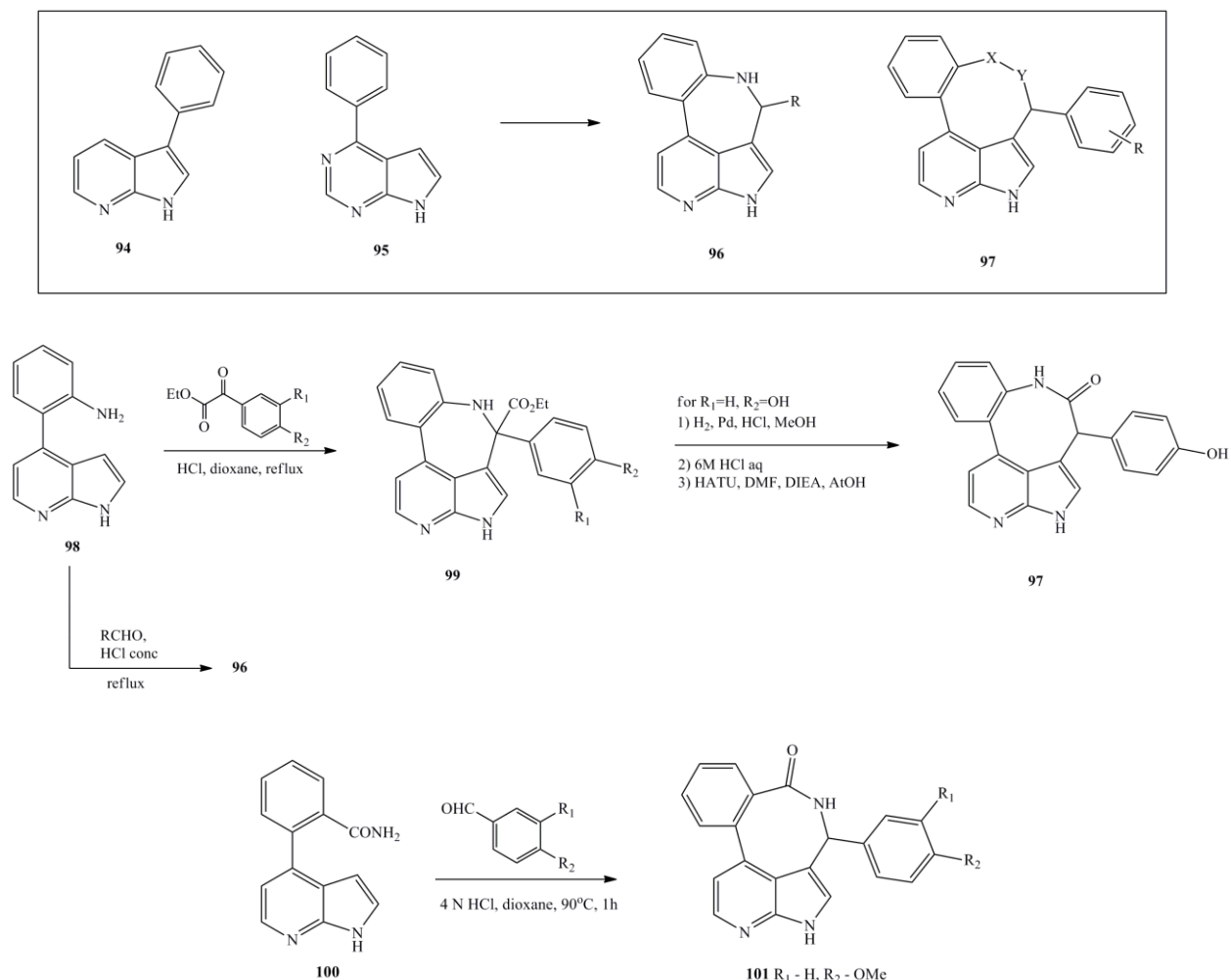


| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| IC ₅₀ IKK1/IKK2 | 8/200 nM |
| A549 cell IC ₅₀ | 200 nM |
| IC ₅₀ whole blood | 1.25 μM (human), 6.3 μM (rat) |
| CYP450 (IC ₅₀) | 7 μM (2C9) |
| Intrinsic clearance (hepatocytes) | < 1 mL/min/g |
| IC ₅₀ hErg | >50 μM |
| Plasma protibiding (%) | 97.6 (rat), 93.4 (human) |

Была создана модель стыковки для объяснения режима связывания, SAR установлен несколькими модификациями фармакофоров, в основном реализованными на сульфонамидном остатке и в положении С-2 7-азаиндола. Дальнейшая оптимизация дает циклопропиловое производное **93**, которое синтезируют в четыре этапа из пиколинового производного **91**, и которое было наиболее активным ингибитором ИКК2

[81]. Кроме того, полный профиль *in vitro* и физико-химический профиль были благоприятными (хорошая селективность и фармакокинетика, пероральная биодоступность, низкий метаболизм). Влияние *in vivo* на воспаление также было определено.

Схема 18 – Синтез ингибиторов киназы JAK.



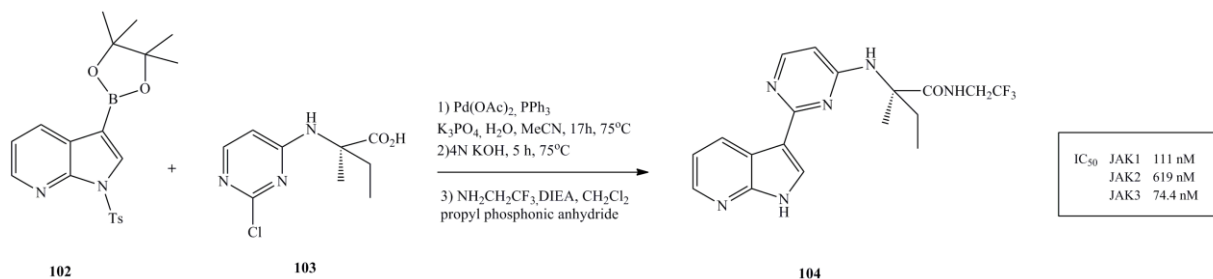
1.2.9 Ингибиторы JAK2

Janus – киназы или JAKs представляют собой семейство внутриклеточных тирозинкиназ, которые участвуют в процессе передачи сигналов многих рецепторов цитокинов, в частности тех, которые участвуют в патогенезе воспалительных заболеваний [34]. В семействе киназ Janus (JAK1-3, TYK2) известны четыре внутриклеточные нерцепторные тирозинкиназы млекопитающих. В 2005 году было сообщено, что появление мутации с одним остатком в JAK2 обычно обнаруживалось у пациентов с диагнозом миелопролиферативных нарушений [82–87]. Таким образом, блокирование киназной активности JAK2 путем нацеливания на сайт связывания АТФ стало привлекательной терапевтической мишенью [88,89]. Две молекулы: производное C-3-арил-

7-азаиндола **94** (IC_{50} JAK2 260 нМ) и производное арил-пурина **95** (IC_{50} JAK2 496 нМ) появились в качестве низких ингибиторов JAK (схема 18). Перекрывая предполагаемые ориентации шарнирногосвязывания двух хитов, исследователи предположили возможность увеличения ингибирующей активности путем включения мостика и выполнения кольцевого замыкания. Были разработаны более пространственно затрудненные соединения с 3,4-конденсированным семи- или восьмичленным центральным кольцом, таким как в соединениях **96** и **97**. Например, соединение **97** с восьмичленным центральным кольцом получают из 4-(фенил)-7-азаиндола (**98**) и соединения **100**. При конденсации Пикте-Шпенглера с эфиром пирувата получается циклизованное соединение **99**. Гидрирование *N*-бензила с последующим гидролизом сложного эфира и внутримолекулярной лактамизацией дает соединение **97** в виде смеси атропоизомеров. Простая кислотная альдегидная конденсация с соединением **98** дает большую библиотеку производных типа **96**, тогда как начиная с соединения **100** получается ретроамид **101**. Была получена сокристаллическая структура JAK2 одного производного азаиндола. Ингибитор образует две шарнирные водородные связи с азаиндольным фрагментом к белку через Leu 932 и Glu 930. Дополнительный фенольный фрагмент ОН является двойным акцептором водородной связи с карбоксилатом Glu 898 и донором водородной связи с Phe 995. Сильное ингибирование наблюдается с соединениями типа **96**. Производное **97** (IC_{50} JAK2 1 нМ, JAK3 5 нМ), для которого все фармакокинетические параметры определены, используется перорально в анализе лейкемии *in vivo*. Лечение является очень эффективным, так как введение ингибитора JAK продлевает выживание животных в течение 32 дней. Эти сообщения открывают путь к макроциклическим азаиндольным ингибиторам киназы.

Децернотиниб(**104**) является ингибитором JAK, разработанным Vertex, и в настоящее время проходит фазу 2 клинических испытаний для лечения ревматоидного артрита [90,91]. Короткий синтез децернотиниба включает в себя использование сложного эфира 7-азаиндолбороната **102**, который реагирует с производным хлорпиримидина **103** в реакции перекрестного сочетания Сузуки (схема 19). Аминирование полученной кислоты 2,2,2-трифторэтанамином дает соединение **104**.

Схема 19 – Синтез децернотиниба

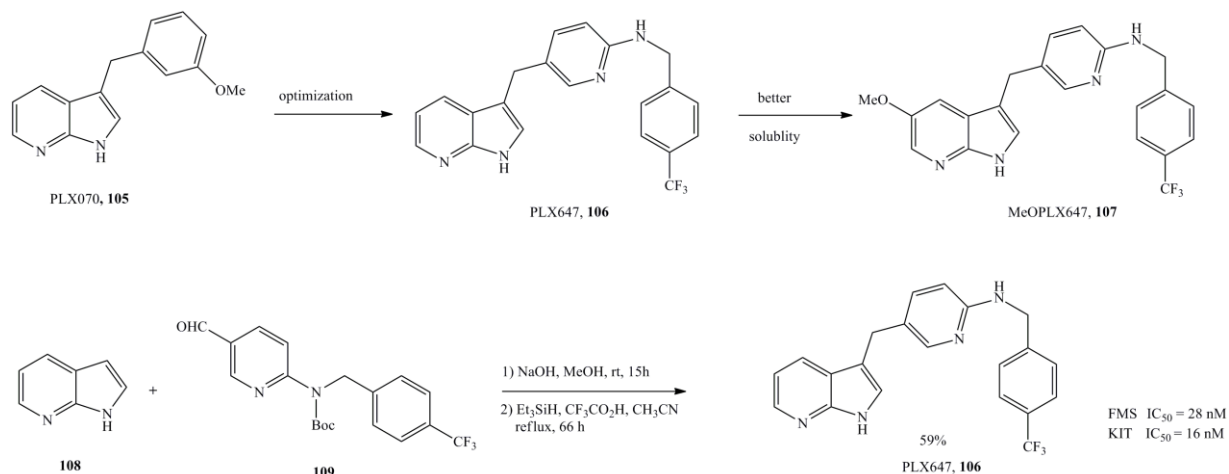


1.2.10 Двойные ингибиторы KIT/FMS киназы

Поскольку моно-направленная терапия иногда приводит к неутешительным результатам и требует одновременного использования нескольких ингибиторов киназы, поэтому появилась другая стратегия - концепция двойных ингибиторов. Конструкция лекарственного средства *in silico* полностью раскрывает потенциал для разработки этих типов соединений, что видно из недавней статьи, касающейся ингибиторов KИT/FMS киназы [92]. Агенты, которые нацелены на модификации микроокружения и рост опухолевых клеток, могут привести к лекарствам от двух основных взаимозависимых патологий, которые являются онкологией и воспалением. Ожидается, что ингибирование FMS уменьшит созревание моноцитов, в то время как, ингибирование KИT индуцирует апоптоз тучных клеток, тем самым уменьшая производство воспалительных цитокинов и деструктивных молекул в синовии. Несколько производных азаиндола были разработаны для того, чтобы найти новую серию молекул, которые могли бы выполнять взаимодействие ключевых водородных связей, наблюдаемое при совместной кристаллизации PLX070 (**105**) с рецептором 1 фактора роста фибробластов (FGFR1).

PLX647 (**106**) получают путем конденсации в положение C-3 альдегида **109** и 7-азаиндола **108** (схема 20). Восстановление созданного вторичного спирта триэтилсианом в кислой среде дает конечное соединение с выходом 59%. Это соединение является высокоспецифичным двойным ингибитором KИT/FMS киназы. Оно протестировано на панели из 400 киназ с концентрацией 1 мкМ, в 35 раз выше его ферментативной IC₅₀ и в 60 раз выше его ферментной IC₅₀ KИT. Только девять киназ были ингибированы более чем на 50%. Это соединение также оказалось эффективным в клеточных линиях, экспрессирующих FMS и KИT (IC₅₀ для клеток M-NFS60 0,38 мкМ; IC₅₀ для клеток M-07 0,23 мкМ). Кроме того, PLX647 блокировал активацию макрофагов, остеокластов и тучных клеток, контролируемых киназами KИT и FMS, на грызунах была доказана его эффективность.

Схема 20 – Разработка и синтез двойного ингибитора КИТ/FMS киназы

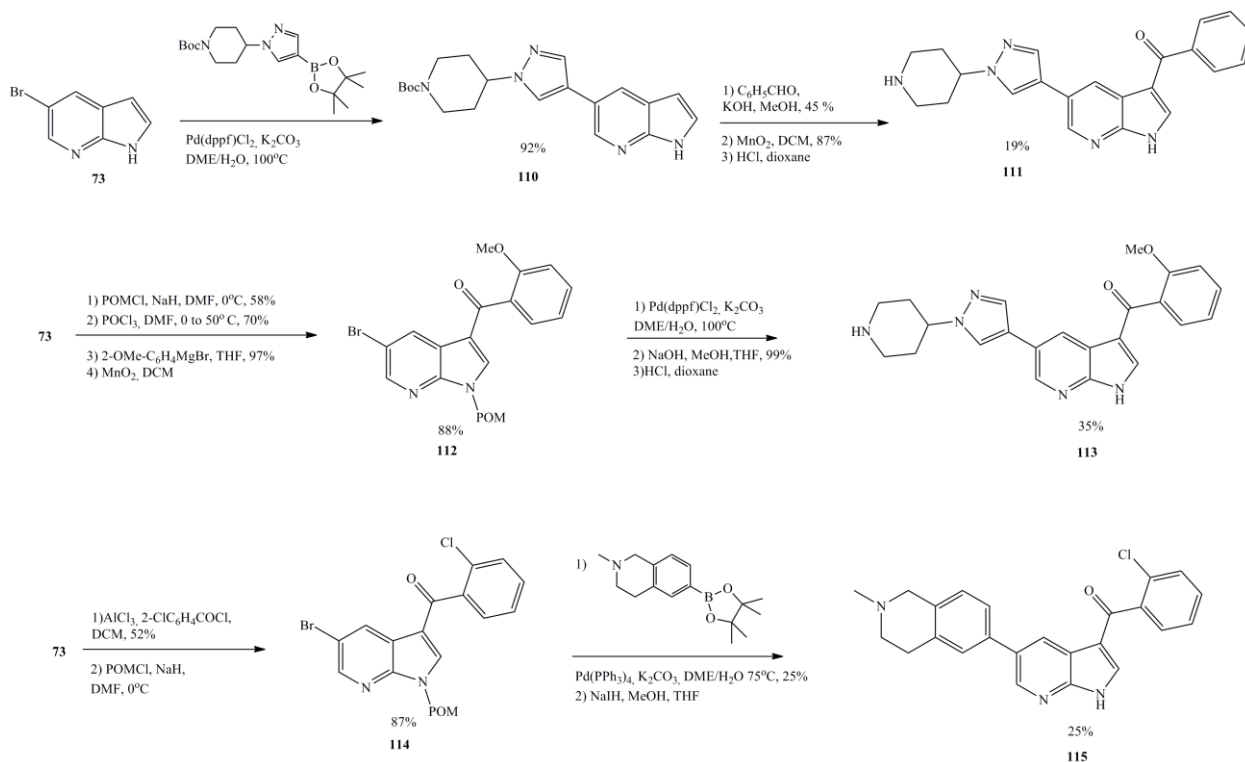


1.2.11 Ингибиторы PAK1 киназы

Активированная p21 киназа типа PAK представляет собой серин/треонин специфические киназу. В частности, сообщается, что PAK1 координирует ремоделирование инсулина и актина и поглощение глюкозы, а также уменьшает повреждение ткани после травматизма [93,94]. Ингибирование этого фермента важно для ограничения прогрессирования рака и клеточной адгезии. PAK1 связан с несколькими сигнальными путями, а также с Rho GTPases, ферментами, участвующими в молекулярных переключателях, активирующих адгезию и фактор роста. При активации GTP-семейства Rho передают сигналы путем рекрутирования множества эффекторных белков, включая протеинкиназы PAK [95]. Известно только о нескольких ингибиторах PAK1. Использование 7-азаиндольного мотива совсем недавно было описано в литературе с улучшенной активностью и селективностью в отношении ингибирования PAK [96]. Кристаллическая структура лучшего ингибитора в сайте активного домена была представлена, и доказано что ядро азаиндола эффективно связывается с шарнирной областью и устанавливает сильные взаимодействия с остатками Glu 345 и Leu 347. Селективность обеспечивалась заполнением определенного кармана, а также связыванием с остатками привратника. Исследование SAR сопровождалось широкой оптимизацией структуры. Производные 3-кетоарил-5-арил-7-азаиндола **111** и **113** модулировали, чтобы получить соединение-лидер **115** с ингибированием в наномолярном диапазоне активности PAK1 и с высокой селективностью в отношении PAK4, KDR и FGFR1 (схема 21). Количественное определение pPAK в клетках измеряют для выяснения механизма действия и измеряют некоторые параметры ADME. Производные получают из 5-бром-7-азаиндола (**73**). Ацилирование по Фриделю-Крафтсу приводит к замещению в положение C-3, тогда как реакция перекрестного сочетания Сузуки-Мияуры, которая

требует раннего получения сложных эфиров бороновой кислоты, приводит к арилированию в положение C-5. Прямое арилирование в C-5 достигается без какой-либо защиты кольца индола, тогда как для всех реакций, проводимых с 3-карбоксилированными азаиндолами, требуется временное применение группы полиоксиметилена (ПОМ).

