

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 Определение липофильности ингибиторов РІЗК

Студент

А.М. Попова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

к.б.н., профессор, Д.А. Хоченков

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

Консультанты

к.х.н., доцент, О.Б. Григорьева

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

И.Ю. Усатова

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

Тольятти 2021

Аннотация

Данная исследовательская работа изложена на 51 страницах, содержит 20 рисунков, 14 таблиц. В ходе литературной проработки был изучен 61 литературный источник.

Объектами исследования в работе являются замещенные 5-цианопиримидины, которые могут обладать различной биологической активностью, в том числе они могут быть использованы в качестве ингибиторов киназ. В связи с пероральным способом приема, важной характеристикой при разработке ингибиторов является значение липофильности.

В литературном обзоре рассмотрено понятие липофильности как одной из составляющих правил Липинского. Обобщены основные методы экспериментального определения липофильности, а также рассмотрен принцип использования правил Липинского в дизайне ингибиторов киназ.

В экспериментальной части описаны методики проведенных экспериментальных и расчетных исследований.

Для исследуемых производных 5-цианопиримидинов были экспериментально определены значения липофильности с использованием метода ВЭЖХ.

Abstract

The title of the graduation work is «Determination of lipophilicity of inhibitors PI3K».

The graduation work consists of an explanatory note on 51 pages, introduction, including 20 figures, 14 tables, the list of 61 references, all of which are foreign sources.

The objects of research in this work are substituted 5-cyanopyrimidines, which can have various biological activities. They can be used as inhibitors of kinases. An important characteristic in the development of inhibitors is the importance of lipophilicity.

The literature review considers the concept of lipophilicity as one of the components of Lipinski's rules. The main methods for the experimental determination of lipophilicity are summarized, and the principle of using Lipinski's rules in the design of kinase inhibitors are considered.

The experimental part describes the methods of the experimental and computational studies.

In conclusion for the investigated substituted 5-cyanopyrimidines, the lipophilicity values were calculated using the HPLC method.

Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор.....	8
1.1 Понятие липофильности.....	8
1.2 Правила Липинского в дизайне ингибиторов киназ.....	9
1.3 Влияние липофильности на ADMET характеристики.....	18
1.4 Методы определения липофильности.....	21
1.4.1 Метод «встряхивания».....	21
1.4.2 Метод титрования.....	23
1.4.3 Хроматографические методы.....	23
2 Обсуждение результатов.....	30
3 Экспериментальная часть.....	39
3.1 Реагенты и оборудование.....	39
3.2 Объекты исследования.....	39
3.3 Методика проведения эксперимента.....	41
3.4 Определение значения фактора удерживания.....	41
Заключение.....	43
Список используемой литературы.....	45

Перечень условных сокращений

В настоящей работе используются следующие сокращения и термины:

ADMET	адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ-ТСХ	тонкослойная хроматография с обращенной фазой
ЦНС	центральная нервная система

Введение

Открытие лекарств – важный шаг в разработке новых лекарственных препаратов. Обычная процедура начинается с рассмотрения большого количества новых потенциальных молекул, которые тестируют против биохимических мишеней и выбирают те, которые проявляют значительную активность и могут рассматриваться как кандидаты для дальнейшей разработки.

Протеинкиназы составляют одно из крупнейших семейств белков в геноме человека, состоящее более чем из 500 представителей [1]. Их строго контролируемая каталитическая активность играет решающую роль в регуляции передачи сигналов в клетках. Передача сигнала через протеинкиназные каскады играет ключевую роль в процессах жизнедеятельности как здоровых клеток, так и раковых. Изменение функций киназ из-за мутаций или сверхэкспрессия часто приводит к развитию широкого спектра заболеваний. Поэтому в настоящее время многие исследователи нацелены на разработку программ синтеза ингибиторов киназ [2].

Например, большим противораковым потенциалом обладают ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) [3-6]. Эти низкомолекулярные соединения вмешиваются в ключевой для развития раковой опухоли путь, который помогает злокачественным клеткам выживать и пролиферировать. За последнее время было предпринято много попыток создания эффективного и безопасного ингибитора PI3K. На фармацевтическом рынке на данный момент присутствуют три представителя этого класса: Иделалисиб, Копанлисиб и Алпелисиб. Поэтому в настоящее время стратегическим направлением в терапии рака стала разработка ингибиторов киназ, в частности PI3K.

При молекулярном докинге изучаемых молекул основным правилом для выбора «молекулы-хита» является соответствие правилу Липинского

(правило пяти). Если молекула полностью соответствует указанному выше правилу, то, почти со стопроцентной вероятностью, такое соединение будет выступать в роли эффективного лекарства.

Цель работы: определение экспериментальных значений липофильности впервые синтезированных ингибиторов РІЗК киназ в структурном ряду производных 5-цианопиримидина.

