

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

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки, специальности)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль)/специализация)

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)**

на тему ADMET-характеристики производных 5-цианопиримидина

Студент

Ю.П. Курбакова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

канд. хим. наук, О.Б. Григорьева

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

Тольятти 2021

Аннотация

Выпускная квалификационная работа изложена на 49 страницах, содержит 15 рисунков, 18 таблиц, 8 схем, использовано 28 литературных источников, в том числе 27 зарубежных.

Объектами настоящего исследования являются производные 5-цианопиримидина. 5-цианопиримидины представляют интерес как вещества, обладающие широким спектром биологической активности.

В литературном обзоре рассмотрено понятие об ADMET-характеристиках и способы их измерения. Особое внимание было уделено оценке клеточной проницаемости на модели CaCO-2 как процессу адсорбции лекарственных препаратов.

В экспериментальной части описаны методики проведенных экспериментальных и расчетных исследований.

В заключение мы подчеркнули, что полученные соединения, согласно результатам биохимических анализов, обладают высокой проницаемостью и могут быть потенциальными лекарственными препаратами.

Abstract

The title of the graduation work is «ADMET-characteristics of 5-cyanopyrimidine derivatives».

The aim of this work is to study the concept of ADMET characteristics and to evaluate the cell permeability, as an adsorption process, of PI3k kinase inhibitors based on the 5-cyanopyrimidine scaffold.

We studied a lot of information to find the best method for determining cell permeability on the CaCO-2 model. Then we performed the experimental part of the work and analyzed the substances obtained.

The graduation project consists of an introduction, 3 chapters, a conclusion, an explanatory note on 49 pages, including 15 figures, 18 table, 8 schemes, the list of 28 references including 27 foreign sources.

The first part is devoted to the study of ADMET characteristics and how to measure them. Special attention was paid to the assessment of cell permeability as an adsorption process. This section also provides information about approved and experimental kinase inhibitor medication.

The second part provides a detailed description of the analysis of the cell permeability of the synthesized compounds.

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

In conclusion, we emphasized that the obtained compounds, according to the results of biochemical analyses, can be potential medication.

Содержание

1	Литературный обзор	7
1.1	Способы измерения ADMET характеристик.....	7
1.2	Ингибиторы P13K	15
2	Результаты и обсуждения.....	33
3	Экспериментальная часть.....	41
3.1	Реагенты и оборудование	41
3.2	Объекты исследования.....	41
3.3	Биологические испытания	42
3.4	Методика эксперимента.....	43
3.5	Определение эффективной проницаемости.....	44
	Заключение	45
	Список используемой литературы	46

Принятые сокращения

В настоящей работе используют следующие сокращения и термины:

1,2-DCE	1,2-дихлорэтилен;
ACN	ацетонитрил;
CaCO-2	клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека;
CYP	цитохром P450-зависимая монооксигеназа;
DCM	дихлорметан;
DIPEA	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин;
DMF	<i>N,N</i> -диметилформамид;
EC ₅₀	полумаксимальная эффективная концентрация;
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид;
FDA	управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов;
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования;
MAPK	митоген-активированная протеинкиназа;
<i>m</i> -CPBA	<i>мета</i> -хлорпербензойная кислота;
MDCK	клетки собачьей почки Мадина-Дарби;
NMP	<i>N</i> -метилпирролидон
PI3k	фосфатидилинозил-3-киназа
QSAR	количественное соотношение структура-свойство;
THF	тетрагидрофуран;
ВЭЖХ/МС	высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия;
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер;
НАДФН	никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
УДФГК	уридиндифосфоглюкуроновая кислота.

Введение

Открытие и разработка лекарств являются длительными и дорогостоящими процессами, которые сопровождаются высоким риском неудачи. Как правило, разработка лекарственного средства от начальных этапов идентификации цели до его вывода на рынок занимает от 15 до 20 лет, а стоимость вывода лекарства на рынок оценивается почти в 1,2 миллиарда долларов. По оценкам FDA, в конечном итоге на рынок попадают только 8% соединений, которые входят в I фазу клинических исследований [1]. Однако, с каждым годом инвестиции в фармацевтические исследования увеличиваются, а количество одобренных лекарств остается неизменным или даже уменьшается. Важную роль для решения этой проблемы играет повышение качества лекарственного средства, включая их эффективность, фармакокинетику и безопасность.

Большая часть убыли биологически активных веществ связана с плохими характеристиками ADMET, т.е. адсорбцией, распределением, метаболизмом, экскрецией и токсичностью. Поскольку по мере разработки лекарств затраты только растут, эта проблема потребовала перехода к стратегии «ранний сбой – дешевый сбой», которая позволяет изучать качественные характеристики уже на ранних этапах. Соединения с «нецелевой» активностью, с воздействием на различные мишени, не связанные с терапевтической мишенью, несут ответственность за нежелательную лекарственную реакцию и могут серьезно ограничить использование лекарственного средства и помешать его переходу в фазы клинических испытаний [1].

В представленной работе рассматриваются результаты исследований по оценке адсорбции, как одного из параметров характеристик ADMET, потенциальных ингибиторов PI3k киназ на основе 5-цианопиримидинового скаффолда.

1 Литературный обзор

1.1 Способы измерения ADMET характеристик

ADMET свойства соединений, в зависимости от способа их измерения, можно разделить на три класса [1]:

- 1) *in vitro* включают в себя растворимость в воде, логарифм коэффициента распределения октанол-вода $\left(\frac{\log P}{\log D}\right)$, pK_a , проницаемость клеток CaCO-2/MDCK, hERG, ингибирование различных CYP, связывание с белками плазмы (PPB) и стабильность в микросомах печени (человека HLM или мышей MLM);
- 2) *in vivo* измеряются на животных моделях и включают различные фармакокинетические свойства, такие как пероральная биодоступность (F), кишечная абсорбция человека (HIA), экскреция, площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC), общий клиренс организма (CL), объем распределения (V_{ss}) и период полувыведения ($T_{1/2}$);
- 3) *in silico*, которые в свою очередь также подразделяются на два вида:
 - а) построение прогнозируемых моделей QSAR с использованием современных статистических алгоритмов наряду с большим количеством молекулярных дескрипторов;
 - б) построение простых эмпирических правил ADMET для предоставления общего руководства для медицинских химиков по оптимизации свойств ведущего соединения. В этом случае в исследовании используются несколько интерпретируемых молекулярных дескрипторов, и определяется качественная взаимосвязь между дескриптором и свойством конечной точки.

Благодаря К. Липинскому, разработавшему «правило пяти», все больше исследователей предполагают, что плохие свойства ADMET проявляются соединения большой молекулярной массы и с низкой липофильностью [1]. В

доказательство этой теории, Gleeson [2] провел анализы ряда ключевых характеристик ADMET таких как растворимость, проницаемость, биодоступность, объем распределения и другие. Из его анализов видно, что почти все параметры ADMET ухудшаются с увеличением либо молекулярной массы соединения, либо $\log P$, или же ими обоими, причем состояние ионизации оказывает как положительное, так и отрицательное влияние, в зависимости от изучаемого параметра.

Это доказательство еще раз подчеркивает необходимость разработки более низкомолекулярных соединений с низким значением $\log P$ для получения улучшенных ADMET характеристик препаратов.

1.1.1 Адсорбция

Желудочно-кишечное всасывание лекарственных веществ рассматривается как сложный механизм, обусловленный рядом факторов, которые разделены в основном на физиологические эффекты (среда желудка, метаболизм стенок кишечника и др.), физико-химические эффекты (pK_a , растворимость, стабильность, липофильность) и рецептурные эффекты (размер и форма частиц). Точное описание поведения желудка (например, перистальтические движения, опорожнение желудка) особенно полезно для прогнозирования кинетики высвобождения лекарственного средства из перорально вводимой фармацевтической формы.

На высвобождение препарата в желудочно-кишечном тракте влияет целый ряд факторов: перистальтические движения, генерируемые в желудке, механически повреждают лекарственную форму, которая быстрее высвобождает содержимое препарата; условия голодания или кормления влияют на величину и частоту сокращений; переменный pH в желудке может приводить к различной скорости растворения; непрерывное опорожнение желудка изменяет как объем растворяющей среды при переваривании, так и состав среды (жидкости текут через привратник быстрее, чем твердые вещества). Для полного и точного описания процесса высвобождения

препарата все эти явления должны быть правильно идентифицированы и воспроизведены [3,4].

В целом, абсорбция может быть оценена с помощью ряда экспериментальных методов, включая распространенные модели *in vivo*: биодоступность может быть определена из отдельных исследований перорального и внутривенного дозирования животных, а данные о фракционной адсорбции могут быть получены из перорального дозирования животным с канюлированными печеночными венами. В качестве альтернативы, процесс адсорбции можно рассматривать с точки зрения двух ключевых компонентов: кишечной проницаемости и растворимости, которые могут быть измерены с помощью клеток или других способов [5].

1.1.1.1 Кишечная проницаемость

Среди методов, позволяющих оценить степень адсорбции лекарственных средств, можно выделить [6]:

- 1) *in situ* на тонком кишечнике животных. Данного рода исследования обладают высокой достоверностью, но дорогостоящие, за счет чего не подходят для ежедневных или скрининговых исследований.
- 2) *in vitro* на монокультурах клеточных линий CaCO-2, MDCK и т.д.;
- 3) *in silico* путем расчета ClogP и logP. Является наиболее простым способом, однако точность невысока, поскольку не учитывает реальные физиологические факторы организма человека или животного.

После перорального введения лекарственного средства адсорбция характеризуется механизмами пассивной диффузии, облегченной диффузии и активного транспорта. Скорость поглощения увеличивается с увеличением коэффициента диффузии и уменьшением размеров частиц. Так же было установлено, что для лекарственных веществ, для которых характерна простая диффузия, коэффициент кишечной проницаемости P_{eff} и коэффициент кажущейся проницаемости P_{app} на клетках CaCO-2 различаются

не более чем в 2-4 раза. Для веществ с пассивным параклеточным транспортом проницаемость была в 20-80 раз ниже. Однако такие различия носят только количественный, но не качественный характер. Вещества, адсорбирующиеся при помощи активного транспорта, имеют также низкие значения кажущейся проницаемости, что связано с низкой степенью экспрессии транспортеров у клеток CaCO-2.

Низкая воспроизводимость анализа проницаемости клеток CaCO-2 может быть связана с гетерогенностью данной клеточной культуры. Свойства монослоя зависят от времени культивирования, числа пассажей и питательной среды. Поэтому наиболее оптимальными условиями для анализа считается культивирование клеток в течении 10-31 дня в различных питательных средах, чаще всего MEM и DMEM, и числом пассажей 25-100 [6,7]. Для решения проблемы воспроизводимости было решено использовать внутренние стандарты. К внутренним стандартам относится перечень соединений, предложенный FDA с «высокой», «умеренной», «низкой» и нулевой проницаемостью [8]. Как правило, при анализе включают несколько внутренних стандартов, что позволяет оценить проницаемость даже количественно. Рекомендуемые критерии высокой (>90%) проницаемости находятся в интервале от 10^{-6} см/с до 10^{-5} см/с.

Для оценки кажущейся проницаемости, клетки CaCO-2 высеивают на пористую подложку (рисунок 1) для роста монослоя при вышеуказанных условиях [6]. Раствор исследуемого препарата добавляют либо в верхнюю, апикальную, часть А, либо нижнюю, базолатеральную, часть Б пористого фильтра. Забор образца ведется с альтернативной, приемной стороны.

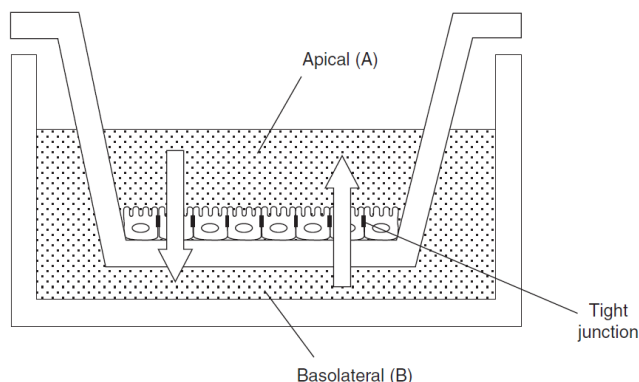


Рисунок 1 - Схематическое изображение транспорта в клетках CaCO-2

Кажущаяся, или эффективная проницаемость (P_{app}) – параметр, описывающий поток, с которым молекула пересекает единицу площади клеточного монослоя в единицу времени, может быть оценена следующим уравнением:

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \frac{V}{A \cdot C_0}, \quad (1)$$

где dC/dt – скорость изменения концентрации лекарственного препарата в одной из частей, моль/с; V – объем взятой пробы, мл; A – площадь поверхности клеточного монослоя, cm^2 , C_0 – концентрация лекарственного препарата в одной из частей до начала адсорбции, моль.