Схема 21 –Синтез ингибиторов РАК1



| Соединение | РАК1 IC ₅₀ (nM) | РАК4 Селективность ^a | KDR Селективность | FGFR Селективность |
|------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 111 | 400 | 3.4 | 0.25 | 0.24 |
| 113 | 490 | 14 | 0.9 | 0.13 |
| 115 | 1 | 450 | 50 | 24 |

^aСелективность рассчитывается из соотношения значений IC₅₀

1.2.12 Ингибиторы p38α MAP киназы

Существует три основных класса пролин-направленных серин-треониновых MAP (активированный митогеном белок) киназ. Они активируются двойными киназами, так называемыми MAP-киназными киназами (MKKs), путем фосфорилирования тирозина в петле проксимальной к АТФ и сайтам связывания субстрата. В этом семействе p38 MAP-киназа регулирует биосинтез цитокинов, участвующих в воспалении (провоспалительный цитокин интерлейкин-1β), и некроз опухоли (actor-α TNFα). Способ связывания основных ингибиторов p38 известен [97,98]. Ингибиторы p38α-MAP-киназы, используемые при воспалительных заболеваниях, были синтезированы с использованием

азаиндольного скаффолда. В первом исследовании сообщается, что ингибиторы p38 α -МАР-киназы на основе 4-фторбензилпиперидининдола **116** и **117** имеют хорошую активность (схема 22) [99]. Производные индола были закреплены в сайте связывания АТФ, и их предполагаемый режим взаимодействия показал водородную связь с основной цепью киназы в шарнирной аминокислоте Met-109. Кроме того, 4-фторбензильная группа занимает смежный гидрофобный карман, что приводит к активности и селективности. Замещение атомом хлора или метокси-группы в положение С-6 индольного кольца дополнительно улучшает ферментативную активность p38. Также были заменены другие гетероциклы на индол. Соединение **120** получают конденсацией пиперидинового промежуточного соединения **119** с кислотой **118** с последующей реакцией оксалилхлорида в положение С-3 7-азаиндола и терминального амидирования диметиламином (схема 22). Производное (**120**) продемонстрировало превосходную активность в отношении p38 МАР-киназы (IC_{50} = 60 нМ) и улучшенную клеточную активность (dWBA IC_{50} = 48 нМ), которая была почти эквивалентна измеренной ферментативной активности.

Схема 22 – Синтез ингибиторов МАР киназы

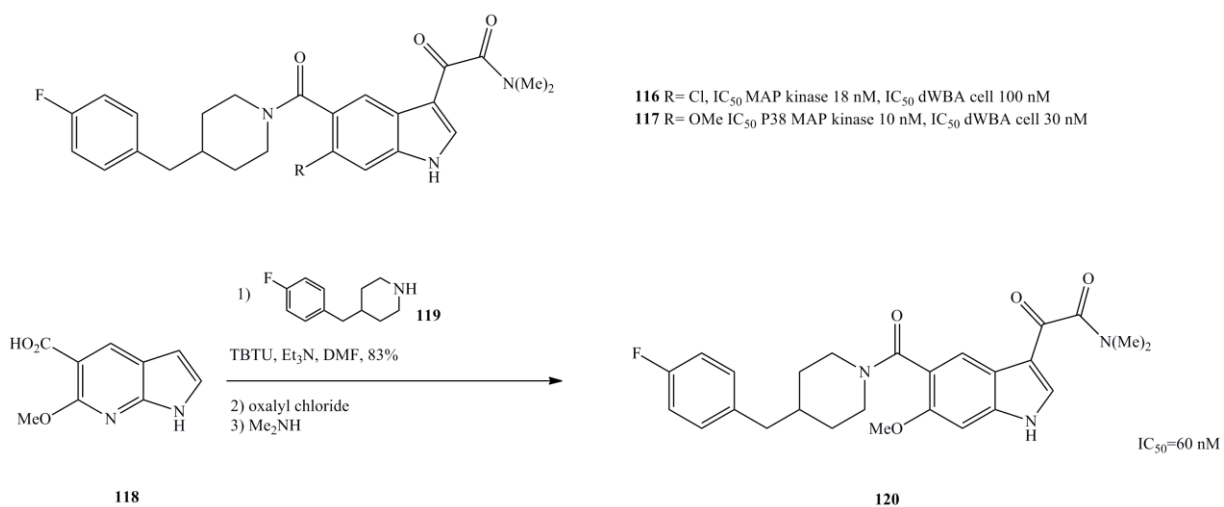
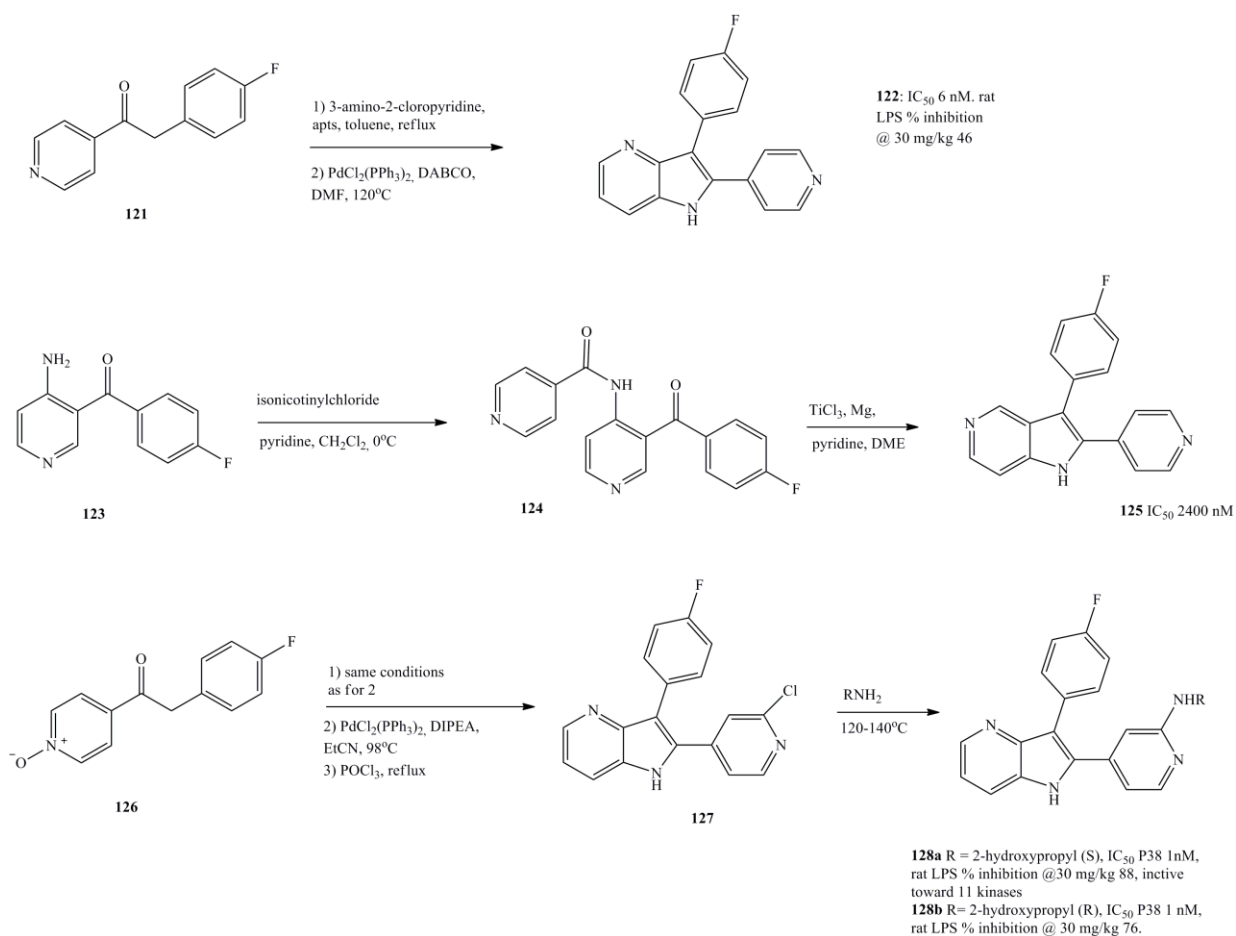


Схема 23 – Синтез ингибиторов МАР киназы



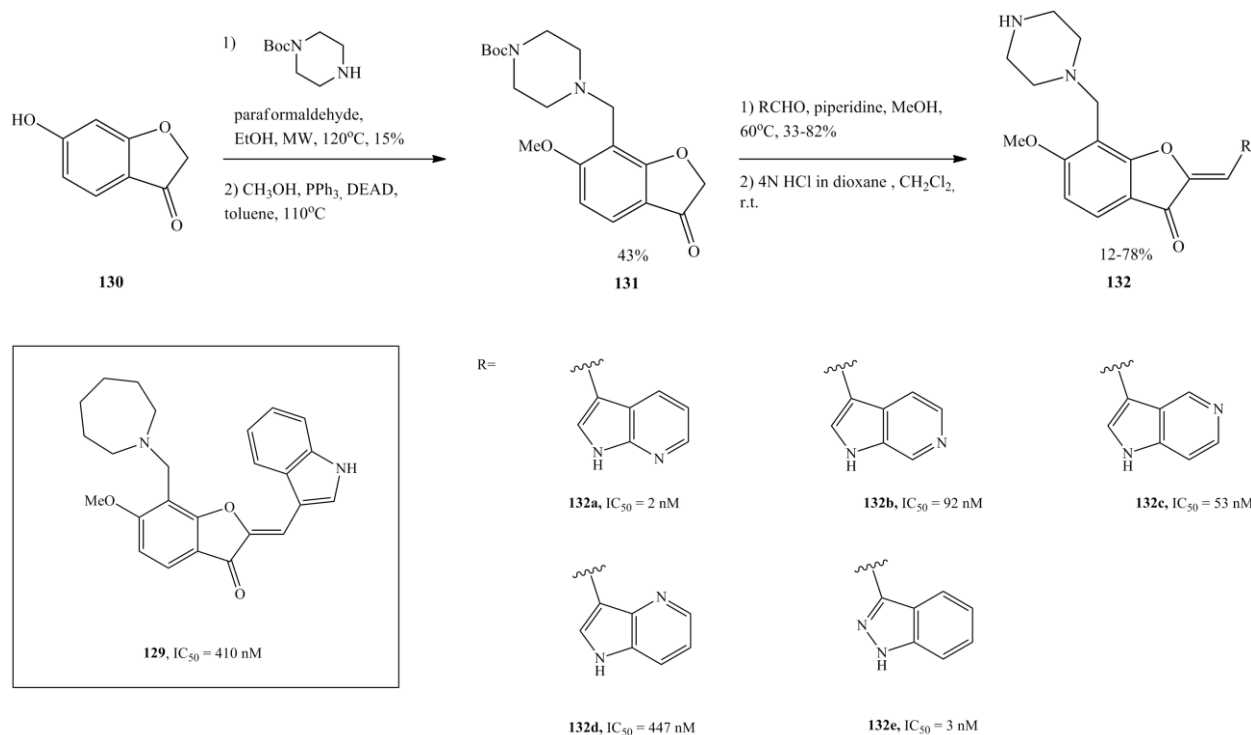
В другом примере описаны производные 4- или 5-азаиндола **122** и **125** [98]. Эти соединения оптимально взаимодействуют с сайтом связывания через пиридиньную группу (водородная связь с Met **109**) и 4-фторфенильный заместитель, который заполняет гидрофобный карман (Thr 106). N-4атом 4-азаиндола единственный, который связывает водород с терминальным азотом Lys 53 и, таким образом, значительно улучшает ингибирующий потенциал 4-азаиндолов по сравнению с 5-азаиндолами. Синтез этих производных проводят путем построения замещенного ядра азаиндола (схема 23). Кетон (**121**) превращают в смесь имин-енамина путем конденсации с 3-амино-2-хлорпиридином в кислой среде, что дает желаемый индол **122** после внутримолекулярной реакции Гека с очень высоким выходом. Подход к синтезу для 5-азаиндола **125** включает 4-аминопиридин **123**, который сначала подвергают взаимодействию с изоникотиноилхлоридом перед тем, как подвергнуть тандемному восстановлению по Фюрстнеру с TiCl₃/Mg, с получением желаемого 5-азаиндола **125**. Модификация C-2 пиридинового кольца побудила исследователей начать с N-оксида **126**. После реакции

перекрестного сочетания обработка POCl_3 приводит к хлорпроизводному **127**, которое легко подвергается нуклеофильному замещению первичными аминами. Вподсемействе соединений**128** хиральные производные **128a** и **128b** были идентифицированы для развития. *S*-изомер **128a** был выбран для достижения этой цели, поскольку биологические и физические данные, а также профили *in vivo* были более адаптированы, чем для соединения**128b**.

1.2.13 ИнгибиторыPIMкиназы

Сверхэкспрессия киназы PIM1 у пациентов с гематопозитическим раком и раком простаты является подтвержденной мишенью в онкологии. PIM1 фосфорилирует несколько белков, что приводит к выживанию, пролиферации и миграции клеток. Усиленная экспрессия PIM1 приводит к ингибированию апоптоза и увеличению пролиферации клеток. При поиске новых ингибиторов киназы PIM1 [100, 101] первоначальный скрининг привел к соединению **129**, которое, хотя и демонстрирует плохие метаболические свойства, но оно послужило отправной точкой для улучшения активности и селективности. Был синтезирован широкий спектр аналогов, и среди них получено несколько производных азаиндола посредством реакции альдолиза производного бензофуран-3-она **130** с четырьмя 3-формилазаиндолами (схема 24).Финальная стадия снятия защитной группы дает соединения **132**. Производное 7-азаиндола**132a**является наиболее эффективным ингибитором киназы PIM1 ($IC_{50} = 2$ нМ). Ведущий ингибитор PIM-киназы исследуемой серии представляет собой соединение **132e**, замещенное 2-азаиндольнымскаффолдом. Соединения **129** и **132e** значительно отличаются профилем селективности киназы и способом связывания.Плохо селективное соединение **129** ингибировало FLT3 и PDGFR α , а также серин/треонинкиназы DAPK1, GSK3 β , PKC α , PKD2 и ROCK-1. Напротив, соединение **132e** значительно ингибирует только FLT3 ($IC_{50} = 47$ нМ) в дополнение к PIM1. Селективность в пределах семейства киназ PIM также наблюдаетсяу соединения **132e**, демонстрируя высокую селективность киназы по отношению к PIM1 ($IC_{50} = 3$ нМ) и PIM3 ($IC_{50} = 13$ нМ) по сравнению с PIM2 ($IC_{50} = 1160$ нМ). Это соединение также ингибировало рост клеточной линии лейкемии человека MV4-11.

Схема 24 – Синтез ингибиторов PIM-киназы

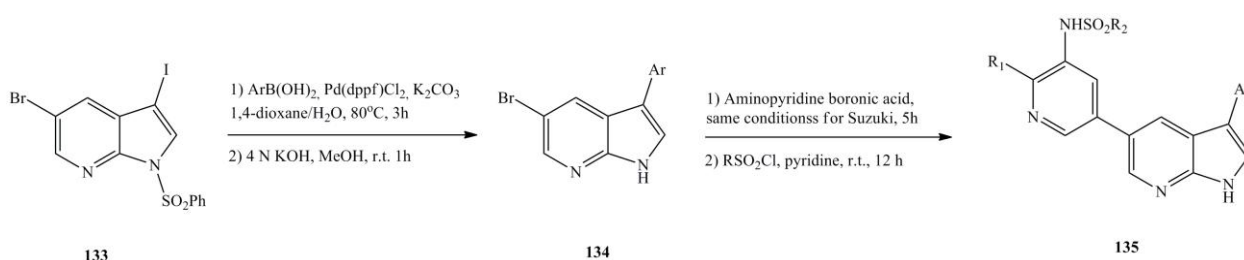


1.2.14 Ингибиторы PI3 киназы

Фосфоинозитидные 3-киназы(PI3K) представляют собой липидные киназы, которые катализируют фосфорилирование 3-гидроксильного положения PIP2 в PIP3 (фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат) и регулируют множество физиологических процессов, включая рост, дифференцировку, выживание и подвижность клеток. Дерегуляция пути PI3K PI3K/Акт/mTOR приводит к повышению уровня PIP3 и последующей активации Акт (прямо или косвенно), что может быть связано с патологией рака, воспаления, иммунных нарушений и сердечно-сосудистых заболеваний. В частности, изоформа PI3K α , которая кодирует каталитическую субъединицу p110 α , участвует в ряде первичных раковых образований [102–108]. Известно, что фармакофор-ориентированная стратегия, основанная на фрагментах, является источником программы открытия лекарств с использованием скаффолда 7-азаиндола для связывания шарнирной области PI3K [109]. Чтобы найти новый структурный класс ингибиторов, дающих доступ к заднему карману (DFG-мотив, привратник и каталитический лизин), в этом подходе уделяется приоритетное внимание включению пиридилсульфонамида в положение С-5 азаиндола. Была создана библиотека конечных производных, начиная с бензолсульфонилзащищенного 3-йод-5-бром-7-азаиндола (**133**) (схема 25). Арилирование, катализируемое палладием, сначала проводят по положению С-3, тогда как во второй реакции перекрестного сочетания Сузуки вводят желаемую каркасную группу С-5 аминопиридина после удаления защитной группы. Окончательное сульфонилирование ариламиногруппы приводит к увеличению разнообразия соединений. Интересные

результаты получаются с соединениями типа **135**, которые ингибируют путь PI3K/AKT/m-Tor в наномолярном диапазоне. Действительно, соединение **135e** показало лучшую активность по отношению к киназе, а **135f** было выбрано для дальнейшей оценки из-за повышенной растворимости. Клеточные исследования показали, что это соединение обладает свойствами апоптоза и антиангиогенеза в клетках гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и эффективно подавляет фосфорилирование нижестоящих факторов PI3K (AKT, m-Tor). Уменьшение васкуляризации опухоли наблюдалось *in vivo*, что делает это соединение потенциальным кандидатом для дальнейшего развития против гепатоцеллюлярной карциномы человека.