Задачи работы:

- Ознакомиться с правилами Липинского и их физико-химическим обоснованием.
- Установить применимость правил в дизайне ингибиторов киназ.
- В ходе ряда экспериментов определить факторы удерживания соединений, взятых в качестве стандарта.
- Вывести основные уравнения для расчета липофильности изучаемых производных 5-цианопиримидинов и рассчитать ее значения.

1 Литературный обзор

1.1 Понятие липофильности

В химии термин липофильность означает сродство молекулы или ее фрагмента к липофильной среде. Липофильность относится к способности химического соединения растворяться в жирах, маслах, липидах и неполярных растворителях. На молекулярном уровне липофильность лекарственного средства влияет на его транспорт через мембраны липидных клеток, а также на взаимодействие лекарственного средства с целевым белком. Важность данного параметра в фармакологии известна уже более века. Рише наблюдал, что токсичность простых эфиров, спиртов и кетонов обратно пропорциональна их растворимости в воде. В 1899 г. Овертон и Мейер независимо друг от друга обнаружили, что для многих соединений анестезиологическая активность коррелирует с коэффициентами разделения масло/вода [7]. Затем Годет и Броди исследовали зависимость между коэффициентами разделения в среде гептан-вода и скоростью проникновения лекарства через гематоэнцефалический барьер [8].

Исследования липофильности были систематизированы в работах Ганча, Фуджиты и Лео. Они связали липофильность с возможностью лекарственного средства получить доступ к месту действия [9].

Для количественной оценки липофильности в качестве эталонной системы они использовали *n*-октанол-вода. На основе этой системы построены эмпирические шкалы для коэффициентов распределения. С тех пор коэффициент распределения в системе *n*-октанол-вода в его логарифмической форме ($\log P$) стал характерной константой для химического вещества и наиболее часто используемым параметром в исследованиях QSAR [10]. В двухфазной системе *n*-октанол/вода логарифм отношения выразится следующим образом (уравнение 1):

$$\log P = \log \left(\frac{C(x)_{\text{октанол}}}{C(x)_{\text{вода}}} \right), \quad (1)$$

где $C(x)_{\text{октанол}}$ – концентрация растворенного вещества в октанол, мг/мл;

$C(x)_{\text{вода}}$ – концентрация растворенного вещества в воде, мг/мл.

Следует отметить, что $\log(P)$ относится к нейтральным соединениям. Для ионизируемых веществ используется коэффициент распределения $\log D$, который зависит от pH среды. Значение $\log D$ определяется как логарифм отношения суммы экспериментально измеренных концентраций различных форм растворенного вещества в одном растворителе к сумме концентраций его форм в другом растворителе и его можно выразить следующим образом (уравнение 2) [4]:

$$\log D_{\text{октанол/вода}} = \log \left(\frac{C(x)_{\text{октанол}}^{\text{ионизир}} + C(x)_{\text{октанол}}^{\text{неионизир}}}{C(x)_{\text{вода}}^{\text{ионизир}} + C(x)_{\text{вода}}^{\text{неионизир}}} \right), \quad (2)$$

где $C(x)_{\text{октанол}}^{\text{ионизир}}$ и $C(x)_{\text{октанол}}^{\text{неионизир}}$ – концентрация растворенного вещества в октанол, в ионизированной и неионизированной форме соответственно;

$C(x)_{\text{вода}}^{\text{ионизир}}$ и $C(x)_{\text{вода}}^{\text{неионизир}}$ – концентрация растворенного вещества в воде, в ионизированной и неионизированной форме соответственно.

Для лекарственного средства очень важно подобрать оптимальное значение липофильности. Слишком высокие показатели липофильности связаны с нежелательными свойствами лекарственного средства, например, такими как обширный и непредсказуемый метаболизм, высокое связывание или накопление белков плазмы в тканях [11].

1.2 Правила Липинского в дизайне ингибиторов киназ

Верхние пределы значений $\log(P)$ были предложены Липинским. Липофильность является одним из факторов, включенных в правило пяти, сформулированным Липинским в 1997 году [12], [13]. Это мнемонический

инструмент для фармакологов, используемый для быстрой оценки соединений во время открытия лекарственного средства и для определения вероятности проявления хорошей растворимости и проницаемости. Правило пяти, которое было получено на основе базы данных кандидатов, проходящих клинические испытания II фазы или далее, гласит, что плохая абсорбция или проницаемость кандидата в препараты более вероятна, когда $\log P > 5$; молекулярная масса > 500 дальтон (Да); количество доноров водородной связи (-ОН и -NH) > 5 и количество акцепторов водородной связи (атомы O и N) > 10 . Позднее были введены дополнения — площадь полярной поверхности молекулы не должна превышать 120–140 квадратных ангстремов, чтобы быть достаточно липофильной для прохождения в кровь через пассивную стадию абсорбции в малом кишечнике.