В том случае, когда проводят двунаправленные эксперименты, вычисляют так называемый коэффициент оттока (ER) [9]:

$$ER = \frac{P_{app}(B-A)}{P_{app}(A-B)}, \quad (2)$$

где $P_{app}(B-A)$ – проницаемость из базолатеральной в апикальную часть;
 $P_{app}(A-B)$ – проницаемость из апикальной в базолатеральную часть.

1.1.1.2 Растворимость

Растворимость в воде является фундаментальным свойством, которое учитывается почти в каждой стадии разработки лекарств из-за его роли в определении адсорбции, распределения и выведения лекарств из организма.

Внутренняя растворимость может быть определена как термодинамическая растворимость препарата при значении рН, при котором препарат находится полностью в неионизированной форме [10]. Эффективность лекарственных средств в первую очередь зависит от их растворимости в воде. Поэтому соединения, имеющие плохую растворимость в кишечнике, будут иметь низкую проницаемость и, следовательно, плохую абсорбцию в результате. Это побудило медицинских химиков уделять большое внимание определению растворимости биологически активных веществ как важного фактора в процессе разработки лекарственного средства.

Одним из методов определения растворимости является метод «встряхивания». Однако он является не совсем удобным по причине того, что требует большого количества пробы, так как применяется большой объем растворяющей среды. Хотя были созданы пробирки Эппендорфа, данный метод все же требует значительно большого количества пробы (~100 мг) и практически не поддается оптимизации. Поэтому был разработан метод 96-луночных пластин для определения термодинамической стабильности [11]. Исследуемое соединение в исходном растворе в присутствии метанола как растворителя, вводят в лунки микропланшета с последующей сушкой при комнатной температуре. Затем добавляют необходимую тест-среду, супернатант и анализируют УФ-методом. При помощи графика зависимости адсорбции от концентрации образца, определяют точку насыщения, которая и является термодинамической равновесной растворимостью образца (рисунок 2). Данный метод был также сопоставлен и валидирован с методом «встряхивания».

Хотя растворимость не всегда рассматривается как одно из свойств ADME, тем не менее, она является ключевым фактором в определении пероральной абсорбции препарата.

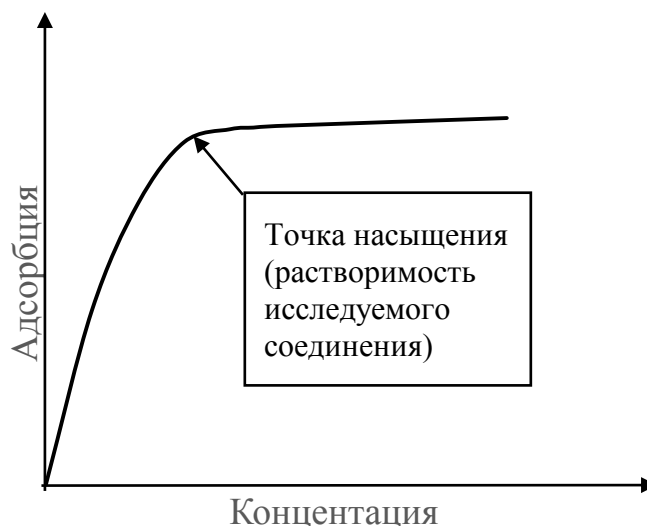


Рисунок 2 - График зависимости адсорбции от концентрации исследуемого соединения

1.1.2 Распределение

Как только лекарство было поглощено, оно распределяется по организму с помощью системной циркуляции. Концентрация лекарственного средства в организме должна быть выше концентрации, необходимой для проявления терапевтического эффекта, но ниже концентрации, которая дает неблагоприятные или токсические эффекты. Прогнозирование распределения препарата по всему организму в основном делится на три основные области исследования: проницаемость ГЭБ, объем распределения (V_{ss}) и связывание белка плазмы (РРВ). Все эти три области играют важную роль в определении приемлемых схем приема лекарств, эффективной концентрации в плазме и проницаемости ГЭБ. Высокое значение объема распределения указывает на то, что препарат хорошо распределен в тканях, тогда как низкое значение указывает на то, что препарат находится преимущественно в системном кровообращении.

Этот фармакокинетический параметр вместе с клиренсом определяет период полувыведения препарата, который представляет собой время, необходимое плазме крови для выведения 50% введенной дозы [12].

1.1.3 Метаболизм

Метаболизм является ключевым процессом в определении профиля концентрации препарата в организме. На ранних стадиях разработки лекарственных средств оптимизируются различные аспекты метаболизма, включая химию, биохимию, механизмы интоксикации и детоксикации, метаболические взаимодействия, а также физико-химические свойства и связанные с ними изменения. Как правило, данная характеристика является наиболее трудной для прогнозирования по сравнению с другими фармакокинетическими параметрами, поскольку процесс метаболизма — это очень сложный процесс, включающий различные ферментативные активности, которые варьируются у людей из-за различных генетических факторов. Метаболизм лекарственного средства сильно зависит от способа введения: если вещество принимается перорально, оно подвергается эффекту первого прохождения, при котором часть препарата метаболизируется до достижения системного кровообращения [13].

Одним из способов определения метаболической стабильности соединения является его проверка на стабильность в микросомах печени человека (HLM) или крыс (MLM) [14]. Для чего микросомы печени предварительно инкубируют с исследуемым соединением в присутствии кофакторов (НАДФН или УДФГК). Реакции останавливают в различные промежутки времени с помощью ацетонитрила. Количество оставшегося соединения в супернатантах определяют с помощью ВЭЖХ/МС. По кинетике полученных результатов рассчитывают время полураспада $T_{1/2}$, клиренс *in vitro* (CL_{int}) и оставшееся количество вещества.

1.1.4 Экскреция

Экскреция относится к процессу, с помощью которого организм избавляется от отходов жизнедеятельности. Процесс выведения препарата может быть достигнут почками и/или печенью, где лекарства выводятся в виде мочи или желчи, соответственно. Наиболее важным фактором, определяющим механизм выведения лекарственного средства, является

молекулярная масса, при которой вещества с относительно небольшой молекулярной массой в основном удаляются с мочой. Пассивная экскреция может быть предсказана на основе некоторых подходов, которые включают скорость потока, липофильность, связывание белка и значение pK_a . После предсказания профиля экскреции лекарственного средства собранная информация должна быть интегрирована в прогностическую модель, которая обеспечивает полную модель, описывающую поведение вещества на различных этапах открытия и разработки лекарственного средства [5].

1.1.5 Токсичность

Оценка токсичности лекарственных средств рассматривается как важнейший вопрос, которому исследователи уделяют большое внимание. Традиционно токсичность определяют с помощью лабораторных животных. Существует множество причин, почему важно прогнозировать токсичность лекарственных средств *in silico*, такие как растущий спрос на сокращение испытаний на животных, более подходящее прогнозирование токсичности, которое может быть получено с помощью вычислительных подходов. В последние годы были разработаны новые подходы к определению токсичности, которые сводят к минимуму риски тестирования на животных путем замены их гораздо более безопасными альтернативами [15,16].

1.2 Ингибиторы PI3K

Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) – семейство липидкиназ, фосфорилирующих фосфатидилинозитол в положении 3 инозитольного кольца. Данные киназы являются ключевыми элементами PI3K сигнального пути, отвечающего за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток и метаболизм. [17]. Семейство PI3K делится на 3 класса в соответствии с их способом действия и предпочтениями субстрата. Наиболее изученный I класс также был разделен на изоформы: PI3K α , PI3K β , PI3K γ и PI3K δ . По своему

химическому строению, эти ингибиторы можно разделить на пропеллерные и плоские.

Аномальная активация пути PI3K, возникающая в результате активации RTK или соматических мутаций основных компонентов пути, приводит к образованию раковых клеток. Такая же активация может произойти в случае потери отрицательных регуляторных белков, таких как фосфатаза C и гомолог Тензина (PTEN) [17].

1.2.1 Ингибиторы пропеллерного типа

В 2012г. Neffron с коллегами идентифицировали два новых ингибитора PI3K α с хорошим проникновением ГЭБ для воздействия на опухоли мультиформной глиобластомы (GBM) [18]. Ранее ими было получено соединение **1** (рисунок 3) на основе тиено[3,2-*d*]пиримидинового скаффолда, но оно обладало низким проникновением ГЭБ и плохой проницаемостью.

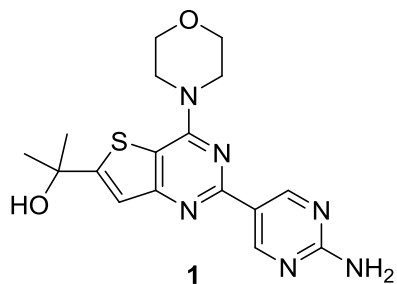


Рисунок 3 - Химическое строение лид-соединения **1**

Оптимизация физико-химических свойств этого соединения, путем вариации заместителя в 6 положении, привела к получению соединений **4a-b** (схема 1).

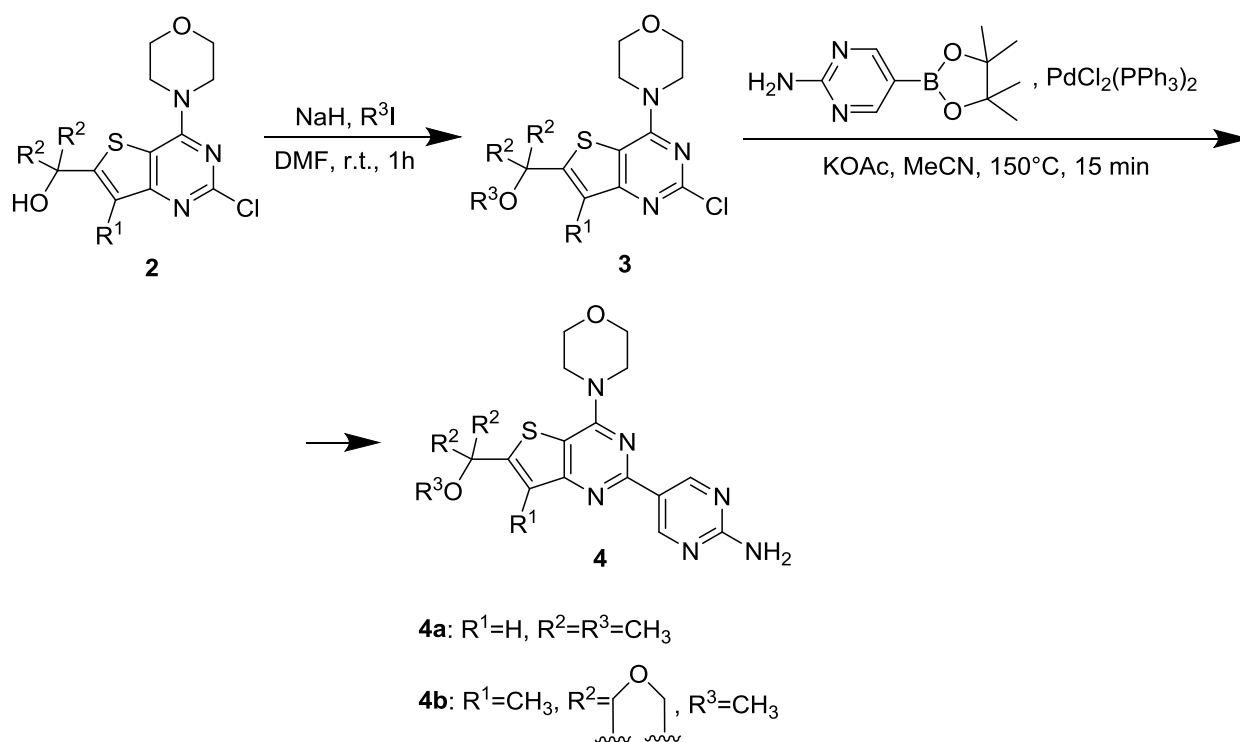


Схема 1 - Получение замещенных тиено[3,2-*d*]пиримидинов **4a-b**

Полученные соединения были изучены на мышах для оценки их фармакокинетического профиля. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Фармакокинетический профиль соединений **4a,b**

Соед.	РІЗК α IC ₅₀ , [нмоль]	Пролиферация РС3 EC ₅₀ , [нмоль]	ER	CL, [мл/мин/кг]	T _{1/2} , [ч]	F, (%)	$\frac{[мозг]}{[плазма]}$
1	3	330	5	17	2.2	100	0.3
4a	1	170	1.6	20	20	25	1.0
4b	2	132	1.5	32	17	75	1.0

Из результатов видно, что новые соединения имеют приемлемый клиренс, высокое проникновение ГЭБ, оцениваемое как отношение свободной концентрации в мозге относительно свободной концентрации в плазме крови, и высокий период полувыведения. Также были проведены дополнительные

анализы для оценки ингибирования всех изоформ PI3K, где данные соединения также хорошо себя проявили.