Схема 25 – Синтез ингибиторов PI3K α .



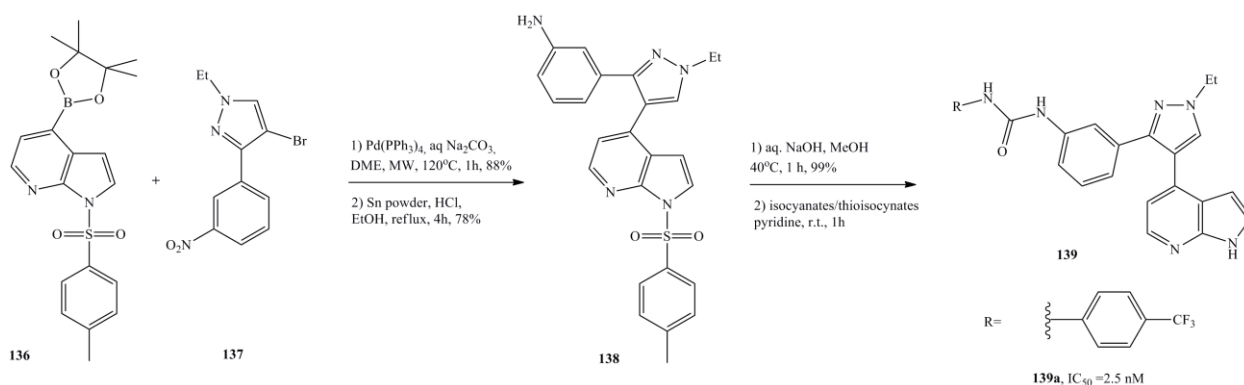
| Соединение | R ₁ | R ₂ | Ar | IC ₅₀ (nM) |
|-------------|-----------------|-------------------------------|--------------------|-----------------------|
| 135a | H | C ₆ H ₄ | 3-цианофенил | 31 |
| 135b | H | C ₆ H ₄ | 3-пиридил | 12 |
| 135c | H | C ₆ H ₄ | 3,4-диметоксифенил | 12 |
| 135d | H | 2,4-дифторбензил | 3-цианофенил | 27 |
| 135e | H | 2,4-дифторбензил | 3,4-диметоксифенил | 3 |
| 135f | NH ₂ | | 3,4-диметоксифенил | 16 |

1.2.15 Ингибитор B-Raf киназы

Raf-киназы играют важную роль в активации MEK и способствуют пролиферации и выживанию клеток. Обоснование нацеливания на сигнальный путь Raf-MEK-ERK классически иллюстрируется активностью сорафениба (Nexavar, BAY-43-9006), который был одобрен в 2005 году для применения при лечении почечно-клеточного рака и ингибирует VEGFR. Экспериментальные модели на животных и клинические испытания показали смешанные результаты с использованием сорафениба, и разработка селективных химиотерапевтических средств, действующих на эту киназу, остается интересной. Исследователи ранее сообщали о синтезе производных 4-азаиндолов, которые нацелены на DYRK1A, а также на B-Raf-киназу в субнаномолярном диапазоне (см. Схему

15) [78]. Использование скаффолда 7-азаиндола в поисках новой серии селективных ингибиторов V-Raf также описано в литературе [110]. Двухмерная карта фармакофоров, изображающая семь критических областей связывания АТФ-связывающего домена, используется для создания новой серии 7-азаиндолов путем включения функциональных групп, которые могут взаимодействовать с ключевыми характеристиками этих областей. Таким образом, азаиндолбороновая кислота **136** реагирует с производным бромимидазола **137** с образованием производного перекрестного сочетания с хорошим выходом (88%) с последующим восстановлением нитрогруппы в присутствии олова **138** (схема 26). Введение мочевиной группы с замещенным фенилизотиоцианатом дает соединения **139**. Замещение в 3-положение азаиндольного кольца снижает активность, поэтому C-2-незамещенные производные 7-азаиндола остаются лучшими кандидатами. Наилучшим соединением является 4-трифторметилфенилзамещенная мочевина **139a** с $IC_{50}=2,5$ нМ. Это соединение показало более чем 1000-кратную селективность в отношении большой панели других киназ и почти 100-кратную селективность в отношении VEGFR2 и c-Met.

Схема 26 – Синтез ингибиторов V-Raf **139**



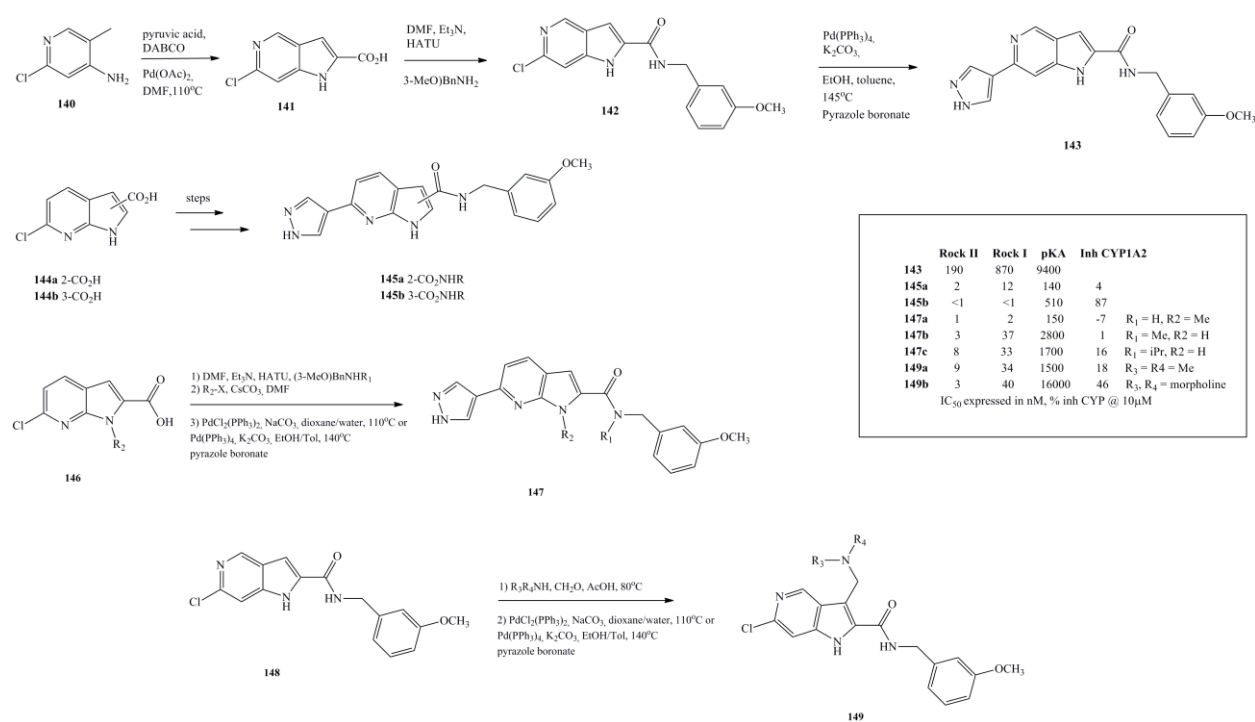
1.2.16 Ингибиторы Rho-киназы (ROCK)

Rho-киназа (ROCK) представляет собой серин/треонинкиназу, которая играет фундаментальную роль в путях передачи сигнала и участвует в клеточном сокращении, адгезии и миграции. Активированный GTP-связанный с G-белком Rho, ROCK фосфорилирует несколько субстратов. Поэтому, ингибирование ROCK может привести к лечебным препаратам при гипертонии, глаукомы, рассеянного склероза, инсульта, астмы, эректильной дисфункции, а также расстройств центральной нервной системы и метастазирования опухоли. В результате поиска эффективных ингибиторов Rho киназы, [111, 112] исследователями было подготовлено несколько различных азаиндолов (схема 27). Исходный 5-азаиндольный скаффолд **141** получают из 4-амино-5-йод-2-хлорпиридина (**140**) по реакции с пировиноградной кислотой катализируемой палладием

внутримолекулярной реакции Гека. Превращение карбоновой кислоты **141** в амид достигается с помощью 3-метоксибензиламина с использованием стандартного пептидного сочетания с получением соединения **142**. Введение пиразольного фрагмента в положение C-6 проводят с помощью классической реакции перекрестного сочетания Сузуки **143**. Эта стратегия была перенесена в серию получения 7-азаиндола. Синтез аналогичного 3-карбоксамид также был возможен, начиная непосредственно с 6-хлор-7-азаиндола (полученного в две стадии из коммерчески доступного 7-азаиндола). Замена пиразольного фрагмента несколькими различными гетероциклами приводит к снижению активности. Разрешение двух киназ Rock I и II в целом затруднительно, и дальнейшая селективность лучших производных проявляется при использовании активности РКА.

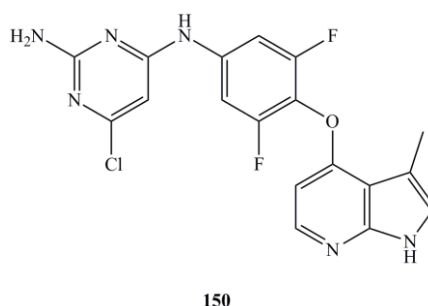
Кроме того, микросомальная стабильность человека значительно снижается при перемещении карбоксамид из положения C-2 в положение C-3 и скаффолд 7-азаиндола намного чище, чем скаффолд индола, с точки зрения ингибирования фермента CYP-450. Исследователи дополнительно модифицировали ключевые производные путем подавления одного или двух водородных атомов амида/7-азаиндола **147** и замещения в положения C-2 и C-3 7-азаиндола **149**. Селективность по отношению к ПКА была значительно повышена, и все активные соединения ($IC_{50} < 20$ нМ) имеют хорошую клеточную проницаемость. Наиболее перспективные соединения обладают подходящими фармакокинетическими свойствами (DMPK), гарантирующими потенциальное развитие серии.

Схема 27 – Синтез ингибиторов Rho-киназы



В 2010 году сотрудники Bayer Schering Pharma AD опубликовали промышленный синтез селективного ингибитора ROCK киназы **150** (рис. 1) [113,114]. Улучшенный синтез дает желаемую молекулу (**150**) в 11 стадий и общий выход составляет 8,2% (по сравнению с 15 стадиями с выходом 0,8% в первом синтезе) с необычным использованием трифторметильной группы в качестве замаскированной метильной группы. Это соединение функционирует как АТФ-конкурентный ингибитор, который действует в субнанолярном диапазоне для человеческого ROCK-1 ($IC_{50} = 0,6$ нМ) и ROCK-2 ($IC_{50} = 1,1$ нМ). Также он вызывает вазорелаксацию *in vitro*, а также в нескольких моделях *in vivo* [115] с активностью при экспериментальной легочной гипертензии [116].

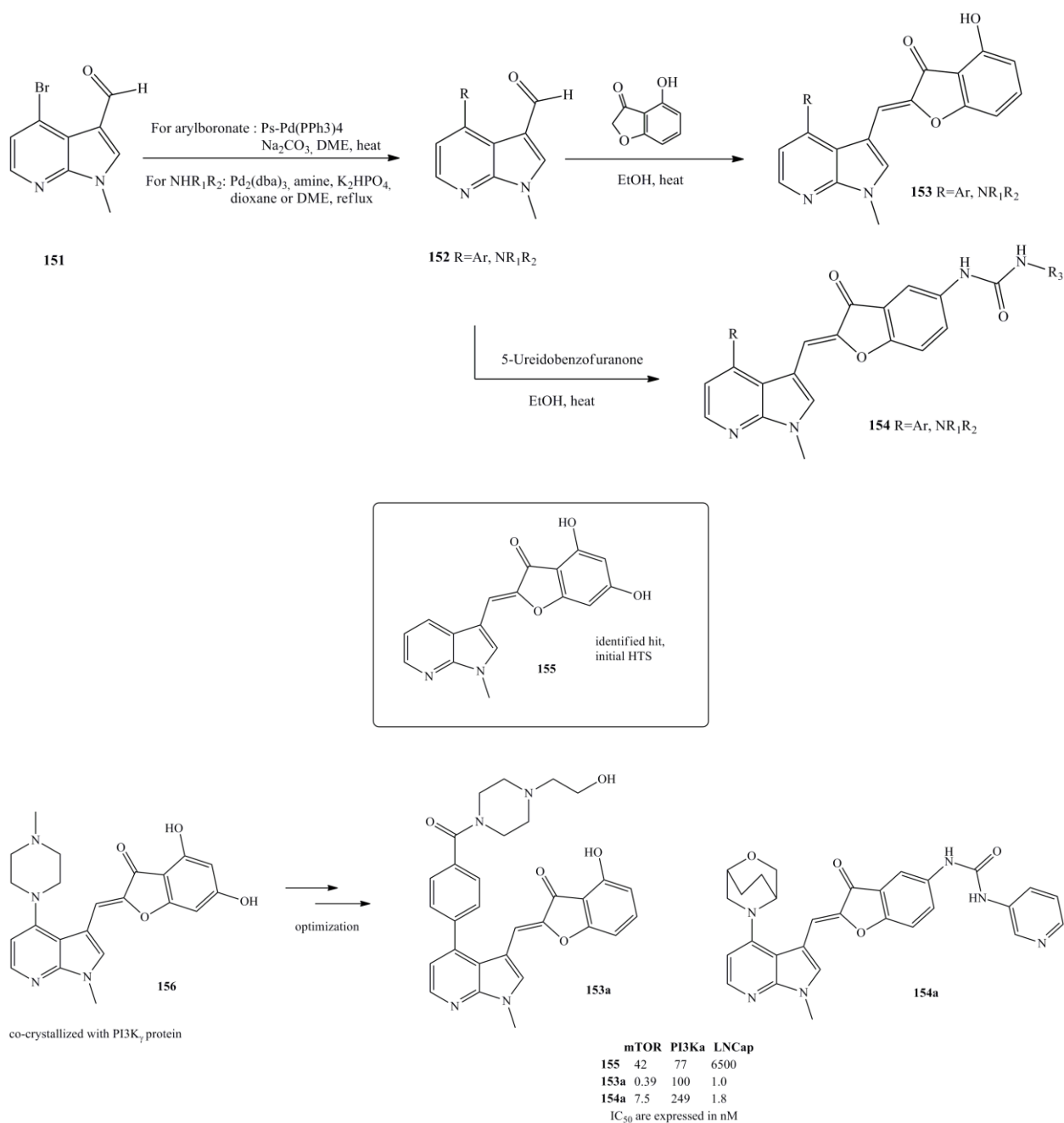
Рисунок 1 – Структура **150** ингибитора ROCK



1.2.17 Ингибитор m-TORкиназы

m-TOR(мишень рапамицина млекопитающих) принадлежит к семейству нетрадиционных серин/треониновых протеинкиназ с высокой молекулярной массой. Он присутствует в сигнальном пути PI3K и часто гиперактивен при раке человека [117]. m-TOR является каталитической субъединицей двух различных комплексов, называемых m-TOR Комплекс1 (m-TORC1) и 2 (m-TORC2). Ингибирование только mTORC1 может блокировать желательный механизм отрицательной обратной связи, вызывая увеличение передачи сигналов PI3K-Akt и снижение эффективности ингибитора. Этот механизм отрицательной обратной связи может быть восстановлен путем ингибирования m-TORC2. Таким образом, эти наблюдения привели к поиску низкомолекулярных АТФ-конкурентных ингибиторов m-TOR. Ситуация дополнительно осложняется сильной структурной аналогией между PI3K и m-TOR в их сайтах связывания АТФ, что приводит к двойным ингибиторам, которые предотвращают реактивацию пути. В этом контексте открытие селективных ингибиторов все еще остается сложной задачей.

Схема 28 – Различные ингибиторы m-TOR

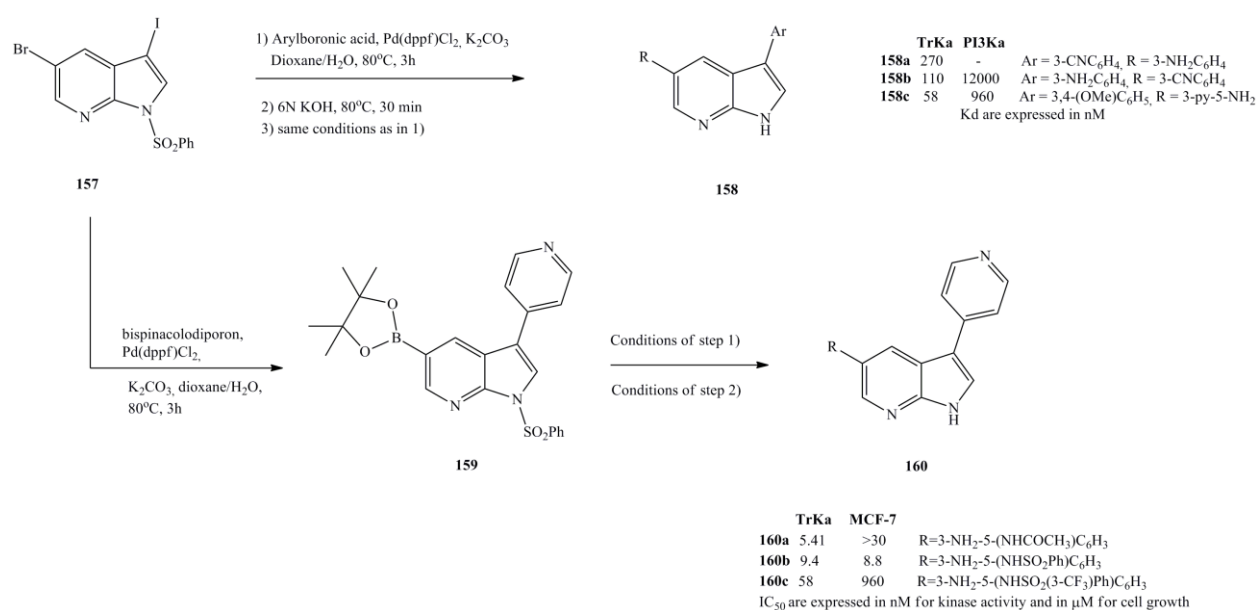


В поисках новых структур, которые были бы как сильнодействующими, так и селективными в качестве конкурентных ингибиторов АТФ m-TOR, был описан синтез двух новых семейств 4-замещенных-7-азаиндолов (схема 28) [118]. Первоначальный

скрининг с высокой пропускной способностью привел к идентификации индол-содержащего 4,6-дигидроксибензофуранона **155**, активность которого была увеличена путем замены 7-азаиндольного ядра. В первой серии **153** положение C-4 скэффолда 7-азаиндола подвергалось интенсивным модификациям. Устранение одной гидроксильной фенольной группы появилось в виде решения для оптимизации параметров активности и селективности в отношении ферментов, активности клеток и метаболической стабильности. Трехмерная гипотеза режима связывания была полностью проиллюстрирована исследованиями стыковки и была подтверждена кристаллографическими данными.