Поскольку мутации, сверхэкспрессия и нарушение регуляции протеинкиназ играют важную роль в патогенезе многих заболеваний, это семейство ферментов стало одной из наиболее важных мишеней для лекарств за последние 20 лет. FDA одобрило 48 низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназы, почти все из которых эффективны при пероральном приеме. Правила Липинского используются для оценки эффективности ингибиторов киназ [14].

Карлес и соавторы разработали базу данных, состоящую из 180 ингибиторов протеинкиназ. Они проверили соответствие каждого ингибитора правилам Липинского. 56% соединений полностью соответствуют всем условиям Липинского, почти треть соединений (28%) нарушают одно правило и 16% ингибиторов нарушают два правила. Обнаружено, что большинство нежелательных соединений превышают границы «правила пяти» с точки зрения их молекулярной массы и коэффициента распределения. Фактически, высокий молекулярный вес и липофильность часто наблюдаются у ингибиторов типа II, химическая структура которых удлинена по сравнению с ингибиторами типа I. Это требуется при разработке ингибиторов типа II, которые распространяются на гидрофобный задний

карман киназы и взаимодействуют внутри нее, но за счет более высокой молекулярной массы. Интересно, что только одно соединение, Барасертиб, пролекарство активного соединения, содержит пять донорных атомов и, таким образом, не нарушает правил Липинского [15].

Фосфоинозитидные 3-киназы (PI3Ks) являются липидкиназами, ответственными за превращение 4,5-фосфатидилинозитол-бисфосфата (PIP2) в 3,4,5-фосфатидилинозитол-трисфосфат (PIP3). Так же они являются ключевыми компонентами пути PI3K/Akt/mTOR, которые играют существенную роль в различных клеточных активностях - пролиферации, уклонении от апоптоза и другие функции [16].

Yin с коллегами сообщили об открытии 28 производных 6,7-дигидробензо[*f*]бензо[4,5]имидазо[1,2-*d*][1,4]оксазепина. По результатам биохимических анализов наиболее активным оказалось соединение **1** (рисунок 1).

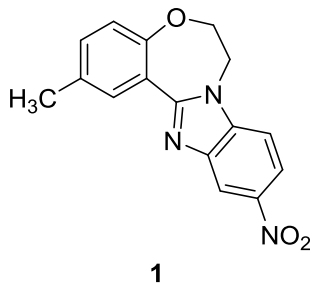


Рисунок 1 - Химическое строение ингибитора PI3K

Данное соединение было проверено на соответствия правилам Липинского. Они включают коэффициент распределения октанол/вода ($\log P$), молекулярную массу (MW), число доноров водородных связей (HBD), число акцепторов водородных связей (HBA). Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Молекулярные параметры соединения **1**

Comp.	Молекулярные параметры							
	MW, [г/моль]	logP	HBA	HBD	IC ₅₀ . [нмоль]			
					PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
1	295.29	3.66	2	0	16	184	9443	34624

Исходя из табличных данных видно, что соединение **1** хорошо согласуется с правилами Липинского. Также оно было неактивно для PI3K γ и PI3K δ , но проявляло селективность для PI3K α . Таким образом, соединение **1** имеет большие возможности в качестве нового селективного ингибитора PI3K α для лечения рака [17].

В своей работе Pemberton с коллегами описали открытие и оптимизацию новых селективных ингибиторов PI3K γ .

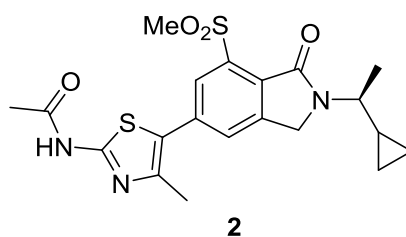


Рисунок 2 - Химическое строение производного 1-оксоизоиндола **2**

Они так же оценили фармакокинетические свойства (таблица 2).

Таблица 2 – Молекулярные параметры соединения **2**

Comp.	Молекулярные параметры		IC ₅₀ . [мкмоль]				Растворимость, [мкмоль]	
	MW, [г/моль]	logP	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ	pH 7.4	pH 6.5
			2	431	2.4	5.1	<4.5	8.1

Полученное соединение обладает хорошей кинетической растворимостью и при измерении термодинамической растворимости при pH 6.5 по-прежнему оставалось растворимым. На основе этих данных оно было идентифицировано как соединение с хорошим профилем для перорального введения и было выбрано для дальнейшего профилирования [18].

Giordanetto с соавторами открыли мощный селективный ингибитор PI3K β **3** (рисунок 3).