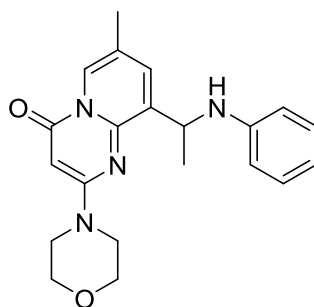
Для оценки применимости полученных соединений при GBM, соединения **4a,b** были протестированы на панели клеточных линий глиобластомы. В шести из семи протестированных линий как **4a**, так и **4b**, имели антипролиферативные эффективные концентрации $EC_{50} < 600$ нмоль (таблица 2).

Таблица 2 - Антипролиферативная активность **4a,b**

Клеточная линия	4a , EC_{50} [мкмоль]	4b , EC_{50} [мкмоль]
A172	0.38	0.24
HS683	0.27	0.23
LN-229	0.40	0.14
MO59J	0.59	0.33
SF539	0.34	0.25
U87-MG-Luc	0.29	0.25
SF268	1.0	0.57

Таким образом были получены хорошо эффективные ингибиторы PI3K α , с высоким проникновением ГЭБ и низким коэффициентом оттока. В настоящее время продолжается исследование этих и других молекул для клинического применения.

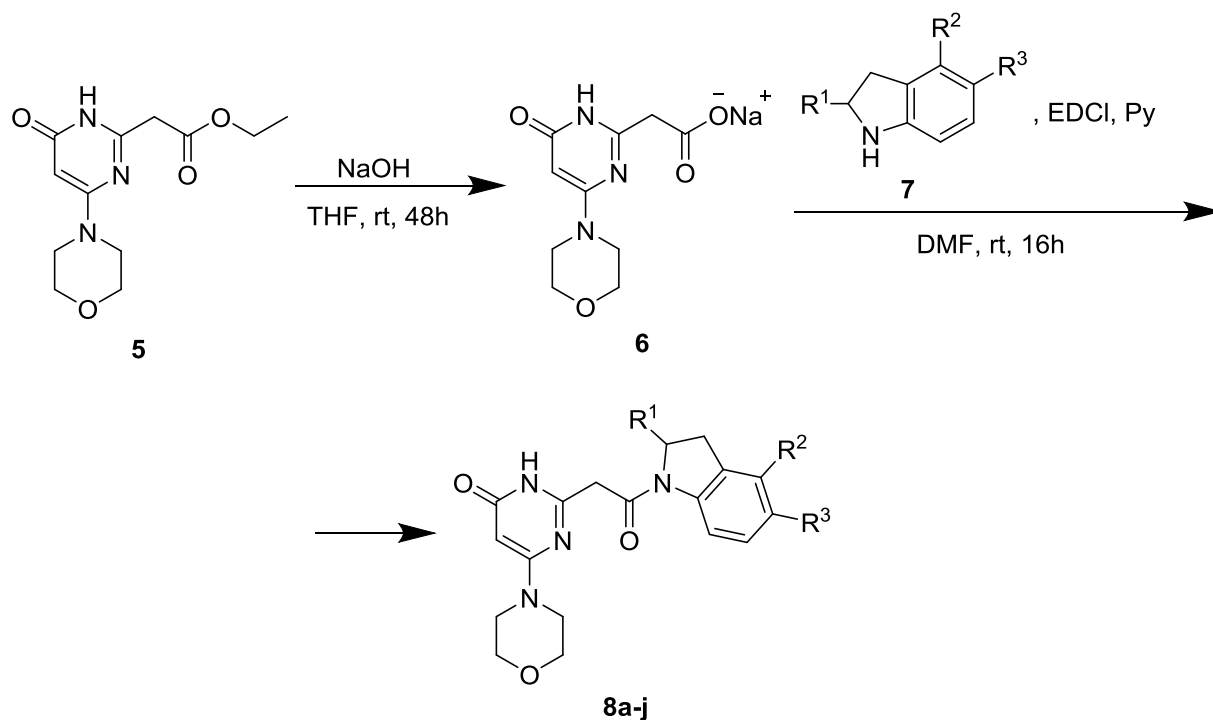
В статье [19] описывается открытие селективных низкомолекулярных ингибиторов PI3K β и их оптимизация относительно эталонного ингибитора **TGX-211** (рисунок 4). В частности, больший упор был сделан на улучшение растворимости и описании поведения в PTEN-дефицитных моделях опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.



TGX-211

Рисунок 4 - Структура ингибитора TGX-211

Получение новых высокоэффективных ингибиторов РІЗКβ представлено на схеме 2.



- 8a-j**
- a:** R¹=H, R²=H, R³=H; **b:** R¹=H, R²=H, R³=F;
c: R¹=H, R²=H, R³=Cl; **d:** R¹=H, R²=F, R³=H;
e: R¹=H, R²=Cl, R³=H; **f:** R¹=H, R²=Ph, R³=H;
g: R¹=H, R²=p-Py, R³=H; **h:** R¹=H, R²=Me, R³=H;
i: R¹=(S)-Me, R²=H, R³=H; **j:** R¹=(R)-Me, R²=H, R³=H;

Схема 2 - Получение соединений **8a-j**

Полученные соединения были оценены на биохимическую и клеточную активности. Результаты анализов представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Биохимическая и клеточная активность соединений **8a-j**

Comp	MW	PI3K β IC ₅₀ , [нмоль]	pAkt IC ₅₀ , [нмоль]	ClogP	Раствори- мость, [мкмоль]	P _{app} , [нм/с]	HLM, % лабиль- ности
TGX-211	364	30	10	-	-	-	-
8a	340	4	15	1.2	12	59	12
8b	358	4	7	1.1	31	30	18
8c	375	79	124	1.2	3	14	34
8d	358	6	5	0.6	14	54	19
8e	375	1	3	1.6	5	88	18
8f	416	8	14	3.2	-	71	40
8g	417	10	94	1.8	69	4	43
8h	354	4	6	-	2754	-	-
8i	354	23	49	1.5	928	48	12
8j	354	6	12	1.7	2497	51	43

Все выбранные соединения имеют молекулярную массу <450 г/моль и ClogP <3, что не противоречит правилу Липинского. Также они обладают хорошей ингибирующей активностью. Для большинства соединений растворимость в воде была ограничена, но с другой стороны проницаемость в целом была приемлемой. Лабильность в микросомах печени человека была ниже ожидаемых значений, так как ни одно из соединений не обладало значительной ингибирующей активностью СУР3А4 (для всех соединений IC₅₀ составляла 40 мкмоль, за исключением соединений **8g** (IC₅₀ = 31 мкмоль)). Исходя из этих данных, Certal с коллегами решили выбрать соединение **8i** для дальнейших исследований.

Профиль селективности протеинкиназ был оценен на панели из 192 киназ. Исследования показали, что соединение **8i** неактивно на всех тестируемых киназах с IC₅₀ > 10 мкмоль. Приемлемая активность наблюдалась только в анализе на ДНК-зависимых (IC₅₀ = 2000 нмоль) и VPS34 (IC₅₀ = 183 нмоль) киназах. Дополнительные фармакокинетические

параметры (клиренс, объем распределения, период полувыведения и др.) были оценены на самках мышей Balb/c. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Фармакокинетические параметры соединения **8i**

Способ введения	Доза, [мг/кг]	C_{max} , [нг/мл]	T_{max} , [ч]	$T_{1/2}$, [ч]	AUC, [ч нг мл ⁻¹]	CL, [л ч ⁻¹ кг ⁻¹]	V_d , [л ч ⁻¹ кг ⁻¹]	F, (%)
Инвазивно	3	1870	-	0.87	600	5.0	1	-
Перорально	10	848	0.25	1.4	610	-	-	30
	100	8960	0.25	2.5	11000	-	-	55

Из полученных данных видно, что при пероральном введении 100 мг/кг соединения **8i** воздействие в плазме крови увеличивалось в 19 раз (вместо ожидаемых 10), а биодоступность увеличилась до 55%. С учетом этих результатов было решено оценить данное соединение на мышах-носителях в концентрации 100 мг/кг. Результаты анализов показали устойчивое целевое ингибирование ($\geq 50\%$) pAkt-S473 в PTEN-дефицитных моделях простаты PC3 и меланомы UACC-62 в течении не менее 6ч. Эффективные концентрации составили $EC_{50} = 0.68$ мкмоль и $EC_{90} = 6.12$ мкмоль.

В целом, полученные результаты фармакокинетических исследований позволили использовать соединение **8i** (SAR 260301) в качестве самостоятельного агента и в комбинации на моделях PTEN-дефицитных ксенотрансплантантов мышей. Так же, это соединение было предоставлено на доклинические испытания и проходит I/Ib фазу.

Helwa с коллегами [20] разработали и синтезировали новые замещенные 6-морфолинопиримиды как новые селективные ингибиторы PI3K (схема 3). Полученные соединения были оценены на цитотоксическую активность против 60 клеточных линий и свойства ADME.