Второе исследование началось с метаболически нестабильного производного 7-азаиндола-полифенола **156** [119]. Совместная кристаллизация этой структуры с PI3Kγ приводит к синтезу другой серии молекул **154**, в которой фенольные гидроксильные группы заменяют уреидогруппой, известной изостерой. Таким образом, получена большая библиотека соединений. В серии **154** положение присоединения мочевины и характер остатков мочевины были модифицированы. Как утверждается, уреидогруппа метаболически лучше, чем две фенольные гидроксильные группы. Производное **154a** оказалось наиболее перспективным производным серии **154**. Доступ к обоим соединениям достигается путем реакции альдольной конденсации замещенного бензофуран-3-она с соответствующим 3-формил-7-азаиндолом **152**.

Схема 29 – Синтез ингибиторов TrkA киназы



1.2.18 Ингибитор TrkA киназы

Подмножество Trk состоит из трех рецепторных тирозинкиназ. Связанная с тропомиозином киназа А (TrkA) участвует в злокачественной трансформации, метастазировании, выживании, миграции, ангиогенезе и передаче сигналов инвазии при раке. Кроме того, дефектная передача сигналов TrkA уменьшает восприятие боли. Совсем недавно в литературе сообщалось о структуре 7-азаиндола при разработке, синтезе и оценке ингибиторов Trk при раке и ангиогенезе [120]. Библиотека была получена, как описано ранее для ингибиторов ALK (см. Схему 1), или путем создания общего промежуточного соединения 7-азаиндола **159**, которое используют для введения молекулярного разнообразия в C-5 (схема 29). Средство, измеренное в отношении Trk, сравнивали с таковым, полученным с помощью РІЗК. 7-азаиндолы, содержащие метоксифенильную, цианофенильную и аминофенильную группы в положении C-3 и 3-аминированные (Het) Ar группы в положении C-5. Улучшенную селективность наблюдали с соединениями типа **160** с 4-пиридилным фрагментом. Дальнейшее изменение заместителя в положении C-5 дает соединение **160с** в качестве лучшего производного в этой серии, которое было дополнительно подвергнуто профилированию селективности киназы на панели из 30 связанных с раком киназ. Измеряли как рост клеток, так и активность внутриклеточной киназы. Результаты стыковки показали, что атом азота пиридина образовал водородную связь с Lys544, аминогруппа 7-азаиндола выступила в качестве донора водородной связи с Glu590, а атом азота в седьмом положении образовал водородную связь с Met592. Было показано, что этот сильный апоптотический препарат обладает антионкогенным действием, ингибируя миграцию клеток и образование микротрубочек.

1.2.19 Способ связывания азаиндола

Использование рентгеновской кристаллографии в исследованиях киназ дает структурную информацию, необходимую для разработки более сильнодействующих и селективных ингибиторов. Поиск по подструктуре в обновленной базе данных MOE-киназы [121] и в RCSB Protein Data Bank [122] с использованием SMILEи ключевого слова «kinase» позволил получить 94 записи. Затем удалялись молекулы, содержащие азаиндолы в трициклической структуре. Были сохранены только кристаллические структуры, содержащие домены протеинкиназы, как описано Мэннингом и исследователями [123].

После применения всех вышеупомянутых фильтров в итоге было получено 58 кристаллических структур, содержащих 3, 7 и 48 элементов для 4-, 5- и 7-азаиндольных каркасов соответственно (таблица 4). Интересно, что кристаллическая структура 6-

азаиндола не была представлена в кристаллографической базе данных, кроме трициклических 6-азаиндольных лигандов.

Природный субстрат, АТФ, связывается с шарнирной областью протеинкиназы посредством двух водородных связей. Как показано на рисунке 2, адениновый фрагмент АТФ содержит один акцептор водородной связи и один донор водородной связи, подвергнутый воздействию вторичного амина и карбонильной группы из аминокислотного остова соответственно [124].

За последние десятилетия большинство гетероциклических каркасов ингибиторов киназы были разработаны для имитации аденинового фрагмента АТФ и, следовательно, его связывания с шарнирной областью белка [125]. Как показано в таблице 4 и на рисунке 3а, только одна кристаллическая структура (код PDB: 2WD1) 4-азаиндольного каркаса связывается с шарнирной областью [63]. Азот, присутствующий в пиридиновом кольце, действует как акцептор водородной связи.

Большинство лигандов, включающих 5-азаиндол, связываются с активным центром АТФ, образуя взаимодействия водородных связей через азот пиридина и вторичный амин, связанный с каркасом азаиндола (рис. 3б). Стратегия медицинской химии, используемая в исследованиях киназы для создания водородной связи, принимающей функциональное связывание с шарнирной областью, должна включать вторичный амин, часто замещенный анилин, связанный с гетероциклическим каркасом [126]. Этот подход был применен ко многим гетероциклическим скаффолдам [127]. Вемурафениб (**161**), ингибитор B-Raf (V600E), содержащий скаффолд 7-азаиндола и разработан на основе фрагментарного подхода к открытию лекарств (рис. 4). Он является единственным одобренным FDA ингибитором низкомолекулярной киназы, в строение которого есть азаиндольный каркас [128].

Интересно, что фрагмент 7-азаиндола был сокристаллизован в химерном комплексе РКА-РКВ (Рисунок 3с). Этот фрагмент занимает сайт связывания АТФ и идеально имитирует функцию донорной/акцепторной водородной связи аденина АТФ через *N-H* связь пиррола и атома азота пиридина [129]. Поэтому неудивительно, что этот каркас встречается чаще у ингибиторов киназы по сравнению с 4-, 5- и 6-азаиндолами, и что 48 рентгеновских кристаллических структурных комплексов лиганда/протеинкиназа содержат каркас 7-азаиндола (таблица 4).

Рисунок 2 – Представление АТФ в режиме связывания в схематическом активном центре (слева) и в рентгенокристаллической структуре CDK2 (код PDB: 1FYN)

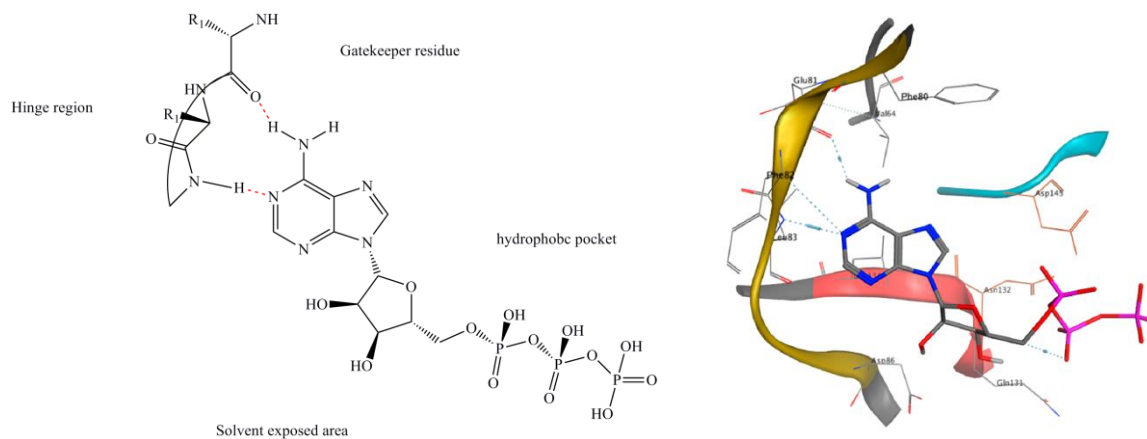


Таблица 4 – Список кристаллических структур на основе их режима связывания.

| Азаиндол связывается с шарнирной областью и имитирует аденин АТФ | 4-азаиндол | 5-азаиндол | 6-азаиндол | 7-азаиндол |
|--|------------|----------------------------------|------------|---|
| | | | | 1ZYS 2QHM 2QOH 2UVX 2Z60 3BHT 3BHU 3C4C 3C4D 3C4E |
| | | | | 3C4F 3CE3 3CTJ 3DJ6 3DK3 3DK6 3DK7 3E87 3ETA 3FQH |
| Yes | 2WD1 | 4C4E 4C4F 4C4G 4C4H 4C4I 4C4J | None | 3GFW 3GQL 3HDM 3HDN 3JY9 3LJ3 3LVP 3OG7 3RCJ 3ZCL |
| | | | | 3ZLS 4AOI 4AWI 4BIC 4BID 4BIE 4FK3 4FV9 4GU6 4HVS |
| | | | | 4HW7 4IQ6 4JOA 4K1B 4O91 |
| No | 1OZ1 3LVP | 4PMS | None | 2QD9 3EN4 4JG7 |

Рисунок 3 – Рентгенокристаллические структуры (а) связывания 4-азаиндола с киназой c-Met (код PDB: и 2WD1); (б) связывание 5-азаиндола с киназой ТТК (код PDB: 4C4J); (с) связывание 7-азаиндола в химерном комплексеРКА-РКВ (код PDB: 2UVX)

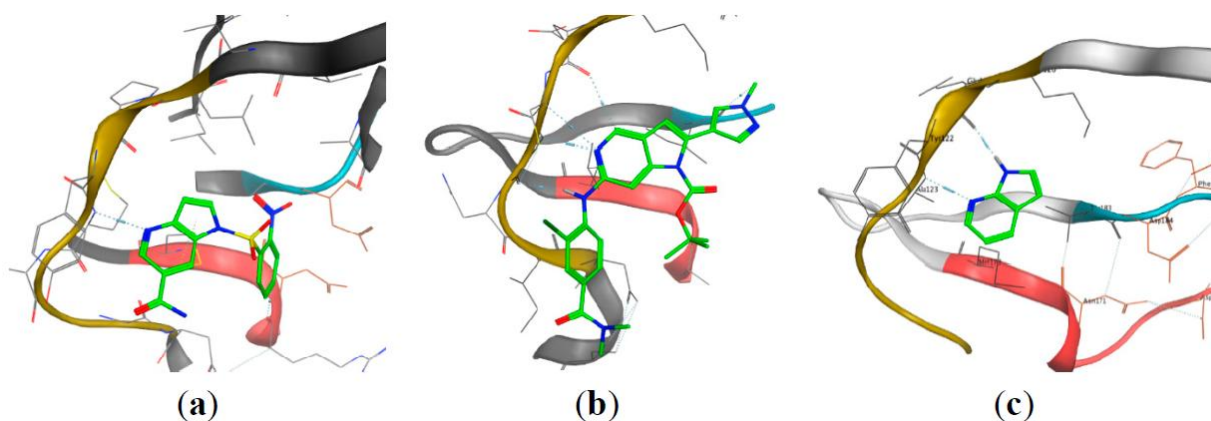
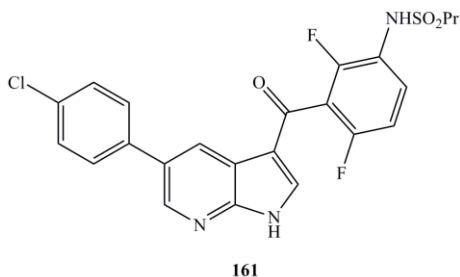
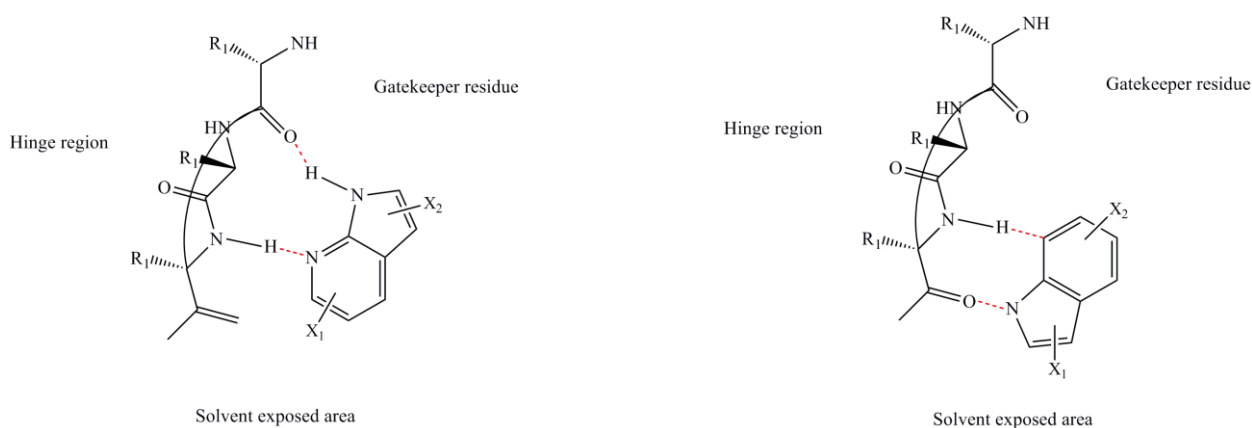


Рисунок 4 – Структура вемурафениба



Кроме того, скаффолд 7-азаиндола может связываться двумя различными способами, взаимодействуя друг с другом посредством бидентатной водородной связи, дающей/принимаящей функциональность гетероцикла, в амиды основной цепи в шарнирной области киназы (рис. 5). В то время как большая часть молекул, включающих 7 азаиндол, связывается с 5-членным кольцом, направленным к остатку привратника, в нескольких примерах фрагмент 7-азаиндола переворачивается в активный центр, что наблюдается в кристаллических структурах 3LVP, 3DJ6, 3CTJ, 3CE3, 3FQH, 3GU6 и 4AWI. Следовательно, при рассмотрении соединений, содержащих 7-азаиндол, обе ориентации гетероцикла в активный сайт должны быть приняты во внимание при разработке ингибиторов киназы. Кроме того, при добавлении вторичного амина к пиридиновому кольцу, образующему каркас 6-амино-7-азаиндола, может быть образовано трехзубчатое шарнирное связующее, как обнаружено в кристаллической структуре 3GFW.

Рисунок 5 – Представление двух ориентаций способа связывания 7-азаиндолов, взаимодействующих с амидами остова в шарнирной области киназы



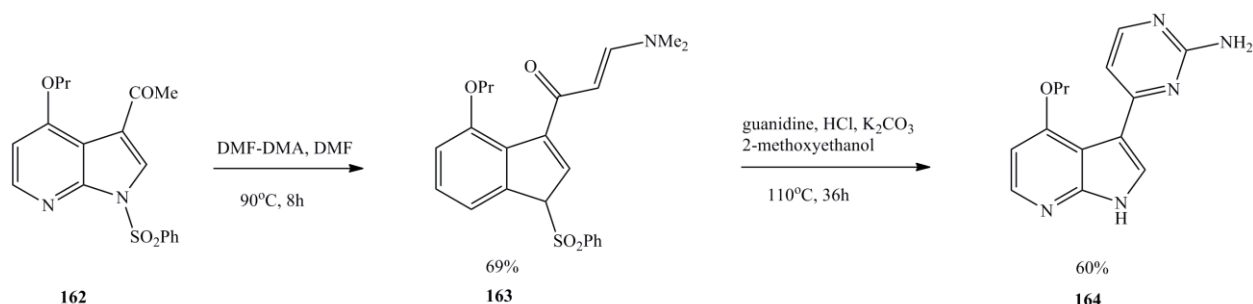
1.2.20 Натуральные продукты как ингибиторы киназы

Производные азаиндола, которые ингибируют киназы, представляют собой, главным образом, синтетические соединения, полученные в результате химической креативности, HTS или *in silico* и кристаллографических подходов. Также источником для

разработки лекарств могут послужить природные ресурсы. В этой области будут рассмотрены две серии.

Первая серия связана с мериолинами, которые являются химическими гибридами семейств морских натуральных продуктов мериадининов и вариолинов [130, 131]. Мериолины проявляют сильную ингибирующую активность в отношении циклинзависимых киназ (CDK) и являются проапоптотическими и антипролиферативными агентами. Группа из 14 мериолинов была синтезирована и протестирована. Соединение **164**, представитель этой серии, имеет значения $IC_{50} = 7$ нМ (CDK1) и 3 нМ (CDK2). И получается в две стадии из 3-ацетил-7-азаиндола (**162**) (схема 30). 2-аминопиримидиновый заместитель последовательно вводят путем реакции DMFDMA с метильной группой кетона **162** с образованием соединения **163** с выходом 69% и последующим нагреванием с гуанидином в 2-метоксиэтаноле с получением соединения **164**. Это производное представляет собой неселективный ингибитор киназы, который влияет на несколько киназ в наномолярном диапазоне и который был сокристаллизован с CDK2/циклин А.