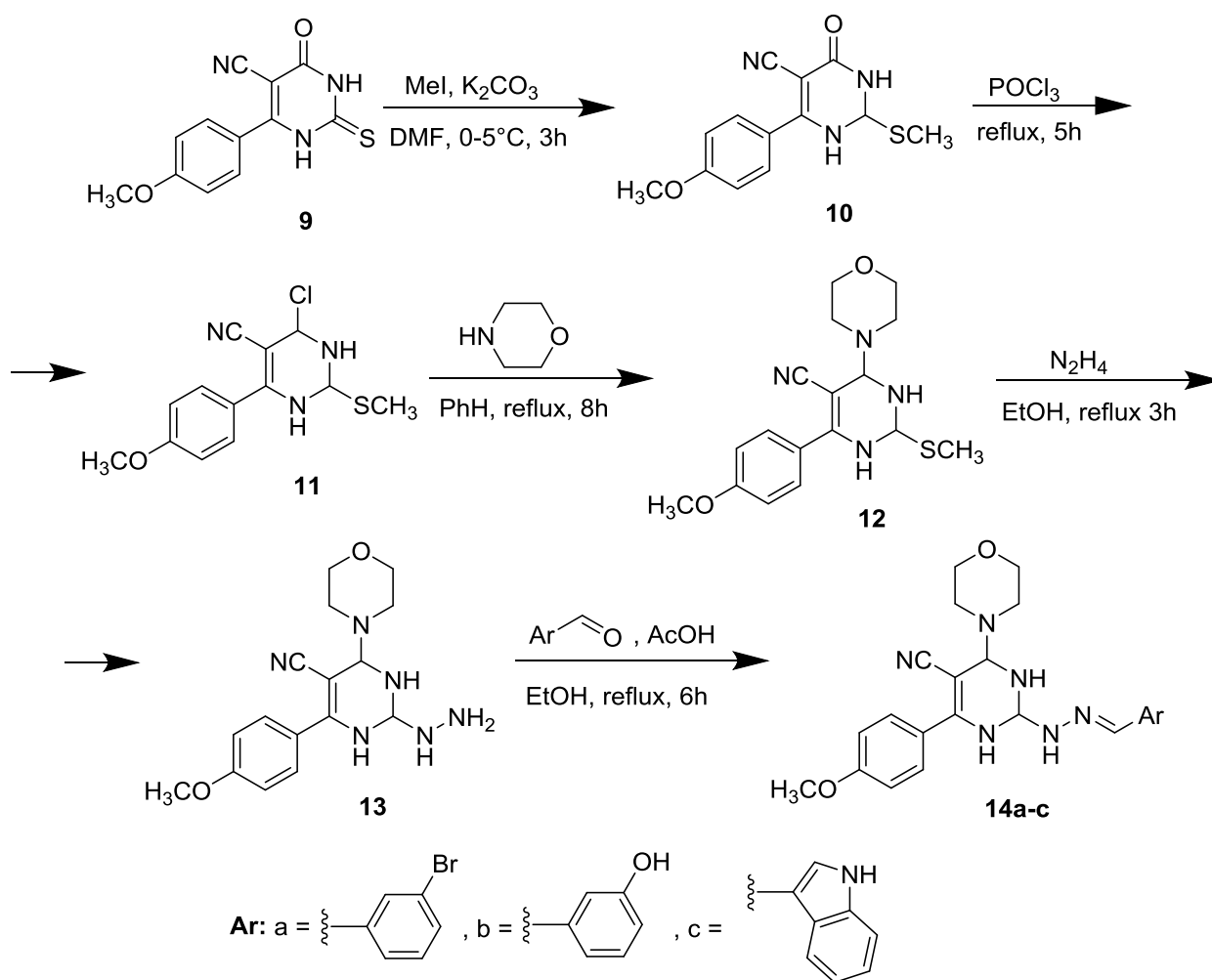


Схема 3 - Получение соединений **14a-c**

Полученные соединения были выбраны для скрининга *in vitro* в дозе 10 мкмоль против 60 клеточных линий. Из полученных результатов видно, что наиболее активно эти соединения проявляли себя на клеточных линиях лейкоза, меланомы, рака почек и толстой кишки. Исходя из этих данных было решено исследовать их на цитотоксическую активность против клеточной линии SR лейкоза. Также была оценена ингибирующая активность в отношении трех изоформ PI3K. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Биохимическая и антипролиферативная активность соединений **14a-c**

Comp.	IC ₅₀ , [мкмоль]		Селективность PCS-800-011/ L.SR	IC ₅₀ , [мкмоль]		
	L.SR	PCS-800-011		PI3K α	PI3K β	PI3K δ
14a	0.76	40.44	53.21	11.73	6.09	11.18
14b	13.59	22.29	1.64	8.43	15.84	30.62
14c	4.37	24.05	5.50	13.98	7.22	10.94

Из результатов видно, что соединение **14a** является наиболее мощным в отношении клеточной линии лейкоза. Также оно показало высокий уровень безопасности относительно здоровых клеток (моноциты периферической крови PCS-800-011). Однако соединение **14b** оказалось токсичным, о чем свидетельствует значение селективности 1.64. Анализ ингибирования PI3K показал, что все соединения проявляют мощную ингибирующую активность в отношении различных изоформ.

Для предсказания лекарственной способности, соединения **14a-c** были профилированы по характеристикам ADME и фармакокинетическим свойствам (таблица 6).

Таблица 6 - Фармакокинетические и ADME свойства **14a-c**

Comp.	MW, [г/моль]	tPSA, [Å]	Адсорбция в ЖКТ	Проницаемость ГЭБ	Ингибирование CYP1A2, [мкмоль]
14a	493.09	95.66	высокая	-	-
14b	430.28	115.89		-	-
14c	453.32	107.69		-	-

В целом, полученные соединения подчиняются правилу Липинского, которое качественно оценивает возможность пероральной биодоступности, и не ингибируют CYP1A2, который является основной причиной снижения фармакологических свойств. Оценка PAINS подтвердила, что данные соединения являются стабильными и не вызывают нецелевых эффектов.

Таким образом, были получены высокоэффективные ингибиторы PI3K на основе 6-морфолинопиримидинового скелета. Они обладают мощным ингибирующим и антипролиферативным действием. Исследования ADME *in silico* показали, что данные соединения являются перспективными перорально биодоступными с низким профилем токсичности и пригодны для дальнейшей оптимизации в качестве селективных ингибиторов PI3K α при лечении лейкозов.

В 2017 году Ноегенауер с коллегами [21] открыли мощный и селективный ингибитор PI3K δ Лениолизиб **16** (рисунок 5). Оптимизации фармакокинетических свойств проводилась относительно ранее обнаруженных 4,6-диарилхиназолинов **15a,b** (рисунок 5) [21]. Лид-соединение **16** обладает хорошими ADME свойствами и высокой эффективностью для клинических испытаний в качестве противовоспалительного терапевтического средства.

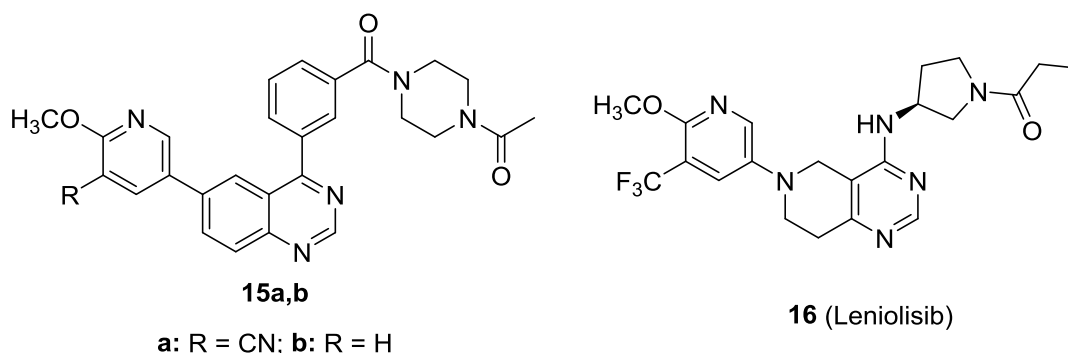


Рисунок 5 - Ингибиторы PI3K δ

Как видно из таблицы 7, Лениолизиб **16** имеет оптимальный профиль ингибирования, является достаточно гидрофильным, что обеспечивает хорошую растворимость и метаболическую стабильность. Однако оно менее полярно, чтобы обеспечить благоприятную проницаемость мембран.

Таблица 7 - Биохимическая и клеточная активность и ADME свойства **11-12**

Comp.	PI3K δ IC ₅₀ , [нмоль]	pAKT IC ₅₀ , [нмоль]	mCD86 IC ₅₀ , [нмоль]	rCD86 IC ₅₀ , [нмоль]	logP	P _{eff} , [нм/с]	CL _{int} , [мкл/мин/кг]
15a	9	49	74	72	2.8	3.16	63
15b	29	28	70	66	2.7	12.59	115
16	11	56	48	99	3.2	31.62	55

По сравнению с **15a**, Лениолисиб обладает таким же профилем ингибирования, высокой проницаемостью, умеренной микросомальной стабильностью и растворимостью. Также, для соединения **16** был оценен фармакокинетический профиль на крысах (доза 3 мг/кг). Из полученных результатов видно, что оно быстро всасывается ($T_{max}=24$ мин), имеет умеренный клиренс ($CL_{int}=28$ мл/мин/кг) и приемлемый объем распределения ($V_{ss}=3.1$ л/кг).

В настоящее время Лениолисиб **16** проходит клинические испытания в качестве терапевтического средства для лечения синдрома активированной PI3K (APDS1) и синдрома Шегрена.

Safina с коллегами [23] сообщили об открытии новых, мощных и селективных PI3K δ на основе замещенных тиено[3,2-*d*]-пиримидинов (схема 4).

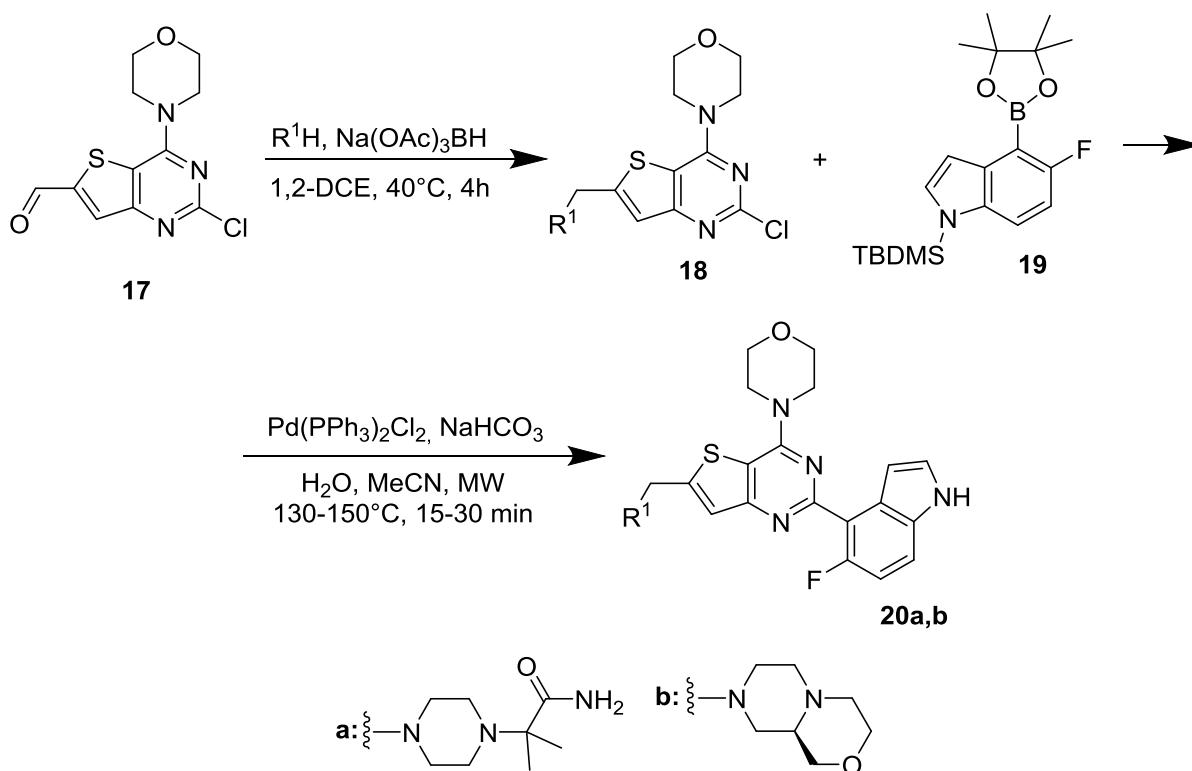


Схема 4 - Получение производных тиено[3,2-*d*]пиримидинов **20a,b**

Из результатов биохимических анализов видно, что соединения **20a,b** проявляют хорошую ингибирующую активность ($IC_{50} = 3$ нмоль, 9 нмоль соответственно) и превосходную селективность изоформы. Они также были профилированы по некоторым характеристикам ADME. Результаты анализов приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Фармакокинетический профиль соединений **20a**

Comp.	Ингибирование CYP IC_{50} , [мкмоль]	CL, [мл/мин/кг]	V_{ss} , [л/кг]	$T_{1/2}$, [ч]	F, (%)
20a	1.5	31.3	2.38	1.48	75.2
20b	7.0	25.2	2.76	1.60	75.5

Сравнение фармакокинетических профилей этих двух соединений показало, что, хотя и была произведена замена заместителя в 6-положении, клиренс и биодоступность оказались на том же уровне. Единственное

различие было в ингибировании СУР3А4, что связано с аутоингибированием соединения **20a** и высоким клиренсом при многократном дозировании.

В целом, ни одно из полученных соединений не было допущено к клиническим испытаниям из-за вышперечисленных причин. Однако использование индольного заместителя открыло новые пути синтеза селективных ингибиторов Р1ЗКδ, благодаря метаболической стабильности и клеточной потенции.

1.2.2 Ингибиторы плоского типа

Нан с коллегами [24] открыли серию новых тиено[2,3-*d*]пиримидинов как высокоэффективных и селективных ингибиторов Р1ЗКα. Получение наиболее активных соединений представлено на схеме 5.