Схема 30 – Синтез мериолина (**164**)



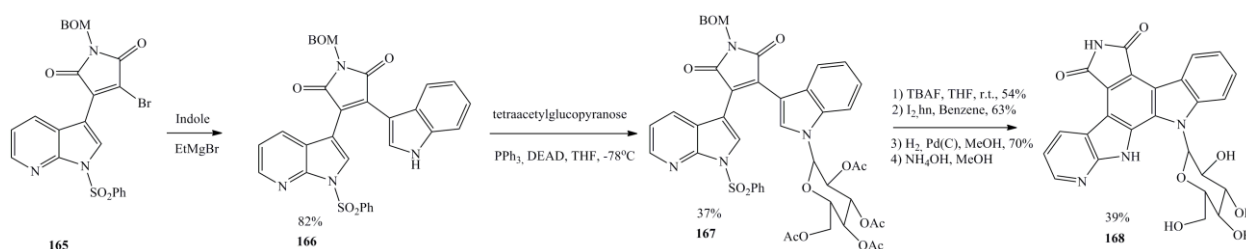
| Kinase assay | CDK1 | CDK2 | CDK5 | CDK9 | GSK-3 | CK1 | DYRK1A |
|---------------------|---------|------|--------|------|--------|---------|--------|
| meriolin 164 | 7 | 3 | 3 | 6 | 25 | 200 | 37 |
| Cell assay | SH-SY5Y | | HEK293 | GMB | KMS-11 | LS 174T | |
| meriolin 164 | 26 | 85 | 80 | 40 | 47 | | |

IC_{50} are expressed in nM for kinase activity and in mM for cell growth

Во втором примере было обнаружено, что ребекамицин, микробный метаболит вносит разрывы в эукариотическую ДНК. Также обнаружено, что он является слабым ингибитором топоизомеразы 1 в отношении протеинкиназы С и протеинкиназы А. Однако его плохая растворимость не позволяет использовать его в качестве противоракового средства. Группа исследователей была вовлечена в синтез многочисленных полициклических аналогов этой молекулы [131,132]. Производное моноаза получали из ВОМ (бензилоксиметилацеталь) защищенного азаиндола броммалеимида **165** (схема 31). Индол вводили с классическим индольным реагентом Гриньяра, и гликозилирование

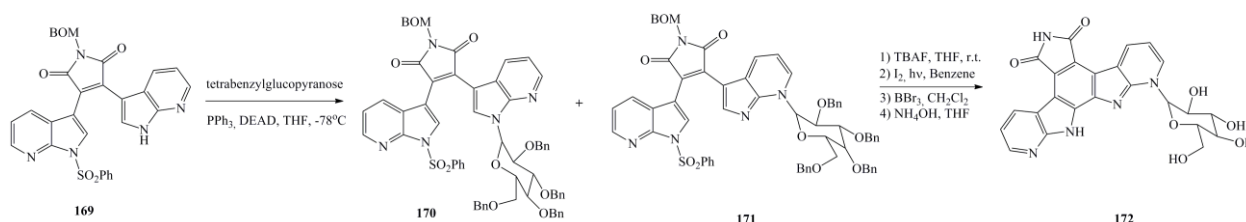
достигали, используя реакцию Мицунобу **167**. После удаления защитной группы индола, окислительная УФ циклизация с последовательным снятием защиты (гидрогенолиз, аминолит) дает соединение **168** с выходом 39%. Это производное ингибировало Chk1 в субмикромольном диапазоне ($IC_{50} = 327$ нМ).

Схема 31 – Моноазааналоги ребеккамицина



Второй синтез разработан для размещения глюкозидного фрагмента на 7-азаиндоле (схема 32). В этом случае, во время реакции Мицунобу **169**, N1-гликозилированный **170** является основным продуктом реакции с небольшим количеством N-7-гликозилированного производного **171**. Затем соединение **171** преобразовывают в соединение **172** с использованием аналогичного подхода, что и для соединения **168** [133]. Ингибирование Chk1 увеличилось ($IC_{50} = 61$ нМ).

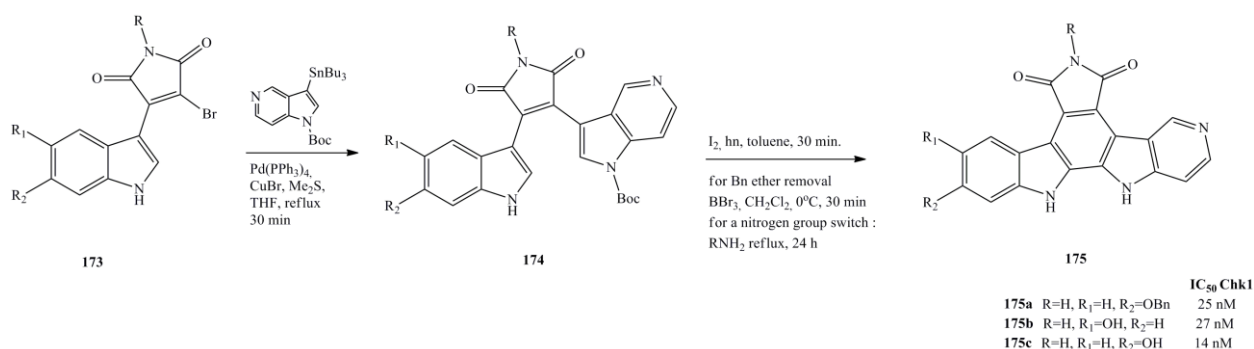
Схема 32 – N7-гликозилированные моноазааналоги ребеккамицина



Аналогичным образом разработана серия 5-азаиндолов **175** (схема 33) [30]. Реализация синтеза осуществилась при использовании катализируемой палладием реакции типа Стилла **173**, чтобы реакция пошла по положению C-3 вместо N-1 положения азаиндола, используют реактив Гриньяра. Фотохимическая циклизация, ароматизация и удаление защитных групп приводят к исходному скаффолду **175**. Гликозилирование может быть выполнено для имитации ребеккамицина, а замещение малеимида может быть осуществлено путем простого аминного обмена. Была измерена активность Chk1, и

наилучшие результаты были получены только с агликоновым фрагментом, примером которого являются производные **175a-c**.

Схема 33 – Серия 5-азаиндола ребеккамицина



Упрощение этого ряда стало возможным благодаря функционализации бисарилмалеимидных групп, химических интермедиатов ряда индолокарбазолов, что приводит к появлению нескольких сильных ингибиторов киназы (схема 34). Среди них 3-азаиндолил-4-арилмалеимиды **178** получают по методу Фаула из кетоэфиров азаиндола **177**, и оценивают их биологические свойства [134, 135]. Также обнаружено значительное ингибирование протеинкиназы, такой как VEGFR и GSK-3 β . Производное 6-азаиндола **178c** с $\text{Ar}_1 = 3,4,5$ триметоксифенилом имеет значения IC_{50} 48 нМ для VEGRF2 и 9 нМ для GSK-3 β (схема 34). Для сравнения, аналог 7-азаиндола **178d** имеет немного лучшее ингибирование VEGRF2 37 нМ, но он неактивен в отношении GSK3 β . Значения IC_{50} для производных 4- и 5-азаиндолов были примерно в 10 раз выше для VEGRF2. Киназа FLT-3, которая играет решающую роль в пролиферации и дифференцировке клеток, наиболее сильно ингибируется производным 6-азаиндола **178c** со значениями $\text{IC}_{50} = 18$ нМ. Другие сообщения дополняют семейство с введением гетероциклов вместо простых арильных групп и гидроксильной боковой цепи в 7-азаиндолы **179–183**, что значительно повышает активность GSK3 [136].

В другом исследовании стыковка 7-азапиридильного производного **184** (Рис. 6) в АТФ-связывающем сайте GSK3 β показала несколько ключевых взаимодействий: две водородные связи между малеимидиной основой с карбонильной цепью Asp133 и

основной цепи Val135 и амидным водородом соответственно. Азот азаиндола, составляющий всего около 3,6 Å от карбоксильной группы Asp200, может образовывать дополнительную водородную связь [8]. Бисарилмалеимиды описаны как новые селективные ингибиторы для лечения колоректального рака человека [137].

Схема 34 – 3-(7-азаиндолил)-4-(гет)арилмалеимид

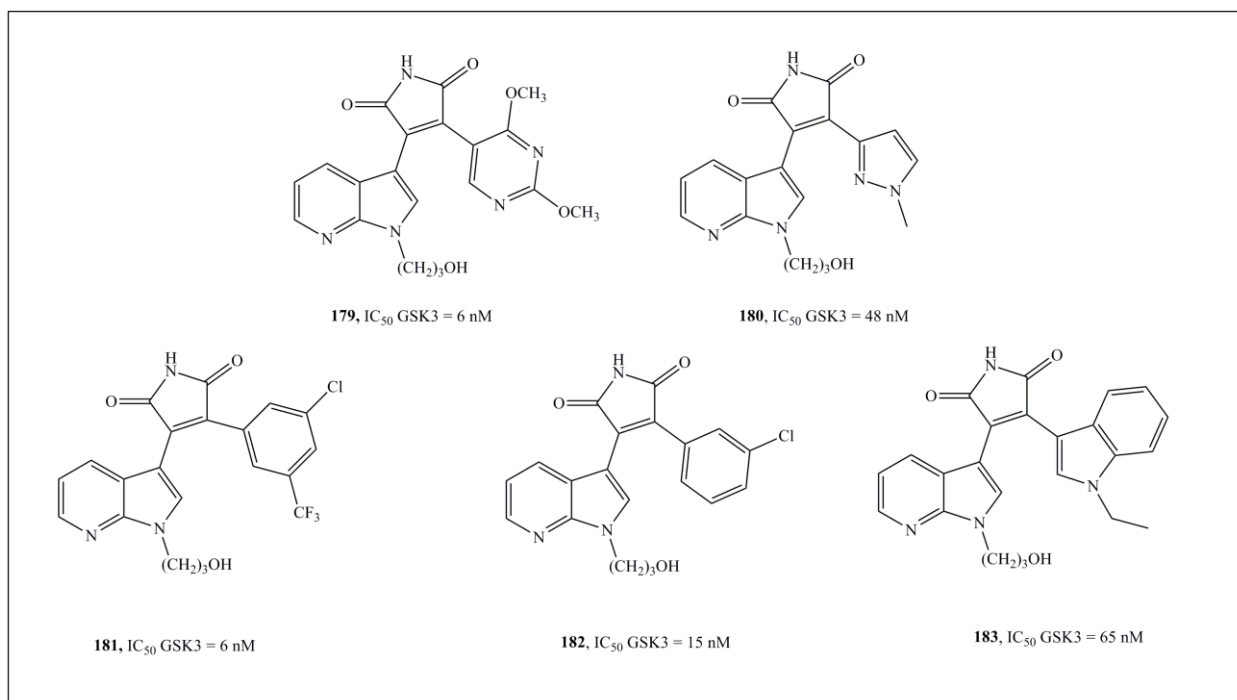
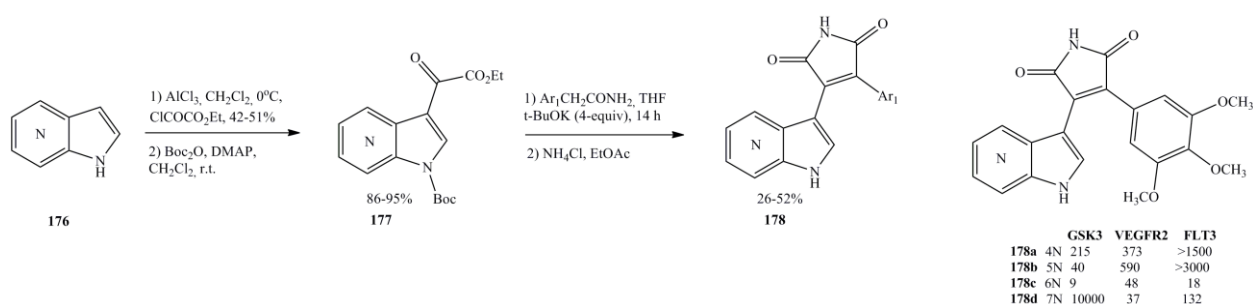
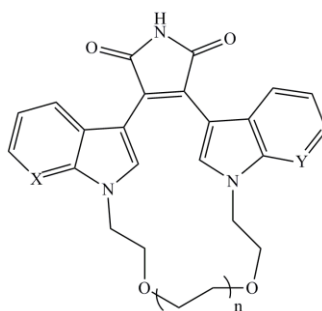


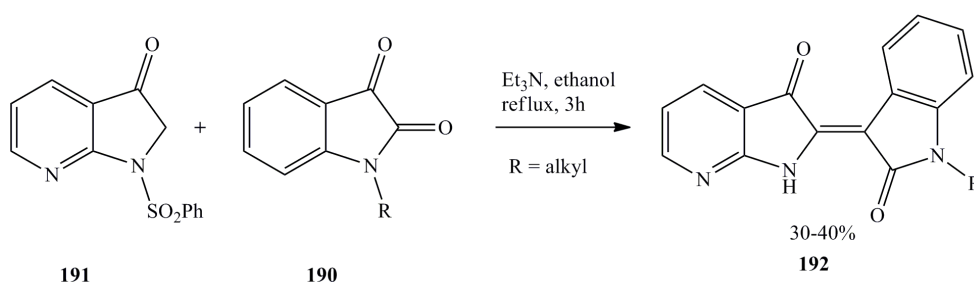
Рисунок 6 – Ингибитор GSK-3 184



| Соединение | n | X | Y | IC ₅₀ (nM) |
|-------------|---|----|---|-----------------------|
| 189a | 1 | CH | N | 138 |
| 189b | 2 | CH | N | 17 |
| 189c | 1 | N | N | 620 |
| 189d | 2 | N | N | 34 |
| 189e | 3 | N | N | 48 |
| 189f | 4 | N | N | 403 |

Следующая естественная структура - это индирубин (2,3-бис-индольный димер). Натуральный продукт и его аналоги ингибируют циклинзависимую киназу (CDK), но они обладают плохой растворимостью [140]. Азаиндирубины синтезируют с целью повышения фармакодинамических свойств (схема 36). Реакция альдолизации при кипячении с обратным холодильником изатинов **190** с 1-бензолсульфонил-7-азаиндолином (**191**) в этаноле в присутствии триэтиламина дает соединение **192** в виде Z-изомера с потерей бензолсульфонильной группы. Активность определяется по ингибированию CDK2-киназы и сообщалось, что соединение **192R = H**, имеющее значение IC₅₀=8,8 мкМ, было менее эффективным, чем сам индирубин (IC₅₀ = 2,4 мкМ).

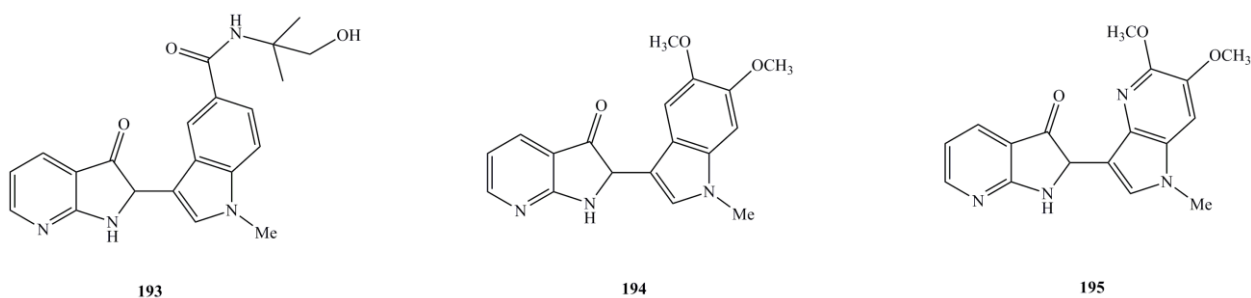
Схема 36 – Синтез азаиндирубинов



Включение простой C-C-связи между двумя азаиндольными фрагментами приводит к мощным ингибиторам Суk-киназы (Картинка 8) [141, 142]. Эта мишень представляет собой цитозольную нерецепторную киназу, которая опосредует передачу сигналов иммунорецептора. Ингибирование этого фермента является хорошей стратегией для лечения аллергии, астмы и ревматоидного артрита. Соединение **193** имеет значение

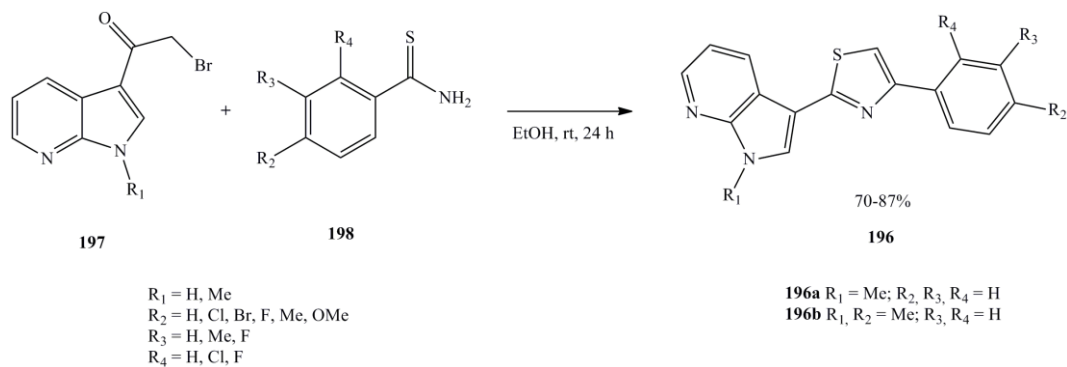
$IC_{50}=0,57$ мкМ. Кристаллографический анализ показал, что акцепторный и донорный азот ядра 7-азаиндола образует водородную связь с основной цепью NH и карбонилем остатка шарнира A451 соответственно [141]. В другой серии инсулиноподобный фактор роста (IGF), который стимулирует рост и опосредует метаболические сигналы, может подвергаться воздействию других производных бисазаиндола. Соединения, способные ингибировать рецепторы IGF, могут быть противораковыми агентами [143]. Соединение **194** получено благодаря скринингу с высокой пропускной способностью (IGF1-R $IC_{50} = 55$ нМ), и также оценена селективность в отношении панели киназ. Это соединение является мощным ингибитором Syk ($IC_{50} = 55$ нМ) и IRK (инсулиновая рецепторная киназа) ($IC_{50} = 86$ нМ). Активность значительно снижается при введении метильной группы к атому азота 7-азаиндола IC_{50} IGF1-R > 10 мкМ. Соединение **195** с мотивом как 4-азаиндола, так и 7-азаиндола является лучшим ингибитором (IGF1-R $IC_{50} = 2$ нМ). Усиление ингибирования является результатом активной конформации, в которой атом азота 4-азаиндола взаимодействует с атомом водорода в третьем положении 7-азаиндольного фрагмента.