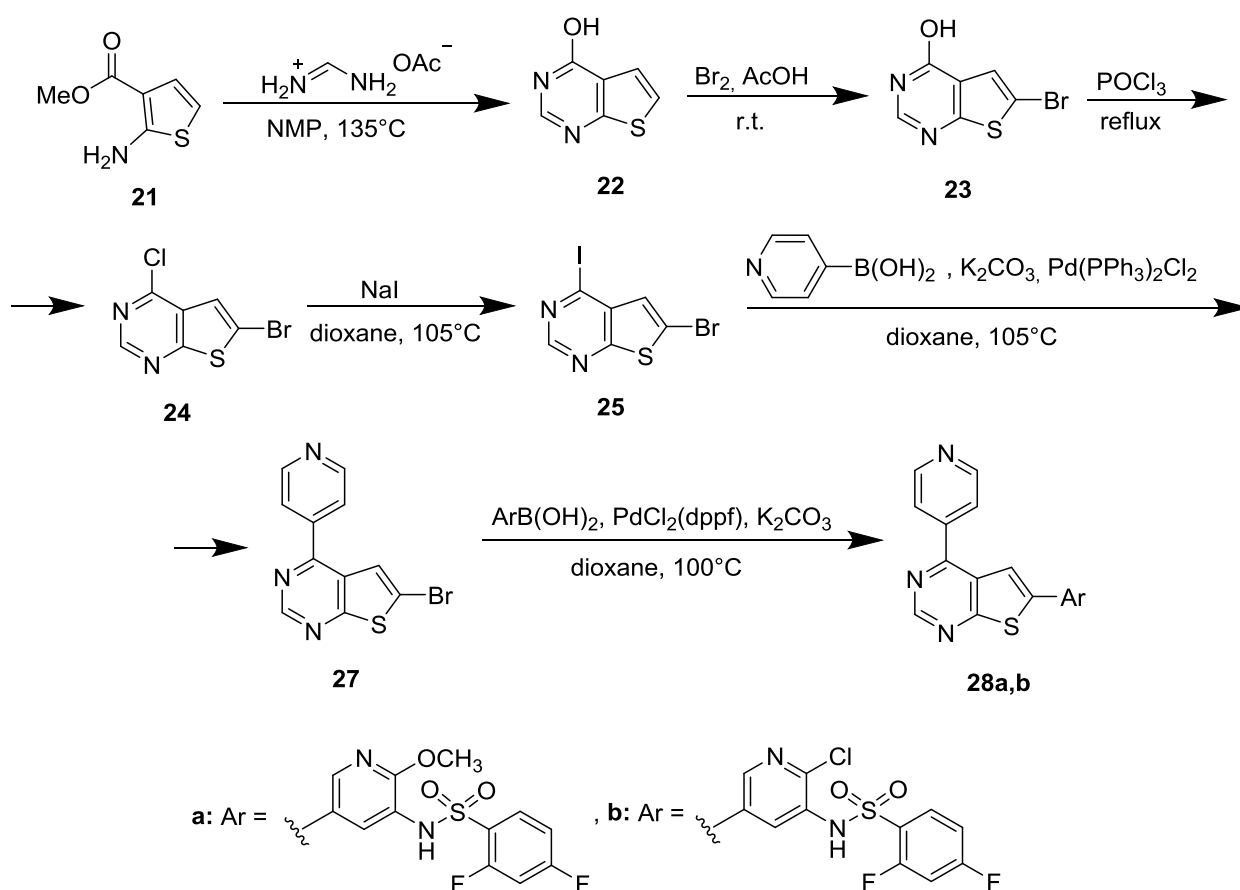


Схема 5 - Получение производных тиено[2,3-*d*]пиримидинов **28a,b**

Данные производные обладают наномолярной ингибирующей способностью и более чем 100-кратной селективностью в отношении mTOR-киназы. Полученные соединения были оценены на проницаемость клеток CaCO-2 и ингибирующую активность. Результаты анализов представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Биохимическая и ингибирующая активность **28a,b**

Comp.	IC ₅₀ , [нмоль]				P _{app} , [нм/с]		
	PI3K α	PI3K β	PI3K δ	PI3K γ	A \rightarrow B	B \rightarrow A	ER
28a	2.07	22.5	13.3	21.1	5.6	4.5	0.8
28b	0.23	3.6	3.1	10.2	4.8	6.9	1.4

Из результатов анализа видно, что из всех 4-х изоформ киназ PI3K наиболее активно проявляли себя эти соединения против PI3K α . Результаты анализа проницаемость *in vitro* показали умеренную проницаемость для обоих этих соединений. Также был проведен ряд анализов на различных линиях раковых клеток на предмет их чувствительности (таблица 10). Все выбранные клеточные линии содержат либо мутации PI3K α , либо делецию PTEN, за исключением A549.

Таблица 10 - Антипролиферативная активность **28a,b**

Comp.	Клеточная линия, IC ₅₀ [мкмоль]					
	SK-OV-3	H-1975	H-460	A549	T-47D	U-86 MG
28a	3.74	1.07	0.42	3.18	0.66	4.40
28b	5.20	2.20	2.94	8.44	1.52	4.43

Данные соединения проявляют умеренную активность в микромолярном диапазоне. Соединение **28a** наиболее чувствительно к немелкоклеточному раку легких линии H-460 и раку молочной железы линии T-47D.

В настоящее время ведется исследование *in vivo* полученных соединений, полное профилирование их фармакокинетических свойств и эффективности.

В 2012 г. Giordanetto с коллегами [25] сообщили об открытии мощного селективного ингибитора PI3K β **32** на основе пиримидин-2она в качестве потенциального антитромбоцитарного препарата. Получение производных пиримидин-2она представлено на схеме 6.

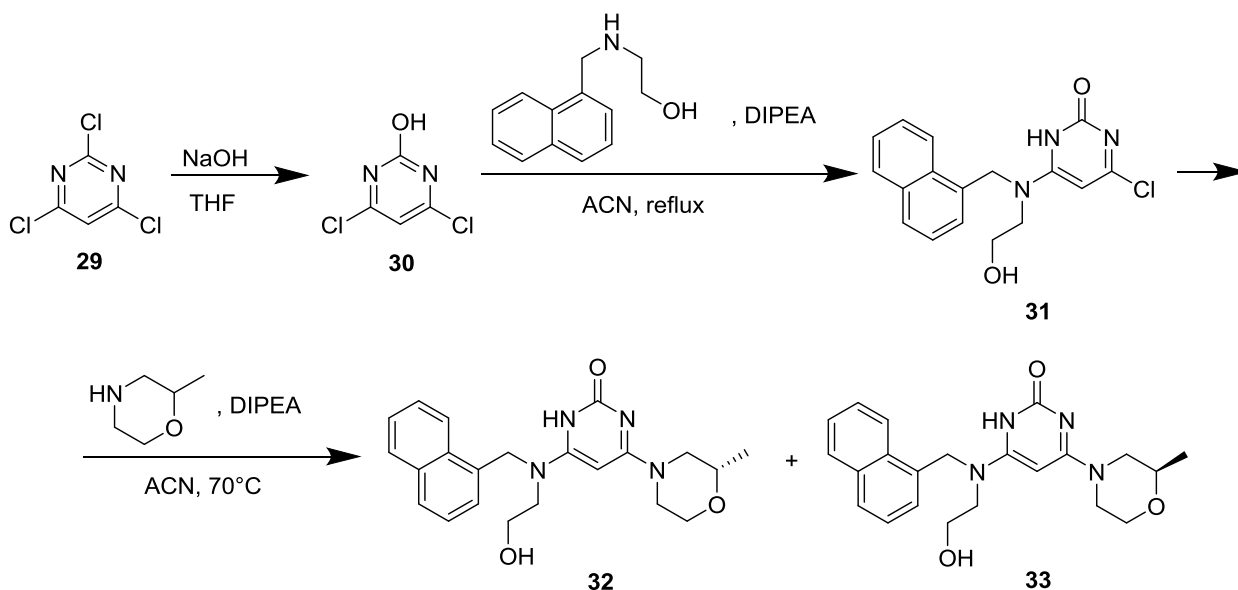


Схема 6 - Получение ингибиторов PI3K β **32-33**

Данные соединения были оценены на ингибирующую активность (табл. 11).

Таблица 11 - Ингибирующая активность **32-33**

Comp.	IC ₅₀ , [мкмоль]				logP
	PI3K α	PI3K β	PI3K δ	PI3K γ	
32	27.2	0.038	0.168	97.4	1.9
33	349	1	-	-	1.9

Как показали результаты, наиболее активным соединением оказалось **32** с IC₅₀=38 нмоль. Также он оказался селективным по отношению с PI3K α (>700-

кратный). Оценка селективности P13K α является не менее важным критерием, поскольку активация альфа-киназы приводит к сигнализации инсулина и может вызвать инсулинорезистентность.

Соединение **32** было также проанализировано на некоторые параметры ADME на собаках породы бигль (лат. *Beagle canis*). Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 - ADME характеристики соединения **32**

Сomp.	pAKT IC ₅₀ , [нмоль]	Растворимость, [мкмоль]	T _{1/2} , [ч]	PPB, (%)	CL, [мл/мин/кг]	F, (%)
32	195	100	>2.8	30	18	25

Благодаря тому, что данное соединение имеет благоприятный профиль характеристик ADME *in vitro*, оно было оценено с точки зрения его антитромбоцитарного эффекта *in vivo*. Результаты анализов показали, что данное соединение приводит к дозо-зависимому ингибированию агрегации тромбоцитов *ex vivo*.

Таким образом, соединение **32** является мощным ингибитором изоформы p110 β с высокой селективностью по сравнению с другими изоформами, обладающим благоприятным антитромботическим эффектом.

Remberton с коллегами [26] сообщили об открытии селективного ингибитора изоформы P13K γ (схема 7). Полученное соединение обладает хорошими ADME характеристиками *in vitro*, удовлетворяющими для потенциального перорального приема.

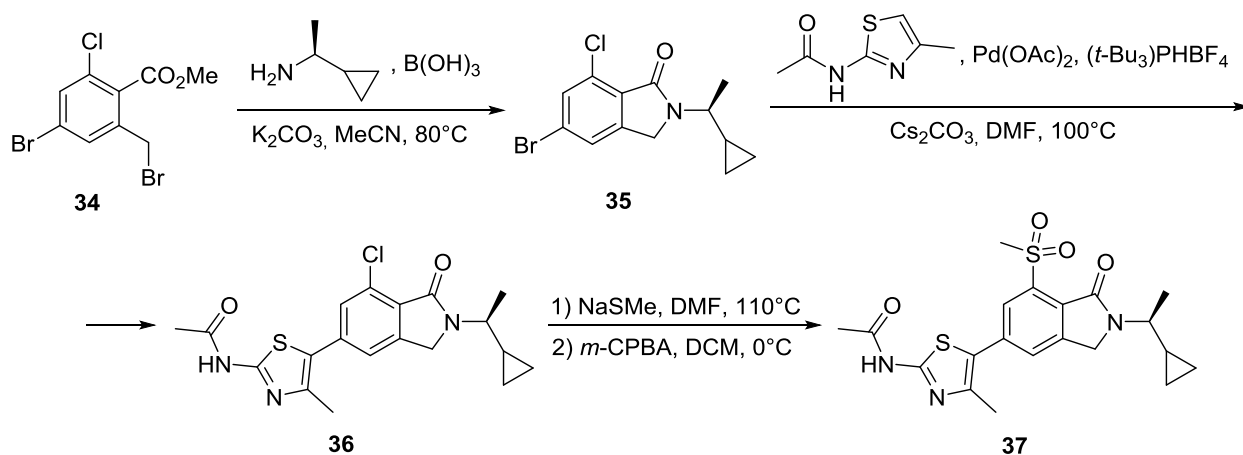


Схема 7 - Получение ингибитора РІЗК γ **37**

Полученное соединение было оценено в биохимических и клеточных анализах. Результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Ингибирующая активность и фармакокинетические свойства соединения **37**

Comp.	РІЗК γ IC ₅₀ , [мкмоль]	log P	Растворимость, [мкмоль]		hERG IC ₅₀ , [мкмоль]	PPB, (%)	CL, [мл/мин/кг]	T _{1/2} , [ч]	F, (%)
			pH 7.4	pH 6.5					
37	9.1	2.4	303	111	4.5	12	6.3	2.3	51

Из результатов анализов видно, что данное соединение обладает хорошей растворимостью и биодоступностью, низкий клиренс и плохое связывание с белками плазмы крови. Также оно было проверено на клеточную активность против клеток Јеко-1В лимфомы человека, где показало хорошие результаты (IC₅₀ = 8.1 мкмоль). На основании этих данных, соединение **37** было идентифицировано как соединение с наилучшим профилем для перорального введения. Дальнейшее профилирование селективности ингибирования киназ проводить на панели из 395 киназ, включая белковые и липидные киназы. Из результатов так же видно, что оно является высокоселективным только к РІЗК γ (95% ингибирования).