Рисунок 8 –Сильные C-C-связанные азаиндольные соединения



В последнем примере, нортопсентины АС, морские природные продукты, имеющие характерный скелет 2,4-бис(3'-индолил)имидазола, стимулировали синтез бисиндолилтиазолов, которые продемонстрировали сильную ингибирующую активность в отношении широкого спектра линий раковых клеток человека [144,145]. Каркас 7-азаиндола используют для создания гибридных структур индолилтиазола, в которых одно индольное кольцо заменено фенильным и/или азаиндольным фрагментом, и тестировали активность против CDK1. Синтез 3-(2-фенил-1,3-тиазол-4-ил) пирроло[2,3-*b*]пиридина (**196**) основан на реакции Ханца между α -бромацетильными соединениями **197** и тиоамидами **198** (схема 37) [146]. Два соединения **196a** и **196b** показали ингибирование CDK1 со значениями $IC_{50} = 0,41$ и $0,85$ мкМ соответственно, но не было обнаружено активности для CDK5 и GSK3 β .

Схема 37 – Синтез гибридных индолилтиазольных ингибиторов CDK1



В заключение можно сказать, что азаиндольный скелет имеет большое значение для получения биологически активных соединений. Создание азаиндольной «платформы», функционализированной различными реакциями (литирование, защита, окисление, катализируемое палладием связывание и т. д.), является ключом к молекулярному разнообразию. Эти соединения проявляют сильную биосовместимость и легко переносятся живыми организмами. Азаиндол является отличным биоизостером для системы индольных колец, и этот факт подтверждается растущим числом литературных ссылок каждый год, которые используют эту концепцию для создания активных молекул. Параллельно с процессом разработки лекарств, который объединяет химиков-медиков, компьютерных химиков, биологов и фармакологов, также разрабатывается большое количество фундаментальных органических синтезов. Новые реакции и методология, основанные на творчестве химиков-органиков, изучаются с (гетеро)-ароматическими или гетероциклическими неароматическими системами (псевдосахарами и пептидами). Эти стратегии в полной мере используют различные возможности, предлагаемые растущей областью органокатализа, использованием редких металлов или ферментов для снятия ограничений и создания новых структур.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

2.1 Синтез ингибитора

Анализ литературных данных и ранние исследования нашей лаборатории показали перспективу использования азаиндольного скаффолда для разработки ингибитора EGFR. Ранее компания Пфайзер описала синтез азаиндольного ингибитора МАРК-киназы **9**. Однако, как известно, зачастую ингибиторы МАРК-киназы проявляют мультитаргетную активность по отношению к ряду киназ, в том числе EGFR. В представленной работе описан синтез ингибитора **9** и проведено исследование его цитотоксического эффекта.

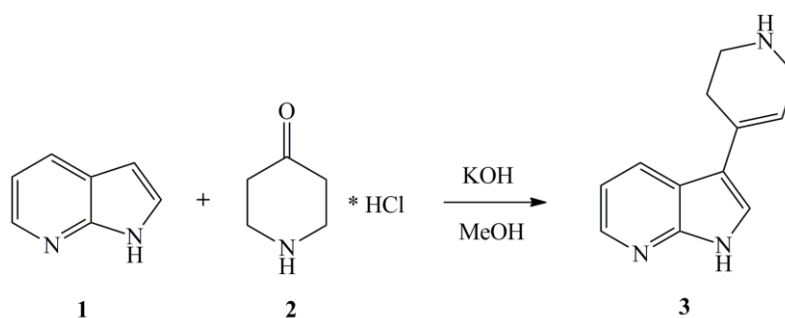
На схеме 5 представлена стратегия синтеза целевого ингибитора P00456 – соединение **9**.

На первой стадии осуществляется основно-катализируемая конденсация незамещенного 7-азаиндола с гидрохлоридом пиперидона посредством продолжительного кипячения в метаноле, что приводит к соединению **3**. На последующей стадии реализуется окисление 4,6-дихлопиримидина до сульфона с последовательным нуклеофильным замещением атомов хлора кислородсодержащим и азотсодержащим нуклеофилом. На заключительной стадии осуществляется палладий-катализируемое карбонилирование и амидирование, приводящее к соединению **9**.

Строение всех синтезированных соединений подтверждено с помощью ЯМР спектроскопии. В ЯМР ^1H целевого соединения находятся все характеристические сигналы.

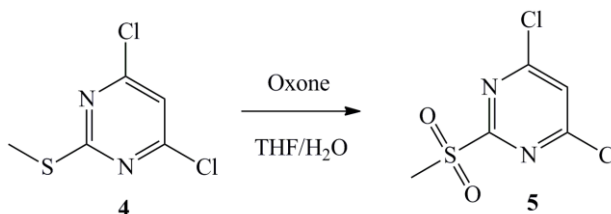
Производное азаиндола **3** получали посредством основно-катализируемой конденсации азаиндола **1** и гидрохлорида пиперидона **2** в метиловом спирте.

Схема 1.



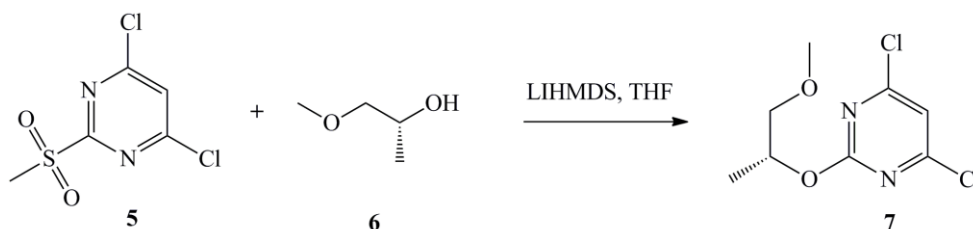
Сульфон **5** синтезировали по разработанному в НИЛ ФГС методу окисления пиримидинсодержащих сульфидов под действием оксона в среде THF/H₂O. Несмотря на имеющиеся в литературе противоречивые данные по окислению пиримидинсульфидов, порой приводящего к образованию 2-оксопроизводных, в ходе оптимизации данной стадии наблюдалось гладкое окисление сульфида **4** до сульфона **5** при перемешивании при комнатной температуре в течение 16 часов.

Схема 2.



Синтез (*R*)-4,6-дихлор-2-((1-метоксипропан-2-ил)окси)пиримидина (**7**) проводили путем реакции ароматического нуклеофильного замещения в THF

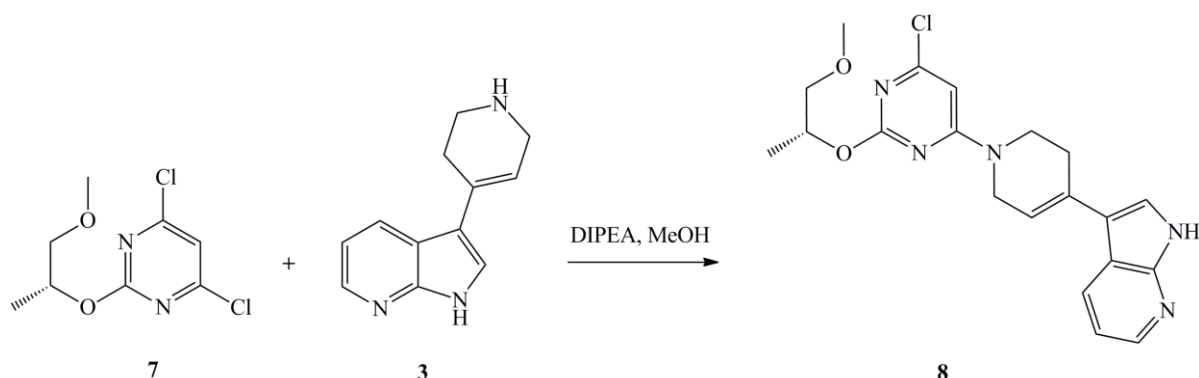
Схема 3.



Производное 3-(1,2,3,6-тетрагидропиперидин-4-ил)-1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридина **8** получали в ходе реакции ароматического нуклеофильного замещения соединения **7** с

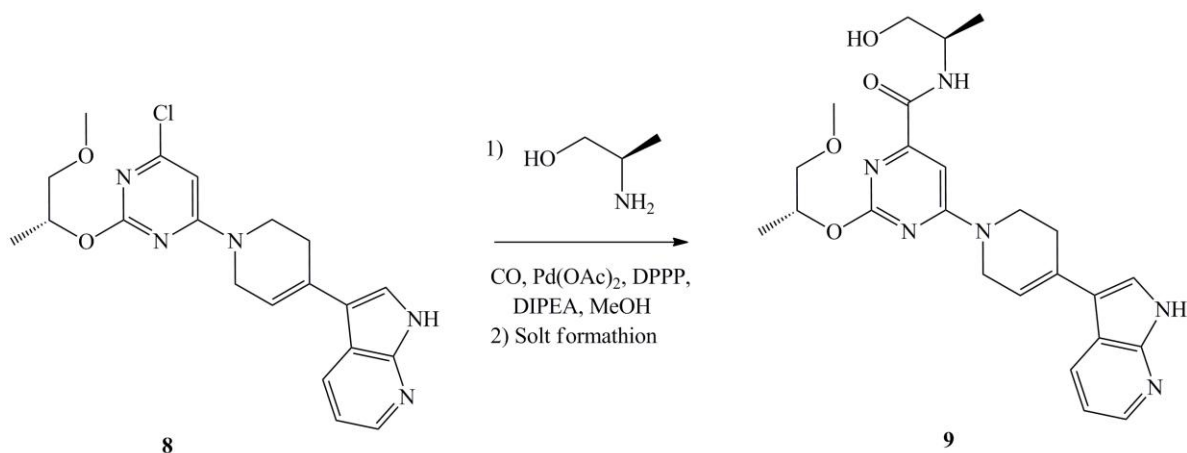
соединением **3** в метиловом спирте. Синтез проводили путем перемешивания реакционной смеси при комнатной температуре в течение 2 часов.

Схема 4.



Конечное соединение **9** получали путем палладий-катализируемого карбонилирования и амидирования в метаноле.

Схема 5.



2.2 Биологические испытания

Ранее для производных соединения **5** методами *in vitro* была продемонстрирована высокая ингибирующая активность в отношении МАРК-киназы. В данной работе мы исследовали данное соединение на клеточных линиях экспрессирующих киназу рецептора эпидермального фактора роста дикого типа. Нами была продемонстрирована высокая цитотоксичность в отношении клеточной линии A431 (эпидермоидная карцинома), A549 (карцинома легкого) и MCF-7 (карцинома молочной железы). Результаты токсичности, полученные в рамках МТТ-теста, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты цитотоксичности

| Соединение | Цитотоксичность, EC ₅₀ (мкмоль/л) | | |
|-------------|--|------------|------------|
| | Клеточная линия | | |
| | A431 | A549 | MCF-7 |
| 5 P00456 | 3.19±0.11 | 11.71±0.56 | 10.52±0.66 |

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Реагенты и оборудование

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

Контроль за ходом реакции окисления и чистоту полученных соединений оценивали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent 1220 м» со спектрофотометрическим детектором на колонке ZORBAX C-18. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила и воды в соотношении 8:2; скорость потока 1 мл/ мин. Обработка и преобразование полученных данных проводилась с применением программы OpenLab фирмы Agilent.

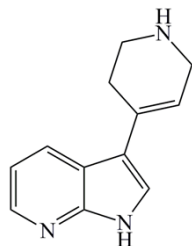
Данные ЯМР спектроскопии получены при комнатной температуре в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО-*d*₆) на спектрометре Bruker 600 Avance™ с рабочей частотой 600.22 и 150.93 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно. Сигналы химических сдвигов ядер ¹H и ¹³C приведены в миллионных долях относительно сигнала ТМС. Спектры ЯМР ¹H регистрировались со спектральной шириной 7.1 кГц, точкой данных 64 К, цифровым разрешением 0.22 Гц, задержкой релаксации 1.0 с и 30° шириной

импульса 2.8 мкс, в то время как ^{13}C – с шириной спектра 39.06 кГц, точкой данных 64 К, задержкой релаксации 2.0 с и 30° шириной импульса 5.6 мкс.

Температуры плавления определены на нагревательном столике Voetius и не исправлены.

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

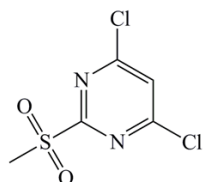
3.2 Синтез целевых соединений



3-(1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-ил)-1H-пирроло[2,3-*b*]пиридин(3)

К смеси 7-азаиндола (1.5 г, 13 ммоль) и пиперидин-4-он гидрохлорида (3.53 г, 26 ммоль) в 35.3 мл метанола добавили KOH (1.82 г, 32.5 ммоль), растворенный в 5 мл H_2O . Смесь кипятили в течение 16 часов. Раствор темного цвета концентрировали для удаления метанола, затем разбавляли насыщенным раствором NaCl и экстрагировали EtOAc в течение 5 часов. Органический слой промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над MgSO_4 . После упарили реакционную смесь в роторном испарителе. Осадок растерли с TBME, при этом получив твердый продукт желтого цвета.

Выход продукта составил 75%; Т.пл. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (J , Гц): 9.23 (1H, с); 8.32 (1H, дд, $J=4.80, 1.26$); 8.21 (1H, дд, $J=7.96, 1.39$); 7.29 (1H, с); 7.12 (1H, дд, $J=7.83, 4.80$); 6.14-6.33 (1H, т); 3.60 (2H, кв, $J=2.61$); 3.16 (2H, т, $J=5.81$); 2.46-2.57 (2H, т).

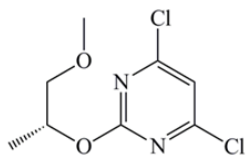


4,6-дихлор-2-(метилсульфонил)пиримидин(5)

Раствор 4,6-дихлор-2-(метилтио)пиримидина (20 г, 102.53 ммоль) и оксона (189.0 г, 308 ммоль) в 450 мл THF и 150 мл H_2O перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Когда реакция была завершена (мониторинг ТСХ, петролейный эфир:EtOAc = 1:1), реакционную смесь фильтровали. Фильтрат концентрировали, растворили в 500 мл EtOAc и последовательно промывали H_2O два раза, затем 300

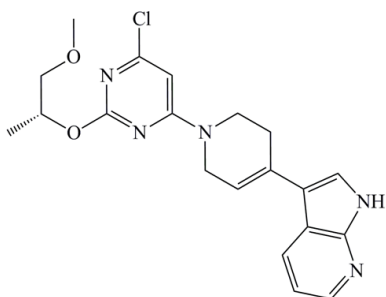
млNaCl. Органический слой сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Осадок очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир:EtOAc = 10:1, далее EtOAc).

Выход продукта составил 86%; Т.пл.



4,6-дихлор-2-[[*(2R)*-1-метоксипропан-2-ил]окси]пиримидин(7)

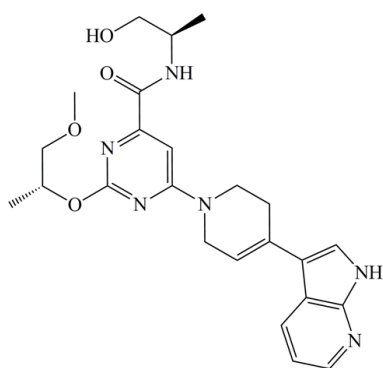
Раствор 4,6-дихлор-2-(метилсульфонил)пиримидина (20 г, 88.08 ммоль) и (*2R*)-1-метоксипропан-2-ола (7.94 г, 88.1 ммоль) в 680 мл THF охладили до 0°C, по каплям в течение 30 минут через делительную воронку добавляли LiHMDS (96.9 мл, 1M в THF). Полученную суспензию перемешивали при 0° C в течение 20 минут. Оставили смесь нагреваться до комнатной температуры. Когда реакция была завершена (мониторинг ТСХ, петролейный эфир:EtOAc = 1:1), реакцию концентрировали, растворили в 800 мл EtOAc и промывали насыщенным раствором аммиака и насыщенным раствором NaCl. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали, получая желтый маслянистый продукт, который использовали без дальнейшей очистки непосредственно в следующей стадии.



3-[1-(6-хлор-2-[[*(2R)*-1-метоксипропан-2-ил]окси]пиримидин-4-ил)-1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-ил]-1H-пирроло[2,3-*b*]пиридин(8)

К раствору 4,6-дихлор-2-[[*(2R)*-1-метоксипропан-2-ил]окси]пиримидина (20.9 г, 88.2 ммоль) и 3-(1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-ил)-1H-пирроло[2,3-*b*]пиридина (21.4 г, 79.3 ммоль) в 900 мл MeOH медленно добавили DIPEA (39.9 г, 53.8 мл, 309 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Когда реакция была завершена (мониторинг ТСХ, петролейный эфир:EtOAc = 1:1), реакцию концентрировали в вакууме, затем разбавляли 700 мл EtOAc и последовательно промывали двумя порциями по 700 мл насыщенным раствором NH₄Cl, 700 мл H₂O и 700 мл насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Осадок очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир:EtOAc = 2:1 до 0:1), получая светло-желтого твердый продукт, который использовали без дополнительной очистки.

Выход продукта составил 65%;Т.пл.