Благодаря своему хорошему профилю ADME характеристик, соединение **37** было выбрано для измерения нейтрофилии дыхательных путей у крыс. Дозирование проводилось за 2ч до начала анализа с дальнейшим ингибированием миграции нейтрофилов в дозах 0.1, 0.5 и 2.5 мг/кг. Их полученных результатов видно, что пероральное введение **37** ингибирует функции PI3K γ *in vivo*.

Таким образом, был получен высокоселективный ингибитор PI3K γ **37** сочетающий высокую биохимическую и клеточную активность с привлекательным фармакокинетическим профилем.

Исходя из данного литературного обзора можно сделать несколько выводов. Во-первых, большинство ингибиторов всех изоформ PI3K I класса содержат пиримидиновые и бензопиримидиновые скаффолды и их аналоги. Во-вторых, полученные соединения имеют ингибирующую активность в наномолярных диапазонах. В-третьих, исходя из результатов анализов ADMET характеристик и клеточных анализов, большинство полученных ингибиторов могут быть допущены до клинических испытаний или уже находятся на стадии исследований.

2 Результаты и обсуждения

В качестве объектов исследования выступают производные 5-цианопиримидина, синтезированные сотрудниками научно-исследовательской лаборатории Центра Медицинской Химии «Функциональные Гетероциклические Соединения». На рисунке 6 приведены структурные формулы изучаемых соединений и их лабораторные шифры.

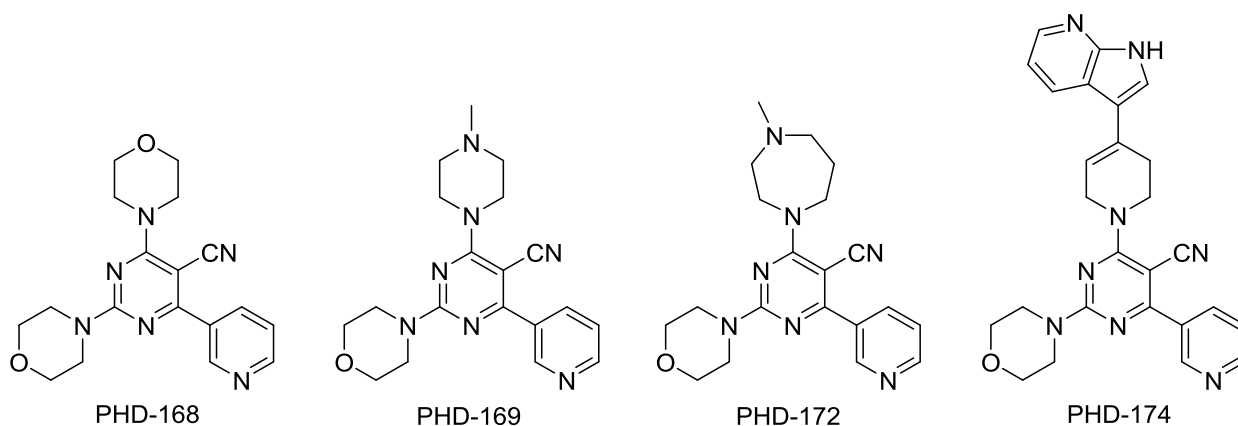


Рисунок 6 - Серия изучаемых соединений

На основании экспериментальных данных, приведенных в таблицах 14-17, были построены градуировочные графики зависимости известной концентрации исследуемых веществ от интегральной площади пика (рис. 7-10).

Таблица 14 - Зависимость концентрации соединения PHD-168 от интегральной площади пика.

Концентрация, [мкмоль]	Площадь, [мАу·с]	Среднее значение площади, [мАу·с]
1000	24914.9	23321.97 ± 6549.03
	22682.3	
	22368.7	
500	11869.0	11823.13 ± 629.02
	11672.9	
	11927.5	
100	2736.33	2671.68 ± 286.35
	2662.82	
	2615.89	
50	1214.69	1376.13 ± 852.41
	1571.35	
	1342.36	
10	346.98	344.11 ± 73.44
	327.31	
	358.05	
5	182.13	183.77 ± 19.68
	188.51	
	180.66	
1	83.88	82.09 ± 7.31
	80.30	
	60.12	
0	0	0

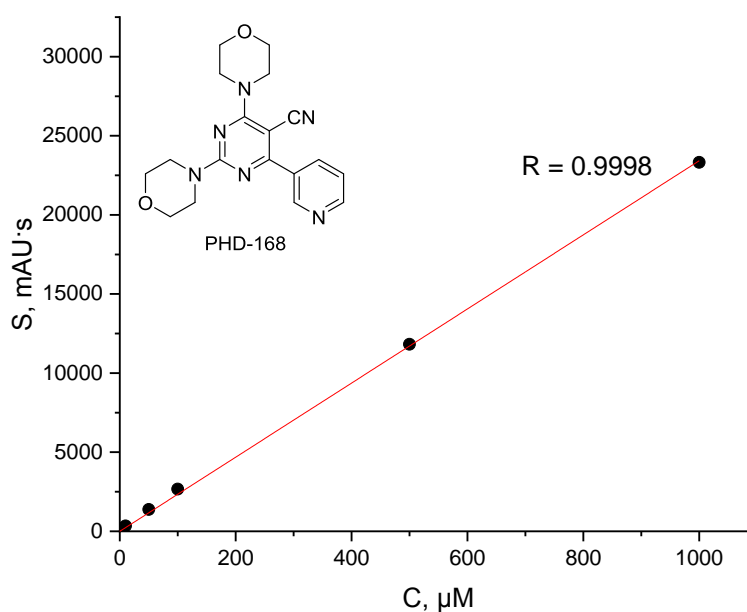


Рисунок 7 - График зависимости концентрации соединения PHD-168 от интегральной площади пика

Таблица 15 - Зависимость концентрации соединения PHD-169 от интегральной площади пика.

Концентрация, [мколь]	Площадь, [мАу·с]	Среднее значение площади, [мАу·с]
1000	26510.6	26544.90 ± 231.06
	26523.1	
	26601.0	
500	16417.5	15558.30 ± 3584.89
	15283.4	
	14974.0	
100	3146.56	3239.64 ± 381.26
	3292.12	
	3280.24	
50	1683.97	1664.61 ± 118.95
	1636.09	
	1673.76	
10	580.27	518.98 ± 250.58
	490.52	
	486.15	
5	227.51	208.13 ± 79.50
	196.88	
	200.01	
1	74.95	63.55 ± 42.06
	60.76	
	54.93	
0	0	0

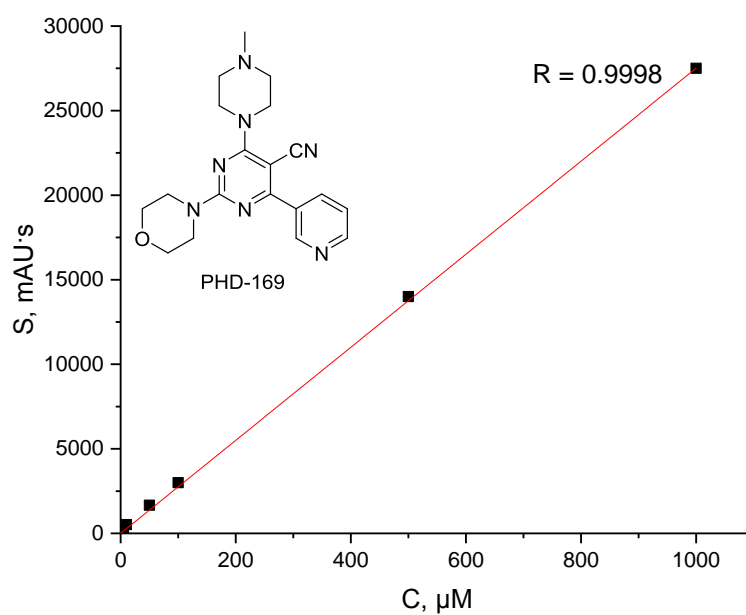


Рисунок 8 - График зависимости концентрации соединения PHD-169 от интегральной площади пика

Таблица 16 - Зависимость концентрации соединения PHD-172 от интегральной площади пика.

Концентрация, [мкмоль]	Площадь, [мАу□с]	Среднее значение площади, [мАу□с]
1000	30014.4	29340.20 ± 2835.73
	29146.3	
	28859.9	
500	15692.3	15362.80 ± 1347.23
	15210.2	
	15185.9	
100	3690.85	3648.28 ± 387.83
	3700.48	
	3553.50	
50	1770.65	1744.25 ± 109.35
	1734.90	
	1727.21	
10	398.42	428.95 ± 130.07
	371.91	
	399.7	
5	215.27	229.53 ± 88.49
	250.78	
	222.53	
1	52.23	55.34 ± 23.79
	61.16	
	52.63	
0	0	0

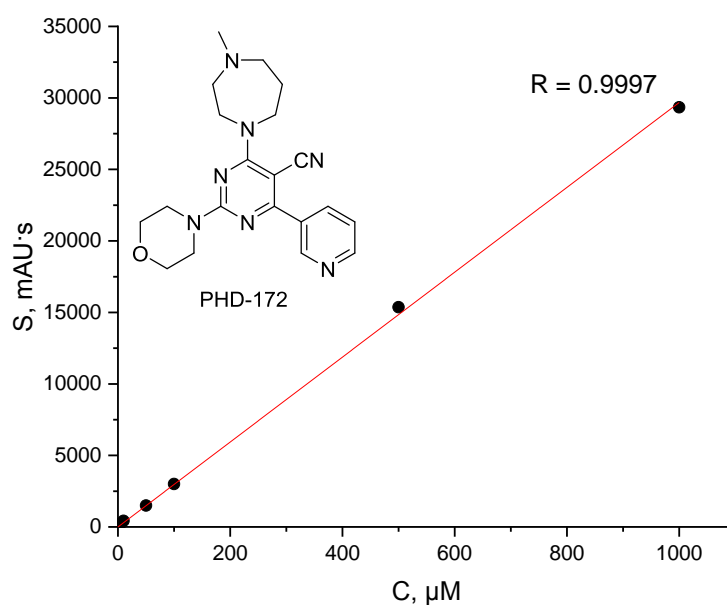


Рисунок 9 - Зависимость концентрации соединения PHD-172 от интегральной площади пика

Таблица 17 - Зависимость концентрации соединения PHD-174 от интегральной площади пика.

Концентрация, [мкмоль]	Площадь, [мАу·с]	Среднее значение площади, [мАу·с]
1000	33755.8	32922.23 ± 3439.57
	32608.4	
	32402.5	
500	16236.6	16296.47 ± 612.71
	16207.3	
	16445.5	
100	3487.78	3488.54 ± 55.91
	3477.09	
	3500.76	
50	1724.99	1795 ± 453.29
	1904.56	
	1755.44	
10	428.18	437.77 ± 117.35
	466.02	
	419.12	
5	216.18	232.69 ± 106.62
	258.45	
	223.43	
1	69.99	74.58 ± 21.89
	79.27	
	74.48	
0	0	0

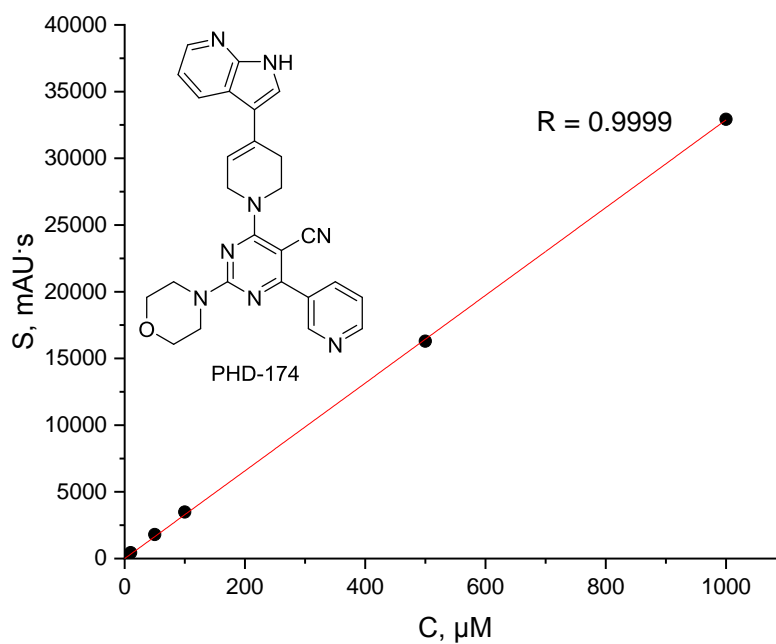


Рисунок 10 - Зависимость концентрации соединения PHD-174 от интегральной площади пика

Определение неизвестной концентрации проводилось методом градуировки. Зная интегральную площадь пика, мы определяли какое количество вещества проникло через клетки CaCO-2. Полученные данные также были нанесены на ранее полученные графики для оценки воспроизводимости анализа (рис. 11-14).

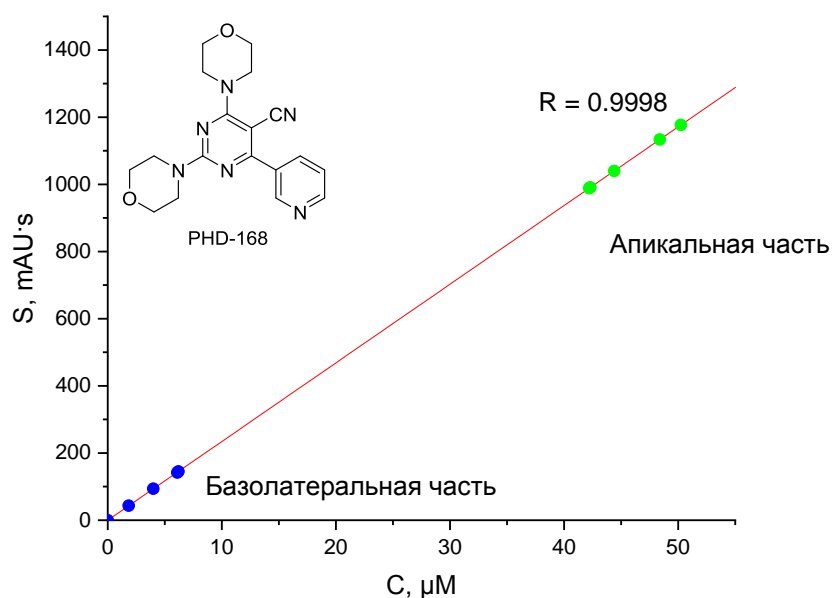


Рисунок 11 - Градуировочный график соединения PHD-168

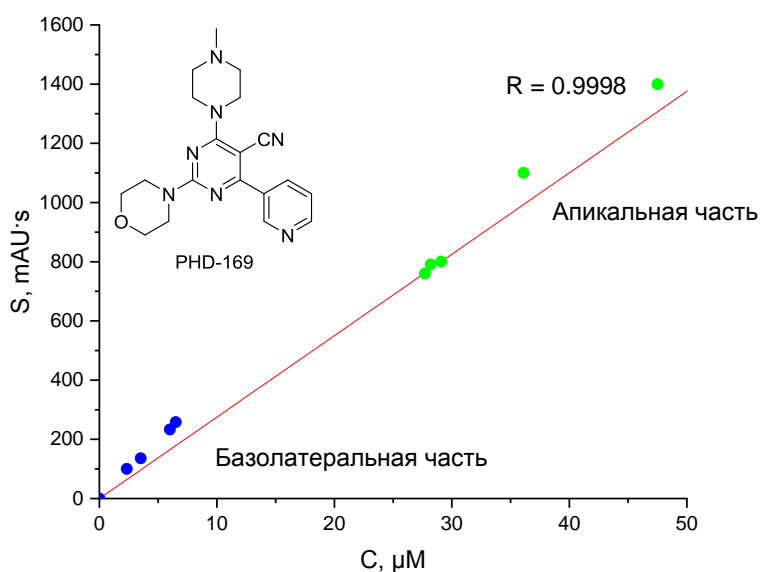


Рисунок 12 - Градуировочный график соединения PHD-169

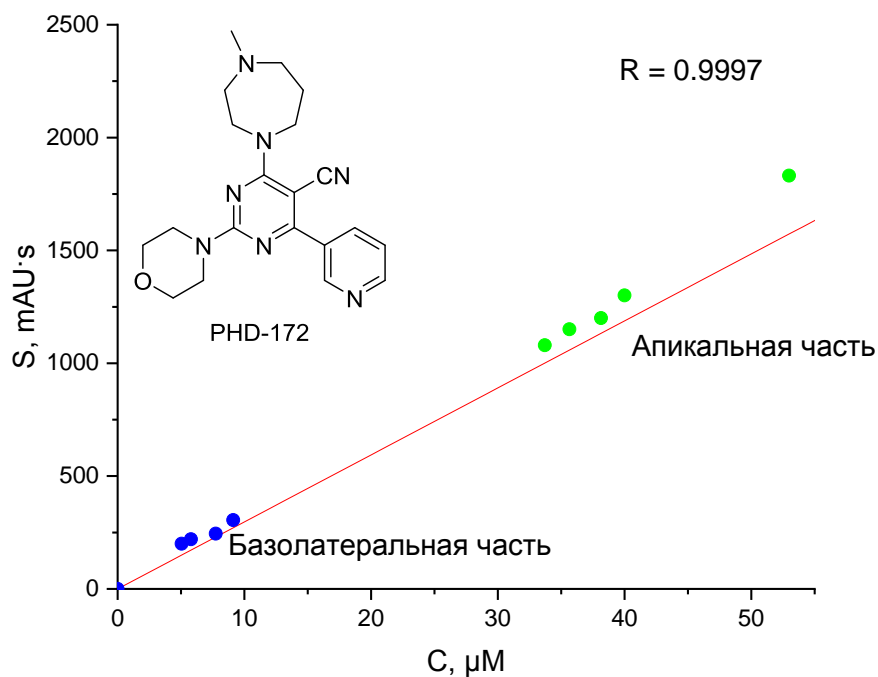


Рисунок 13 - Градуировочный график соединения PHD-172

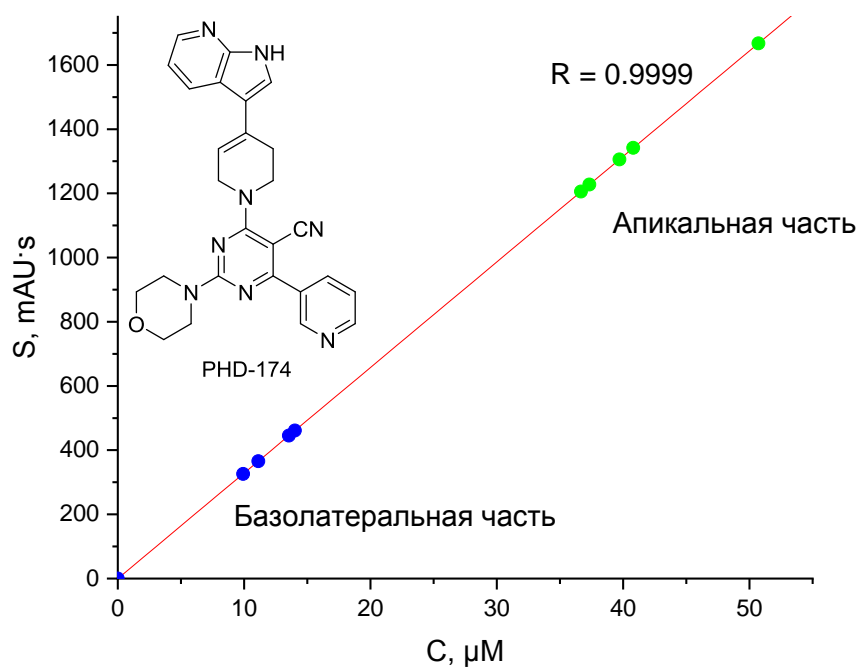


Рисунок 14 - Градуировочный график соединения PHD-174

Зная концентрацию адсорбированного вещества после 90 минут от начала анализа, мы вычислили значение эффективной проницаемости P_{app} :

$$P_{PHD-168} = \frac{6.12 \cdot 10^{-6}}{5400} \frac{1}{0.3 \cdot 54.9 \cdot 10^{-6}} = 68.8 \cdot 10^{-6} \text{ см/с}.$$

$$P_{PHD-169} = \frac{6.00 \cdot 10^{-6}}{5400} \frac{1}{0.3 \cdot 47.5 \cdot 10^{-6}} = 78.0 \cdot 10^{-6} \text{ см/с}.$$

$$P_{PHD-172} = \frac{7.75 \cdot 10^{-6}}{5400} \frac{1}{0.3 \cdot 53.0 \cdot 10^{-6}} = 90.2 \cdot 10^{-6} \text{ см/с}.$$

$$P_{PHD-174} = \frac{1.06 \cdot 10^{-5}}{5400} \frac{1}{0.3 \cdot 47.9 \cdot 10^{-5}} = 136.6 \cdot 10^{-6} \text{ см/с}.$$

По полученным данным можно сделать вывод, что все полученные соединения обладают высокой клеточной проницаемостью.

Как видно из литературного обзора, большинство ингибиторов киназ на данный момент находятся на стадии клинических испытаний. Они обладают высокой ингибирующей активностью в наномолярных диапазонах и высокой клеточной проницаемостью. Низкие результаты анализа клеточной проницаемости исследователи связывают с высокой полярной площадью поверхности молекулы tPSA. Он является некоторым дескриптором, который хорошо коррелирует с пассивным молекулярным транспортом через мембраны и, следовательно, позволяет предсказывать транспортные свойства лекарств [27].

Также на клеточную проницаемость влияет коэффициент гидрофобности соединения $\log P$. $\log P$ – коэффициент распределения вещества между полярными и неполярными растворителями, чаще всего октанол-вода. Коэффициент распределения $\log P$ напрямую зависит от наличия полярных или неполярных групп в исходной молекуле – чем больше полярных групп, тем меньше его растворимость в липидах и, соответственно, пониженная проницаемость через клеточные мембраны [28].

В целом, можно сделать вывод, что полученные результаты клеточной проницаемости наших соединений согласуются с литературными данными.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Реагенты использовались коммерчески доступные, без дополнительной очистки, если не указано иное.

1. Жидкостный хроматограф фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC.
2. Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (100x4.6 мм), с размером частиц 5 мкм.
3. Микрошприц Agilent объёмом 50 мкл.
4. Ацетонитрил для ОФ ВЭЖХ, 99.9%.
5. Фосфатный буфер, pH 2.25.
6. Среда DMEM/F12, дополненная фетальной бычьей сывороткой (20%), глутамином, пенициллином, стрептомицином и амфотерицином В.
7. Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), содержащий 1.0 mM MgCl₂, 1.0 mM CaCl₂, 10 mM D(+)-глюкозы и 20 mM HEPES (pH 7.4).

3.2 Объекты исследования

В качестве объектов исследования выступают производные 5-цианопиримидинов, синтезированные сотрудниками научно-исследовательской лаборатории Центра Медицинской Химии «Функциональные Гетероциклические Соединения». На рисунке 15 приведены структурные формулы изучаемых соединений и их лабораторные шифры.