6-[4-(1H-пирроло[2,3-*b*]пиридин-3-ил)-5,6-дигидропиридин-1(2H)-ил)-N-(1-гидроксипропан-2-ил)-2-((1-метоксипропан-2-ил)окси)пиримидин-4-карбоксиамид(9)

Желтый раствор 3-[1-(6-хлор-2-[[*(2R)*]-1-метоксипропан-2-ил]окси]пиримидин-4-ил)-1,2,3,6-тетрагидропиридин-4-ил]-1H-пирроло[2,3-*b*]пиридина (10.0 г, 24.88 ммоль), (*2R*)-2-аминопропан-1-ол (5.61 г, 74.6 ммоль), DIPEA (9.7 г, 13.1 мл, 74.6 ммоль) в 180 мл MeOH поместили в сосуд из нержавеющей стали на 250 мл, а затем добавили Pd(OAc)₂ (0.6 г, 2.49 ммоль) и DPPP (2.1 г, 4.98 ммоль). Поставили на перемешивание (900 об/мин) и смесь продули аргоном (2 бар) три раза и CO (1 МПа) три раза. Реакционную смесь перемешивали до достижения давления 1 МПа CO и нагревали в течение 18 часов до 100 °С. Наблюдалось выпадение желтого осадка. ТСХ (EtOAc, R_f=0.2) показала, что реакция прошла до конца, и с помощью ЖХ-МС было обнаружено 93% желаемого продукта. Смесь отфильтровали и концентрировали. Осадок очистили хроматографией на силикагеле (10% MeOH в DCM), получая продукт светло-красного цвета.

Выход продукта составил 48%;Т.пл.;Спектр ЯМР ¹H, δ, м.д. (*J*, Гц): 9.69(1H, с); 8.30 (1H, д, *J*=4.4); 7.93–7.98 (2H, т); 7.06–7.11 (3H, т); 5.30–5.35 (1H, т); 4.58 (1H, с); 4.21–4.23(1H, т); 3.65–3.72 (3H, т); 3.49–3.52(2H, т); 3.41(3H, с); 3.13–3.15 (4H, т); 2.14 (2H, д, *J*=11.6); 1.68–1.77 (2H, т); 1.38 (3H, д, *J*=6.4); 1.27 (3H, д, *J*=6.4).

3.3 Биологические испытания

3.3.1 Культивирование клеток

Клетки эпидермоидной карциномы A431, карциномы легкого A549, карциномы молочной железы MCF-7 культивировали в среде DMEM (Gibco) дополненной эмбриональной бычьей сывороткой (10%), глутамином и антибиотиком/антимикотиком при 37°C и 5% концентрации углекислого газа.

3.3.2 Исследования цитотоксичности

Клетки линии соответствующей клеточной линии вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты (Eppendorf) по 7×10^3 клеток на лунку в полной среде DMEM. Через 24 часа в лунки с клетками добавляли исследуемые препараты, приготовленные из рабочих стоков *in situ* в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-9} моль/л и инкубировали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и оставляли на 4 часа в CO₂-инкубаторе, затем среду отбирали и вносили в лунки по 200 мкл ДМСО (Sigma, США) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре GloMax Multi+ при 560 нм, используя ДМСО как нулевой контроль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Осуществлён синтез азаиндольного МАРК-ингибитора с хорошим выходом. Показана возможность эффективного использования оксона для окисления пиримидинсодержащих сульфидов.

2. Посредством МТТ-теста показана высокая цитотоксичность *invitro* синтезированного соединения в отношении клеточных линий, сверхэкспрессирующих МСF-7, А549 и А431 в микромолярных концентрациях.

3. Показано, что высокая цитотоксичность на клеточных линиях сверхэкспрессирующих рецептор эпидермального фактора делает дальнейшее изучение механизма цитотоксического эффекта обусловленного мультитаргетным эффектом оправданным и актуальным.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang, S.W. Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of Cryptolepine, an Alkaloid Isolated from the Suriname Rainforest / S.W. Yang, M. Abdel-Kader, S. Malone, M.C.M. Werkhoven, et al. // *J. Nat. Prod.* – 1999. – Vol. 62. – P. 976-983;
2. Jacob A. P. Dinuclear and heptanuclear complexes of copper(II) with 7-azaindole ligand: Synthesis, characterization, magnetic properties, and biological activity / A. P. Jacob, N. M. Nicole, D. A. Hadi, A. Prosviri, et al. // *Journal of Inorganic Biochemistry* – 2013. – Vol. 127. – P. 175-181;
3. Paulo A. New Alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta* / A. Paulo, E.T. Gomes, P.J. Houghton // *J. Nat. Prod.* – 1995. – Vol. 58. – P. 1485-1491;
4. Ahaidar A. Total syntheses of variolin B and deoxyvariolin B / A. Ahaidar, D. Fernández, G. Danelón, C. Cuevas, et al. // *J. Org. Chem.* – 2003. Vol. 68. – P. 10020-10029;
5. Choshi T. Total synthesis of grossularines-1 and -2 / T. Choshi, S. Yamada, E. Sugino, T. Kuwada, et al. // *J. Org. Chem.* – 1995. – Vol. 60. – P. 5899-5904;
6. Simone M. Variolin B and its derivative deoxy-variolin B: New marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity / M. Simone, E. Erba, G. Damia, F. Vikhanskaya, et al. // *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990-2005. – Vol. 41. – P. 2366-2377;
7. Prudhomme M. Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents / M. Prudhomme // *Eur. J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 38. – P. 123-140;
8. Zhang H.C. 3-(7-Azaindoly)-4-arylmaleimides as potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 / H. C. Zhang, H. Ye, B. R. Conway, C. K. Derian, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2004. – Vol. 14. – P. 3245-3250;
9. Grant E.R. Protection against glutamate toxicity through inhibition of the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in neuronally differentiated P19 cells / E. R. Grant, M.A. Errico, S.L. Emanuel, D. Benjamin, et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62. – P. 283-296;
10. Azaindole Derivatives as Inhibitors of p38 Kinase // Patent WO2004032874. 2003. / S. Dugar;
11. Showell G.A. Binding of 2,4-disubstituted morpholines at human D4 dopamine receptors / G.A. Showell, F. Emms, R. Marwood, D. O'Connor, et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 1998. – Vol. 6. – P. 1-8;
12. Kulagowski J.J. 3-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)-methyl)-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine: An antagonist with high affinity and selectivity for the human dopamine D4 receptor / J.J.

- Kulagowski, H.B. Broughton, N. R. Curtis, I. M. Mawer, et al. // *J. Med. Chem.*– 1996. – Vol.39. – P. 1941-1942;
13. Fonquerna S. Synthesis and structure-activity relationships of piperidinylpyrrolopyridine derivatives as potent and selective H1 antagonists / S. Fonquerna, M. Miralpeix, L. Pagès, C. Puig, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* –2005. –Vol. 15. –P. 1165-1167;
 14. Gong Y. Solid-phase parallel synthesis of azarene pyrrolidinones as factor Xa inhibitors / Y. Gong, M. Becker, Y.M. Choi-Sledeski, R.S. Davis, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2000. – Vol. 10.– P. 1033-1036;
 15. Sanderson P.E.J. Azaindoles: Moderately basic P1 groups for enhancing the selectivity of thrombin inhibitors / P.E.J. Sanderson, M.G. Stanton, B.D. Dorsey, T. Lyle, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – Vol. 13. – P.795-798;
 16. Horton D.A. The Combinatorial Synthesis of Bicyclic Privileged Structures or Privileged Substructures / D.A. Horton, G.T. Bourne, M.L. Smythe // *Chem. Rev.*– 2003. – Vol.103. – P. 893-930;
 17. De Sá Alves F.R. From nature to drug discovery: The indole scaffold as a “privileged structure” / F. R. De Sá Alves, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2009. – Vol.9. – P. 782-793;
 18. Sharma V. Biological importance of the indole nucleus in recent years: A comprehensive review / V. Sharma, P. Kumar, D. Pathak // *J. Heterocycl. Chem.* –2010. – Vol. 47. – P. 491-502;
 19. Perry N.B. Alkaloids from the antarctic sponge *Kirkpatrickia variolosa*: Part 1: Variolin b, a new antitumour and antiviral compound / N.B. Perry, L. Ettouati, M. Litaudon, J. W. Blunt, et al. // *Tetrahedron*– 1994. – Vol. 50. – P.3987-3992;
 20. Welsch M.E. Privileged scaffolds for library design and drug discovery / M.E. Welsch, S.A. Snyder, B.R. Stockwell // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2010.– Vol.14. – P. 347-361;
 21. Walker S.R. Variolins and related alkaloids. / S.R. Walker, E.J. Carter, B.C. Huff, J. C. Morris // *Chem. Rev.* – 2009. – Vol.109. – P. 3080-3098;
 22. Li J.J. Indoles, oxindoles, and azaindoles. In *Heterocyclic Chemistry in Drug Discovery* / J.J. Li // John Wiley and Sons Inc.: Hoboken. –2013. –P. 54-118;
 23. Ila H. Metalated Indoles, Indazoles, Benzimidazoles, and Azaindoles and Their Synthetic Applications / H. Ila, J. Markiewicz, V. Malakhov, P. Knochel // *Synthesis.* – 2013. – Vol. 45. – P. 2343-2371;
 24. Mérour J.Y. Recent advances in the synthesis and properties of 4-, 5-, 6- or 7-azaindoles / J.Y. Mérour, S. Routier, F. Suzenet, B. Joseph // *Tetrahedron*– 2013. – Vol. 69. – P. 4767-4834;

25. Ölgen S. Recent development of new substituted indole and azaindole derivatives as anti-HIV agents / S.Ölgen // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13. – P.1700-17084;
26. Boulahjar R. Novel tetrahydropyrido[1,2-a]isoindolone derivatives (valmerins): Potent cyclin-dependent kinase/glycogen synthase kinase 3 inhibitors with antiproliferative activities and antitumor effects in human tumor xenografts / R. Boulahjar , A. Ouach, C. Matteo, S. Bourg, et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol.55. – P. 9589-9606;
27. Dehbi O. Synthesis and optimization of an original V-shaped collection of 4,7-disubstituted pyrido[3,2-*d*]pyrimidines as CDK5 and DYRK1A inhibitors / O. Dehbi, A. Tikad, S. Bourg, P. Bonnet, et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 80. – P. 352-363;
28. Kassis P. Synthesis and biological evaluation of new 3-(6-hydroxyindol-2-yl)-5-(phenyl) pyridine or pyrazine V-Shaped molecules as kinase inhibitors and cytotoxic agents / P. Kassis, J. Brzeszcz, V. Bénéteau, O. Lozach, et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 46. – P. 5416-5434;
29. Neagoie C. Synthesis of chromeno[3,4-*b*]indoles as Lamellarin Danalogues: A novel DYRK1A inhibitor class / C. Neagoie, E. Vedrenne, F. Buron, J. Y. Mérour, et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2012. – Vol.49. – P. 379-396;
30. Lefoix M. Novel 5-azaindolocarbazoles as cytotoxic agents and Chk1 inhibitors / M. Lefoix, G. Coudert, S. Routier, B. Pfeiffer, et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – Vol.16. – P. 5303–5321;
31. Saurat T. Design, synthesis, and biological activity of pyridopyrimidine scaffolds as novel PI3K/mTOR dual inhibitors / T. Saurat, F. Buron, N. Rodrigues, M.L. de Tauzia, et al. // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57. – P. 613-631;
32. Liao J.J. Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors / J.J. Liao // *J. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 50. – P. 409-424;
33. Youl E. Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway / E. Youl, G. Bardy, R. Magous, G. Cros, et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 161. – P. 799-814;
34. Gruson D. Urocortin-induced cardiomyocytes hypertrophy is associated with regulation of the GSK-3 β pathway / D. Gruson, A. Ginion., N. Decroly, P. Lause, et al. // *Heart Vessels* – 2012. – Vol. 27. – P. 202-207;
35. Clark J.D. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases / J.D. Clark, M.E. Flanagan, J. B. J. Telliez // *Med. Chem.* – 2014. – Vol.57. – P. 5023-5038;

36. Guo M. F. The inhibition of Rho kinase blocks cell migration and accumulation possibly by challenging inflammatory cytokines and chemokines on astrocytes / M. F. Guo, J. Meng, Y.H. Li, J. Z. Yu, et al. // *J. Neurol. Sci.* – 2014. – Vol. 343. – P. 69-75;
37. Castanares-Zapatero D. Connection between cardiac vascular permeability, myocardial edema, and inflammation during sepsis: Role of the α 1AMP-activated protein kinase isoform / D. Castanares-Zapatero, C. Bouleti, C. Sommereyns, B Gerber, et al. // *Crit. Care Med.* – 2013. – Vol.41. – P.411-422;
38. Demeulder B. Differential regulation of eEF2 and p70S6K by AMPK α 2 in heart / B. Demeulder, E. Zarrinpashneh, A. Ginion, B. Viollet, et al. // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – Vol. 1832. – P. 780-790;
39. Erickson J.R. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. / J. R. Erickson // *Front. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1-5;
40. Huynh T.N. Requirement of Mammalian target of rapamycin complex 1 downstream effectors in cued fear memory reconsolidation and its persistence / T.N. Huynh, E. Santini, E. Klann // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol.34. – P. 9034-9039;
41. Walker C.L. PTEN/PI3K and MAPK signaling in protection and pathology following CNS injuries / C.L. Walker, N.K. Liu, X. M. Xu // *Front. Biol.* – 2013. – Vol. 8. – P. 421-433;
42. De Cárcer G. Inhibiting Cell Kinase in Cancer Therapy / G. De Cárcer, I. Perez de Castro, M. Malumbres // *Front. Med Chem.* – 2012. – Vol. 6. – P. 154-188;
43. Zámečníkova A. Novel approaches to the development of tyrosine kinase inhibitors and their role in the fight against cancer / A. Zámečníkova // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2014. – Vol.9. – P. 77-92;
44. Hebert-Chatelain E. Src kinases are important regulators of mitochondrial functions / E. H Hebert-Chatelain // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45. – P. 90-98;
45. Pitts T.M. Targeting nuclear kinases in cancer: Development of cell cycle kinase inhibitors / T. M. Pitts, S. L. Davis, S.G. Eckhardt, E.L. Bradshaw-Pierce // *Pharmacol. Ther.* – 2014. – Vol. 142. – P. 258-269;
46. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer / R. Roskoski // *Pharmacol. Res.* – 2014. – Vol. 79. – P. 34-74;
47. Rupani A. Primary anaplastic large cell lymphoma of central nervous system-A case report / A. Rupani, C. Modi, S. Desai, J. Rege // *J. Postgrad. Med.* – 2005. – Vol. 51. – P. 326-327;
48. Gummadi V.R. Discovery of 7-azaindole based anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors: Wild type and mutant (L1196M) active compounds with unique binding mode / V. R. Gummadi, S. Rajagopalan, C.Y. Looi, M. Paydar, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol.23. – P. 4911-4918;

49. Pollard J.R. Discovery and development of aurora kinase inhibitors as anticancer agents / J.R. Pollard, M.J. Mortimore // *Med. Chem.*– 2009. – Vol. 52. – P. 2629-2651;
50. Bouloc N. Structure-based design of imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives as selective inhibitors of Aurora-A kinase in cells / N. Bouloc, J.M. Large, M. Kosmopoulou, C. Sun, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*– 2010.– Vol.20. – P. 5988-5993;
51. Bavetsias V. Aurora isoform selectivity: Design and synthesis of imidazo[4,5-*b*]pyridine derivatives as highly selective inhibitors of Aurora-A kinase in cells // V. Bavetsias, A. Faisal, S. Crumpler, N. Brown, et al. // *J. Med. Chem.*– 2013. – Vol. 56. – P. 9122-9135;
52. Adams N.D. Discovery of GSK1070916, a potent and selective inhibitor of Aurora B/C kinase / N. D. Adams, J.L. Adams, J.L. Burgess, A. M. Chaudhari, et al. // *J. Med. Chem.*– 2010. – Vol. 53. – P. 3973-4001;
53. Medina J.R. Discovery of a new series of Aurora inhibitors through truncation of GSK1070916 / J.R. Medina, S.W. Grant, J.M. Axten, W.H. Miller, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – P. 2552-2555;
54. Seefeld M. A., Preparation of Pyrrolo[2,3-*b*]pyridines as Inhibitors of Akt Activity / M.A. Seefeld, T. Hamajima, D.K. Jung, H. Nakamura, et al. // Patent WO 2007076423. – 2007 – № 5;
55. Hardwicke M.A. GSK1070916, a potent Aurora B/C kinase inhibitor with broad antitumor activity in tissue culture cells and human tumor xenograft models / M.A. Hardwicke, C.A. Oleykowski, R. Plant, J. Wang, et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2009.– Vol. 8. – P.1808-1817;
56. Lan P. 3D-QSAR and molecular docking studies of azaindole derivatives as Aurora B kinase inhibitors / P. Lan, W. N. Chen, P.H. Sun, W.M. Chen // *J. Mol. Model.* – 2011. – Vol.17. – P. 1191-1205;
57. Harrington P.E. The optimization of aminooxadiazoles as orally active inhibitors of Cdc7 / P.E. Harrington, M.P. Bourbeau, C. Fotsch, M. Frohn, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23. – P. 6396-6400;
58. Bryan M.C. N-substituted azaindoles as potent inhibitors of Cdc7 kinase / M.C. Bryan, J.R. Falsey, M. Frohn, A. Reichelt, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23. – P. 2056-2060;
59. Tong Y. Azaindole-Based Inhibitors of Cdc7 Kinase: Impact of the Pre-DFG Residue, Val 195 / Y. Tong, K. D. Stewart, A.S. Florjancic, J. E. Harlan, et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 4. – P. 211-215;
60. Woods K.W. Aminopyrimidinone Cdc7 Kinase Inhibitors / K.W. Woods, C. Lai, J.M. Miyashiro, Y. Tong, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012.– Vol. 22. – P. 1940-1943;