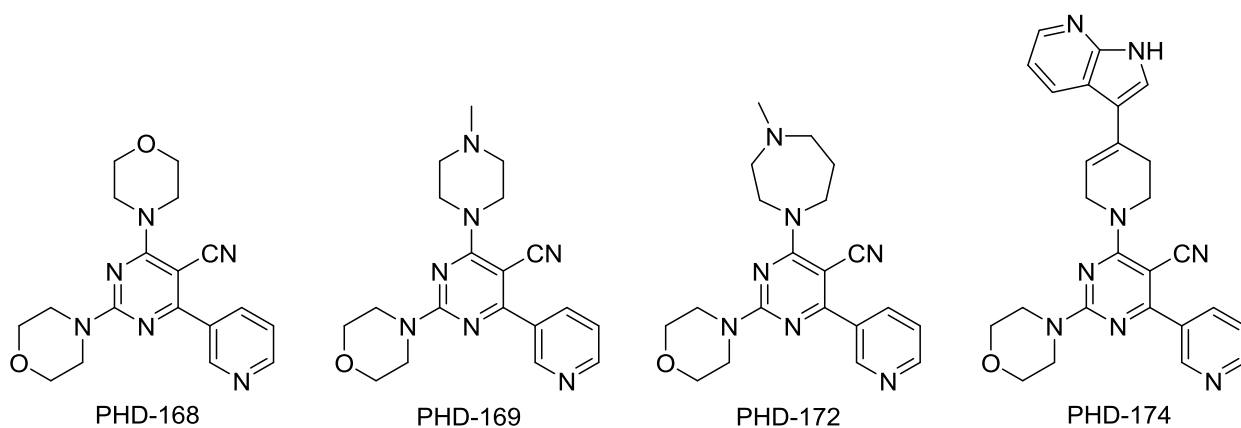


Рисунок 15 - Серия изучаемых соединений

3.2.1 Синтез целевых соединений

Синтез исследуемых соединений производился по схеме 8:

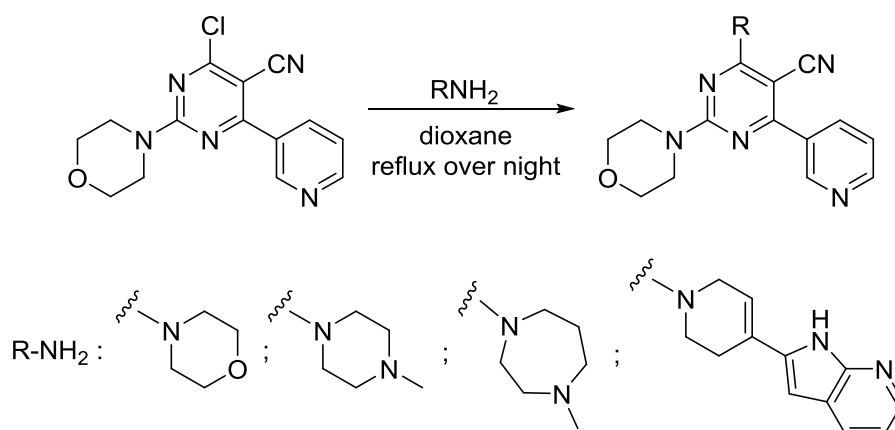


Схема 8 - Синтез целевых соединений

3.3 Биологические испытания

3.3.1 Культивирование клеток CaCO-2

Клетки колоректальной аденокарциномы человека CaCO-2 культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco) дополненной эмбриональной бычьей сывороткой (20%), глютамином, пенициллином, стрептомицином и амфотерицином В при 37°C и 5% концентрации углекислого газа.

3.3.2 Исследование проницаемости

Клетки линии CaCO-2 высевали на мембранные вставки ПЭТ высокой плотности (размер пор 8 мкм, площадь поверхности 0.3 см²) при плотности 75000 клеток/см². Через 21 день во вставки с клетками добавляли исследуемые препараты, приготовленные из рабочих стоков *in situ* с концентрацией 50 мкмоль/л. Отбор проб производился с апикальной и базолатеральной частей с интервалом в 30 минут.

3.4 Методика эксперимента

Определение концентрации проникающего соединения проводили на жидкостном хроматографе фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC с хроматографической колонкой (неподвижная фаза) ZORBAX Eclipse Plus C18 100x4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. В качестве элюента (подвижной фазы) использовали смесь ацетонитрил – фосфатный буфер в соотношении 80:20 об. %.

В качестве сорбатов были использованы производные 5-цианопиримидинов, пробы были приготовлены растворением соединений в диметилсульфоксиде и добавлением буфера для анализа проницаемости (РАВ).

Опыты проводили при комнатной температуре, расход элюента составляет 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волн УФ – детектора, равной 247-259 нм, что соответствует длинам волн максимумов поглощения соответствующих производных.

По экспериментальным данным был построен градуировочный график зависимости известной концентрации вещества от интегральной площади пика. Концентрация каждого неизвестного образца определялась с использованием полученной ранее градуировочной прямой. Далее был проведен расчет эффективной проницаемости P_{app} исследуемых объектов.

3.5 Определение эффективной проницаемости

Эффективная проницаемость была рассчитана по формуле:

$$P_{app} = \frac{dC}{dt} \frac{V}{A \cdot C_0}$$

где dC/dt – скорость изменения концентрации исследуемого соединения в одной из частей, моль/с; V – объем взятой пробы, мл; A – площадь поверхности клеточного монослоя, см², C_0 – концентрация исследуемого соединения в одной из частей до начала адсорбции, моль.

Оценка полученных результатов была проведена в соответствии с таблицей 18.

Таблица 18 - Критерии оценивания клеточной проницаемости

Уровень проницаемости	Численное значение, $\times 10^6$ см/с	Процентное соотношение, %
Высокая	>10	70-100
Умеренная	~2-10	20-70
Низкая	< 2	0-20

Заключение

В ходе настоящего исследования были достигнуты поставленные цели и задачи:

1. Проанализирована литература по теме, указаны актуальные в настоящее время способы измерения ADMET характеристик. Большинство ингибиторов PI3K киназ в настоящее время находятся на стадии доклинических и клинических испытаний. Они обладают высокой ингибирующей активностью в наномолярных диапазонах и высокой клеточной проницаемостью. Большинство ингибиторов всех изоформ PI3K I класса содержат пиримидиновые и бензопиримидиновые скаффолды и их аналоги;
2. Отработана стандартная методика анализа клеточной проницаемости на модели CaCO-2, в частности ее хроматографическая часть. Согласно этой методике, клетки линии CaCO-2 высевали на мембранные вставки ПЭТ при плотности 75000 клеток/см². Концентрация исследуемых препаратов в апикальной и базолатеральной частях контролировалась методом ОФ ВЭЖХ. Для количественного анализа был выбран метод абсолютной градуировки. Для исследованных в работе 5-цианопиримидинов получены градуировочные зависимости с высокими коэффициентами корреляций;
3. Для рассмотренных 5-цианопиримидинов по данным проведенного эксперимента рассчитана эффективная проницаемость. Данная ADMET-характеристика является важной для перорального пути введения лекарственных средств. Все исследуемые пиримидиновые производные обладают высокой проницаемостью в диапазоне $68.8 \cdot 10^{-6}$ - $136.6 \cdot 10^{-6}$ см/с, следовательно, могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования их возможного применения в качестве ингибиторов киназ.

Список используемой литературы

1. Chen, H. Compound Properties and their Influence on Drug Quality / H. Chen, O. Engkvist, T. Kogej // *The Practice of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 4 – P. 379–393.
2. Gleeson, M.P. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb / M.P. Gleeson // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 51 – P. 817–834.
3. Koziolok, M. Simulating the Postprandial Stomach: Biorelevant Test Methods for the Estimation of Intragastric Drug Dissolution / M. Koziolok, G. Garbacz, M. Neumann, W. Weitschies // *Mol. Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 10 – P. 2211-2221.
4. Cascone, S. The influence of dissolution conditions on the drug ADME phenomena / S. Cascone, G. Lamberti, F. De Santis, G. Titomanlio // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2011 – Vol. 79 – P. 382-391.
5. Gastrointestinal behavior and ADME phenomena: II. *In silico* Simulation / G. Lamberti, S. Cascone, F. Marra et al. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 35 – P. 165-171.
6. Шохин, И.Е. Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости *in vitro* – монослой эпителиальных клеток CaCO-2 / И.Е. Шохин, Ю.И. Кулинич, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес // *Биомедицина*. – 2012. – Т.1, № 3. – С. 91-97.
7. Lennernas, H. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells *in vitro* and human jejunum *in vivo* / H. Lennernas, K. Palm, U. Fagerholm, P. Artursson // *Int. J. Pharm.* – 1996. – Vol. 127 – P. 103-107.
8. Guidance for Industry. Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S., Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) – December 2017.

9. Sundby, E. *In vitro* baselining of new pyrrolopyrimidine EGFR-TK inhibitors with Erlotinib / E. Sundby, J. Han, S.J. Kaspersen, B.H. Hoff // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 80. – P. 56-65.
10. Bergström, C.A.S. Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds / C.A.S. Bergström, W.N. Charman, C.J.H. Porter // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2016. – Vol. 101. – P. 6-21.
11. Bharate, S.S. Thermodynamic equilibrium solubility measurements in simulated fluids by 96-well plate method in early drug discovery / S.S. Bharate, R.A. Vishwakarma // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 25, № 7. – P. 1561-1567.
12. Chandrasekaran, B. Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties / B. Chandrasekaran, S. N. Abed, O. Al-Attraqchi, K. Kuche, R. K. Tekade – Amsterdam: Elsevier Inc., 2018 – P. 810
13. Testa, B. Predicting Drug Metabolism – An Evaluation of the Expert System METEOR / B. Testa, A.-L. Balmat, A. Long, P. Judson // *Chem. Biodivers.* – 2005. – Vol. 2, № 7. – P. 872–885.
14. Identification of 4,5-Dihydro-1*H*-pyrazolo[4,3-*h*]quinazoline Derivatives as a New Class of Orally and Selective Polo-Like Kinase 1 Inhibitors / I. Beria, D. Ballinari, J.A. Bertrand et al. // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53, № 9. – P. 3532-3551.
15. Toropov, A.A. Comprehension of drug toxicity: Software and databases / A.A. Toropov, A.P. Toropova, I. Raska Jr, D. Leszczynska, J. Leszczynski // *Comput. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 45. – P. 20–25.
16. Chemical toxicity prediction for major classes of industrial chemicals: Is it possible to develop universal models covering cosmetics, drugs, and pesticides? / V.M. Alves, E.N. Muratov, A. Zakharov et al. // *Food Chem. Toxicol.* – 2018. – Vol. 112. – P. 526-534.
17. Research advances on selective phosphatidylinositol 3 kinase δ (PI3K δ) inhibitors / J. Sun, Y. Feng, Y. Huang et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 30, № 19. – Art. 127457.

18. The Design and Identification of Brain Penetrant Inhibitors of Phosphoinositide 3-Kinase α / T.P. Heffron, L.Salpathi, B. Alicke et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55, № 18. – P. 8007-8020.
19. Discovery and Optimization of Pyrimidone Indoline Amide PI3K β Inhibitors for the Treatment of Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN)-Deficient Cancers / V. Certal, J.-C. Carry, F. Halley et al. // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, №3. – P. 903–920.
20. Novel antiproliferative agents bearing morpholinopyrimidine scaffold as PI3K inhibitors and apoptosis inducers; design, synthesis and molecular docking / A.A. Helwa, N.M. El-Dydamony, R.A. Radwan et al. // *J. Bioorg. Chem.* – 2020. – Vol. 102. – Art. 104051.
21. Discovery of CDZ173 (Leniolisib), Representing a Structurally Novel Class of PI3K Delta-Selective Inhibitors / K. Hoegenauer, N. Soldermann, F. Zecri et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 8, № 9. – P. 975-980.
22. Discovery of novel pyrrolidineoxy-substituted heteroaromatics as potent and selective PI3K delta inhibitors with improved physicochemical properties / K. Hoegenauer, N. Soldermann, C. Hebach et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 26, № 23. – P. 5657-5662.
23. Discovery of Novel PI3-Kinase δ Specific Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: Taming CYP3A4 Time-Dependent Inhibition / B.S. Safina, S. Baker, M. Baumgardner et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55, № 12. – P. 5887-5900.
24. Discovery of a Novel Series of Thienopyrimidine as Highly Potent and Selective PI3K Inhibitors / F. Han, S. Lin, P. Liu et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 6, № 4. – P. 434-438.
25. Discovery of phosphoinositide 3-kinases (PI3K) p110 β isoform inhibitor 4-[2-hydroxyethyl(1-naphthylmethyl)amino]-6-[(2S)-2-methylmorpholin-4-yl]-1H-pyrimidin-2-one, an effective antithrombotic agent without associated bleeding and insulin resistance / F. Giordanetto, A. Wallberg, S. Chosal et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – Vol. 22, № 21. – P. 6671-6676.

26. Discovery of Highly Isoform Selective Orally Bioavailable Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)- γ Inhibitors / N. Pemberton, M. Mogemark, S. Arlbrandt et al. // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61, № 12. – P. 5435-5441.

27. Ertl, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties / P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43. – P. 3714-3717.

28. Matthew, L. LogD Contributions of Substituents Commonly Used in Medicinal Chemistry / L. Matthew, L.J. Crawford, J.J. Crawford // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 11. – P. 72-76.