61. Ermoli A. Cell division cycle 7 kinase inhibitors: 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridines, synthesis and structure-activity relationships / A. Ermoli, A. Bargiotti, M.G. Brasca, A. Ciavolella, et al. // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol.52. – P. 4380-4390;
62. Koolman H. Syntheses of novel 2,3-diaryl-substituted 5-cyano-4-azaindoles exhibiting c-Met inhibition activity / H.Koolman, T. Heinrich, H. Böttcher, W. Rautenberg, W., et al. // *Bioorg. Med.Chem. Lett.* – 2009.– Vol.19. – P. 1879-1882;
63. Porter J. Discovery of 4-azaindoles as novel inhibitors of c-Met kinase / J. Porter, S. Lumb, R.J. Franklin, J.M. Gascon-Simorte, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Vol. 19. – P. 2780-2784;
64. Cai Z. W. Discovery of orally active pyrrolopyridine- and aminopyridine-based Met kinase inhibitors / Z. W. Cai, D. Wei, G.M. Schroeder, L.A. Cornelius, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol.18. – P. 3224-3229;
65. Williams D.K. Design, synthesis and structure-Activity relationships of novel biarylamine-based Met kinase inhibitors / D.K. Williams, X. T.Chen, C. Tarby, R. Kaltenbach, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – P. 2998-3002;
66. Kim K.S. Discovery of pyrrolopyridine-pyridone based inhibitors of Met kinase: Synthesis, X-ray crystallographic analysis, and biological activities / K.S. Kim, L. Zhang, R. Schmidt, Z.W. Cai, et al. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51. – P. 5330-5341;
67. Becker W. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity / W. Becker, H.G. Joost // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 62. – P. 1-17;
68. Becker W. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A / W. Becker, W. Sippl // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 246-256;
69. Aranda S. DYRK family of protein kinases: Evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles / S. Aranda, A. Laguna, S. de la Luna // *FASEB J.* – 2011. – Vol. 25. – P. 449-462;
70. Hämmerle B. The MNB/DYRK1A protein kinase: Neurobiological functions and Down syndrome implications / B. Hämmerle, C. Elizalde, J. Galceran, W. Becker, et al. // *J. Neural Transm.* – 2003. – Vol. 67. – P.129-137;
71. Park J. Function and regulation of Dyrk1A: Towards understanding Down syndrome / J. Park, W. J.Song, K.C. Chung // *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*–2009. – Vol. 66. – P. 3235-3240;
72. Tejedor F.J. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development / F.J. Tejedor, B. Hämmerle // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 223-235;

73. Martí E. Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system / E. Martí, X. Altafaj, M. Dierssen, S. de la Luna, et al. // *Brain Res.* – 2003. – Vol. 964. – P. 250-263;
74. Ferrer I. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models / I. Ferrer, M. Barrachina, B. Puig, M. Martínez de Lagrán, et al. // *Neurobiol. Dis.* – 2005. – Vol. 20. – P. 392-400;
75. Wegiel J. The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases / J. Wegiel, C. X. Gong // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 236-245;
76. Ionescu A. DYRK1A kinase inhibitors with emphasis on cancer / A. Ionescu, F. Dufrasne, M. Gelbcke, I. Jabin, et al. // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 12. – P. 1315-1329;
77. Gourdain S. Development of DANDYs, new 3,5-diaryl-7-azaindoles demonstrating potent DYRK1A kinase inhibitory activity / S. Gourdain, J. Dairou, C. Denhez, L.C. Bui, et al. // *J. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 56. – P. 9569-9585;
78. Pin F. Synthesis and biological evaluation of 2,3-bis(het)aryl-4-azaindole derivatives as protein kinase inhibitors / F. Pin, F. Buron, F. Saab, L. Colliandre, et al. // *Med. Chem. Comm.* – 2011. – Vol. 2. – P. 899-903;
79. Heinrich T. Fragment-based discovery of new highly substituted 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]- and 3*H*-imidazo[4,5-*b*]-pyridines as focal adhesion kinase inhibitors / T. Heinrich, J. Seenisamy, L. Emmanuvel, S.S. Kulkarni, et al. // *J. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 56. – P. 1160-1170;
80. Liddle J. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent and selective IKK2 inhibitors / J. Liddle, P. Bamborough, M.D. Barker, S. Campos, S. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Vol. 19. – P. 2504-2508;
81. Liddle J. 4-Phenyl-7-azaindoles as potent, selective and bioavailable IKK2 inhibitors demonstrating good in vivo efficacy / J. Lidd, P. Bamborough, M.D. Barker, S. Campos, S. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – Vol. 22. – P. 5222-5226;
82. James C. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera / C. James, V. Ugo, J.P. le Couédic, J. Staerk, et al. // *Nature* – 2005. – Vol. 434. – P. 1144-1148;
83. Levine R.L. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis / R. L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools, B.L. Ebert, et al. // *Cancer Cell* – 2005. – Vol. 7. – P. 387-397;
84. Kralovics R. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders / R. Kralovics, F. Passamonti, A. S. Buser, S.S. Teo, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 1779-1790;

85. Baxter E.J. Cancer Genome Project Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders / E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, et al. //Lancet – 2005. – Vol. 365. – P. 1054-1061;
86. Zhao R. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera / R. Zhao, S. Xing, Z. Li, X. Fu, et al. //J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – P. 22788-22792;
87. Tono C. JAK2 Val617Phe activating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia / C. Tono, G. Xu, T. Toki, Y. Takahashi, et al. // Leukemia – 2005. – Vol.19. – P. 1843-1844;
88. Wang T. Discovery of 3,4-ring fused 7-azaindoles and deazapurines as potent JAK2 inhibitors / T. Wang, M.W. Ledebor, J.P. Duffy, F.G. Salituro, F.G, et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2010. – Vol. 20. – P. 153-156;
89. Wang T. Janus kinase 2 inhibitors. Synthesis and characterization of a novel polycyclic azaindole / T. Wang, J. Wang, J.P.Duffy, S. Halas, et al. // J. Med. Chem. – 2009. – Vol. 52. – P. 7938-7941;
90. Fleischmann R. Novel small-molecular therapeutics for rheumatoid arthritis/R.Fleischmann // Curr. Opin. Rheumatol. – 2012. – Vol. 24. – P. 335-341;
91. Azaindoles Useful as Inhibitors of Janus Kinases //Patent WO2007084557. №26. 2007. / L. Farmer, G. Martinez-Botella, A. Pierce, F. Salituro, et al.;
92. Zhang C. Design and pharmacology of a highly specific dual FMS and KIT kinase inhibitor / C. Zhang, P. N.Ibrahim, J. Zhang, E.A. Burton, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2013. – Vol. 110. – P. 5689-5694;
93. Tunduguru R. Signaling of the p21-activated kinase (PAK1) coordinates insulin-stimulated actin remodeling and glucose uptake in skeletal muscle cells / R. Tunduguru, T.T.Chiu, L. Ramalingam, J.S. Elmendorf, et al. // Biochem. Pharmacol. – 2014;
94. Ji X. Inhibition of p21-activated kinase 1 by IPA-3 attenuates secondary injury after traumatic brain injury in mice / X. Ji, W. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, et al. // Brain Res. – 2014. – Vol. 1585. – P. 13-22;
95. Prudnikova T.Y. Molecular Pathways: Targeting the Kinase Effectors of RHO-Family GTPases / T.Y. Prudnikova, S.J. Rawat, J. Chernoff //Clin. Cancer Res. – 2014;
96. McCoull W. Identification and optimisation of 7-azaindole PAK1 inhibitors with improved potency and kinase selectivity / W. McCoull, E. J.Hennessy, K. Blades, M.R. Box, et al. // MedChemComm – 2014. – Vol.5. – P.1533-1539;
97. Young P.R. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site / P. R. Young, M.M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272. – P. 12116-12121;

98. Trejo A. Design and synthesis of 4-azaindoles as inhibitors of p38 MAP kinase / A. Trejo, H. Arzeno, M. Browner, S. Chanda, et al. // *J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 46. – P. 4702-4713;
99. Mavunkel B.J. Piperidine-based heterocyclic oxalyl amides as potent p38 α MAP kinase inhibitors / B. J. Mavunkel, J.J. Perumattam, X. Tan, G. Luedtke, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – P. 1059-1062;
100. Blanco-Aparicio C. Pim kinases in cancer: Diagnostic, prognostic and treatment opportunities / C. Blanco-Aparicio, A. Carnero // *Biochem. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 85. – P. 629-643;
101. Nakano H. Rational evolution of a novel type of potent and selective proviral integration site in Moloney murine leukemia virus kinase 1 (PIM1) inhibitor from a screening-hit compound / H. Nakano, N. Saito, L. Parker, Y. Tada, et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – P. 5151-5164;
102. Brader S. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis / S. Brader, S.A. Eccles // *Tumori* – 2004. – Vol. 90. – P. 2–8;
103. Samuels Y. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers / Y. Samuels, Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, et al. // *Science* – 2004. – Vol. 304. – P. 554;
104. Wymann M.P. Phosphoinositide 3-kinase in disease: Timing, location, and scaffolding / M.P. Wymann, R. Marone // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 17. – P. 141-149;
105. Parsons D.W. Colorectal cancer: Mutations in a signalling pathway / D.W. Parsons, T. L. Wang, Y. Samuels, A. Bardelli, et al. // *Nature* – 2005. – Vol. 436. – P. 792;
106. Kang S. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic / S. Kang, A. G. Bader, P.K. Vogt // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102. – P. 802-807;
107. Fan Q.W. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma / Q.W. Fan, Z.A. Knight, D.D. Goldenberg, W. Yu, et al. // *Cancer Cell* – 2006. – Vol. 9. – P. 341-349;
108. Jung K.H. HS-116, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor induces apoptosis and suppresses angiogenesis of hepatocellular carcinoma through inhibition of the PI3K/AKT/Mtor pathway / K. H. Jung, M. Choi, S. Hong, H. Lee, et al. // *Cancer Lett.* – 2012. – Vol. 316. – P. 187-195;
109. Hong S. Discovery of new azaindole-based PI3K α inhibitors: Apoptotic and antiangiogenic effect on cancer cells / S. Hong, S. Lee, B. Kim, H. Lee, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – P. 7212-7215;
110. Tang J. Knowledge-based design of 7-azaindoles as selective B-Raf inhibitors / J. Tang, T. Hamajima, M. Nakano, H. Sato, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18. – P. 4610-4614;

111. Chowdhury S. Discovery and optimization of indoles and 7-azaindoles as Rho-kinase (ROCK) inhibitors (part-I) / S. Chowdhury, E.H. Sessions, J. Pocas, W. Grant, W., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. – P. 7107-7112;
112. Sessions E.H. Discovery and optimization of indole and 7-azaindoles as Rho kinase (ROCK) inhibitors (part-II) / E.H. Sessions, S. Chowdhury, Y. Yin, J. Pocas, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. – P. 7113-7118;
113. Schirok H. Improved Synthesis of the Selective Rho-Kinase Inhibitor 6-Chloro-*N*4-(3,5-difluoro-4-[(3-methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-4-yl)oxy]phenyl)pyrimidin-2,4-diamine / H. Schirok, H. Paulsen, W. Kroh, G. Chen, et al. // *Org. Process Res. Dev.* – 2010. – Vol. 14. – P. 168-173;
114. Schirok H. Design and synthesis of potent and selective azaindole-based Rho kinase (ROCK) inhibitors / H. Schirok, R. Kast, S. Figueroa-Pérez, S. Bennabi, et al. // *ChemMedChem.* – 2008. – Vol. 3. – P. 1893-1904;
115. Kast R. Cardiovascular effects of a novel potent and highly selective azaindole-based inhibitor of Rho-kinase / R. Kast, H. Schirok, S. Figueroa-Pérez, J. Mittendorf, et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 152. – P. 1070-1080;
116. Dahal B.K. Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension / B.K. Dahal, D. Kosanovic, K. Pamarthi, A. Sydykov, et al. // *Eur. Respir. J.* – 2010. – Vol. 36. – P. 808-818;
117. Zoncu R. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing / R. Zoncu, A. Efeyan, M. Sabatini // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 21-35;
118. Tsou H. R. 4-Substituted-7-azaindoles bearing a ureidobenzofuranone moiety as potent and selective, ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin (mTOR) / H. R. Tsou, G. MacEwan, G. Birnberg, N. Zhang, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – P. 2259–2263;
119. Tsou H. R. 4-Substituted-7-azaindoles bearing a ureidobenzofuranone moiety as potent and selective, ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin (mTOR) / H. R. Tsou, G. MacEwan, G. Birnberg, N. Zhang, et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20. – P. 2321-2325;
120. Hong S. Design, synthesis, and evaluation of 3,5-disubstituted 7-azaindoles as Trk inhibitors with anticancer and antiangiogenic activities / S. Hong, J. Kim, J.H. Seo, K.H. Jung, et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – P.5337-5349;
121. Jiang W. G. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies / W. G. Jiang, T.A. Martin, C. Parr, G. Davies, et al. // *Crit. Rev. Haematologica*– 2005. – Vol.53. – P. 35-69;

122. Ermoli A. Cell Division Cycle 7 Kinase Inhibitors: 1*H*-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridines, Synthesis and Structure-Activity Relationships / A. Ermoli, A. Bargiotti, M. G. Brasca, A. Ciavolella, et al. // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52. – P. 4380-4390;
123. Manning G. The protein kinase complement of the human genome / G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, et al. // *Science* – 2002. – Vol. 298. – P. 1912-1934;
124. Jeffrey P.D. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex / P.D. Jeffrey, A.A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, et al. // *Nature* – 1995. – Vol. 376. – P. 313-320;
125. Southall N.T. Kinase patent space visualization using chemical replacements / N.T. Southall, Ajay // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49. – P. 2103-2109;
126. Ward R.A. Kinase Drug Discovery / R. A. Ward, F.W. Goldberg // RSC: Cambridge. – 2011;
127. Zhang J. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors / J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray // *Nat. Rev. Cancer* – 2009. – Vol. 9. – P. 28-39;
128. Bollag G. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer / G. Bollag, J. Tsai, J. Zhang, C. Zhang, et al. // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11. – P. 873-886;
129. Donald A. Rapid evolution of 6-phenylpurine inhibitors of protein kinase B through structure-based design / A. Donald, T. McHardy, M. G. Rowlands, L. Hunter, et al. // *J. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 50. – P. 2289-2292;
130. Echalié A. Meriolins (3-(pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): Synthesis, kinase inhibitory activity, cellular effects, and structure of a CDK2/cyclin A/meriolin complex / A. Echalié, K. Bettayeb, Y. Ferandin, O. Lozach, et al. // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51. – P. 737-751;
131. Routier S. First synthesis of symmetrical and non-symmetrical aza indolocarbazoles derivatives / S. Routier, G. Coudert, J. Mérour, D.H. Caignard // *Tetrahedron Lett.* – 2002. – Vol. 43. – P. 2561-2564;
132. Routier S. Synthesis and biological evaluation of 7-azaindolocarbazoles / S. Routier, N. Ayerbe, J. Y. Mérour, G. Coudert, et al. // *Tetrahedron* – 2002. – Vol. 58. – P. 6621-6630;
133. Messaoudi S. Synthesis and biological activities of 7-aza rebeccamycin analogues bearing the sugar moiety on the nitrogen of the pyridine ring / S. Messaoudi, F. Anizon, P. Peixoto, M. H. David-Cordonnier, et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 14. – P. 7551-7562;
134. Ganser C. Novel 3-Azaindolyl-4-arylmaleimides exhibiting potent antiangiogenic efficacy, protein kinase inhibition, and antiproliferative activity / C. Ganser, E. Lauermann, A. Maderer, T. Stauder, et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – P. 9531-9540;

135. Faul M.M. A new one step synthesis of maleimides by condensation of glyoxylate esters with acetamides / M. M. Faul, L. L. Winneroski, C.A. Krumrich // *Tetrahedron Lett.* – 1999. – Vol. 40. – P. 1109-1112;
136. O'Neill D.J. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7-azaindoly-heteroaryl-maleimides as potent and selective glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitors / D. J. O'Neill, L. Shen, C. Prouty, B. R. Conway, et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2004. - Vol. 12. – P. 3167-3185;
137. Maderer A. Moguntinones-New Selective Inhibitors for the Treatment of Human Colorectal Cancer / A. Maderer, S. Plutizki, J.-P. Kramb, K. Göpfert, et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2014. – Vol. 13. – P. 1399-1409;
138. Ye Q. Synthesis and biological evaluation of novel 4-azaindoly-indolyl-maleimides as glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitors / Q. Ye, G. Xu, D. Lv, Z. Cheng, et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17. – P. 4302-4312;
139. Kuo G.H. Synthesis and discovery of macrocyclic polyoxygenated bis-7-azaindoly-maleimides as a novel series of potent and highly selective glycogen synthase kinase-3 β inhibitors / G.H. Kuo, C.Prouty, A. DeAngelis, L. Shen, et al. // *J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 46. – P. 4021-4031;
140. Wang Z.H. Synthesis and CDK2 kinase inhibitory activity of 7/7'-azaindirubin derivatives / Z. H. Wang, Y. Dong, T. Wang, M.H. Shang, et al. // *Chin. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 21. P. 297-300;
141. Villaseñor A.G. Structural insights for design of potent spleen tyrosine kinase inhibitors from crystallographic analysis of three inhibitor complexes / A. G. Villaseñor, R. Kondru, H. Ho, S. Wang, et al. // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2009. – Vol. 73. – P. 466-470;
142. Cox P.J. Preparation of Azaindoles as Protein Kinase Inhibitors / P.J. Cox, T.N. Majid, J.Y.Q. Lai, A.D. Morley, et al. // Patent No. WO 2001047922. – 2001 – № 5;
143. Nemecek C. Design of potent IGF1-R inhibitors related to bis-azaindoles / C. Nemecek, W. A. Metz, S. Wentzler, F. X. Ding, et al. // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2010. – Vol. 76. – P. 100-106;
144. Gu X.H. Syntheses and biological activities of bis(3-indolyl)thiazoles, analogues of marine bis(indole)alkaloid nortopsentins / X.H. Gu, X.Z. Wan, B. Jiang // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1999. – Vol. 9. – P. 569-572;
145. Jiang B. Syntheses and cytotoxicity evaluation of bis(indolyl)thiazole, bis(indolyl)pyrazinone and bis(indolyl)pyrazine: Analogues of cytotoxic marine bis(indole)alkaloid / B. Jiang, X. H. Gu // *Bioorg. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 8. – P. 363-371;

146. Diana P. Synthesis and antitumor activity of 3-(2-phenyl-1,3-thiazol-4-yl)-1*H*-indoles and 3-(2-phenyl-1,3-thiazol-4-yl)-1*H*-7-azaindoles / P. Diana, A. Carbone, P. Barraja, A. Montalbano, et al. // ChemMedChem. – 2011. – Vol. 6. – P. 1300-1309.