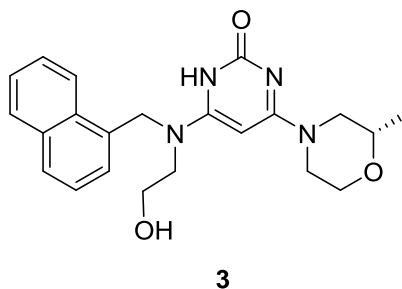


Рисунок 3 - Химическое строение производного пиримидин-2(1*H*)-она **3**

Полученное соединение было оценено на ингибирующую активность и показатель растворимости (таблица 3).

Таблица 3 – Молекулярные параметры соединения **3**

Comp.	Молекулярные параметры		IC ₅₀ , [мкмоль]			
	MW, [г/моль]	logP	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
3	392	1.9	27.2	0.038	97.4	0.168

Из полученных данных видно, что данное соединение является мощным ингибитором изоформы PI3K β с высокой селективностью по отношению к PI3K α (>700 раз) [19].

Cheng с коллегами получили соединение **5** путем оптимизации соединения **4**, находящегося на стадии I/II клинических испытаний в качестве противоопухолевого агента (рисунок 4).

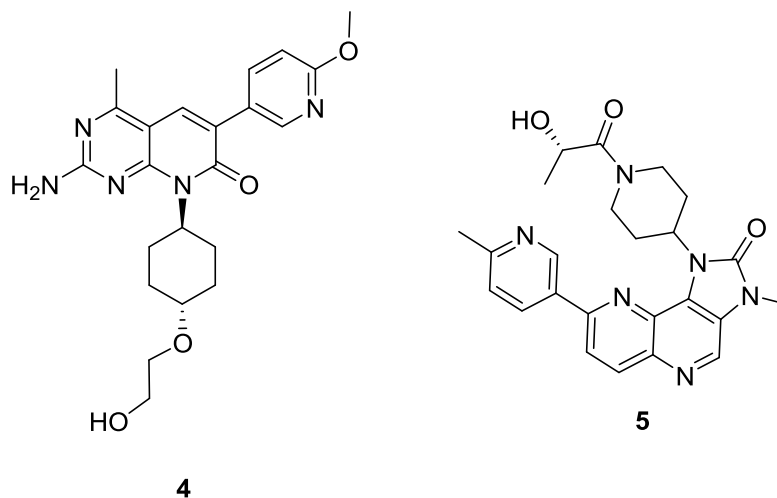


Рисунок 4 - Химическое строение соединений **4** и **5**

Соединение **5** было также проверено на молекулярные параметры и фармакокинетические свойства (таблица 4).

Таблица 4 – Молекулярные параметры соединения **5**

Соед.	Молекулярные параметры		Р13Ka, IC ₅₀ , [нмоль]	Растворимость, [мкмоль]
	MW, [г/моль]	logP		
5	444	1.27	0.299	539

Соединение **5** продемонстрировало оптимальные общие свойства, включая мощную ингибирующую активность и очень хорошую растворимость [20].

Хан с коллегами разработали соединение **6**. Его характеристики описаны в таблице 5.

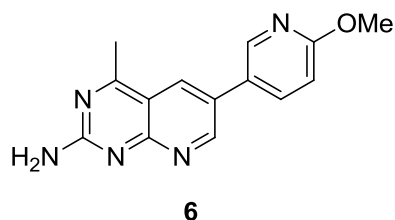


Рисунок 5 - Химическое строение соединения **6**

Таблица 5 – Молекулярные параметры соединения **6**

Соед.	Молекулярные параметры		PI3K α , IC ₅₀ , [мкмоль]
	MW, [г/моль]	logP	
6	267	1.83	0.414

Соединение **6** из нового ряда аминопиридопиримидинов может служить хорошим химическим каркасом для дальнейшей оптимизации [21].

Ле и соавторы разработали соединение **7** (рисунок 6).

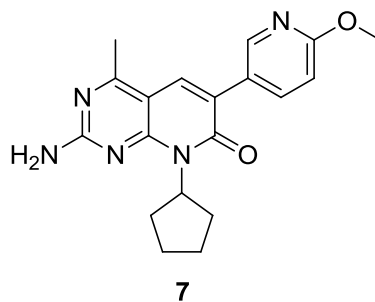


Рисунок 6 - Химическое строение соединения **7**

Соединение **7** проявляло сильную активность против PI3K α и mTOR, а также хорошую селективность и устойчивые ADMET характеристики. В исследованиях *in vivo* соединение **7** продемонстрировало хорошую биодоступность при пероральном введении [22]. Характеристики соединения **7** представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Молекулярные параметры соединения 7

Comp.	Молекулярные параметры		PI3K α , Ki [нМ]	Растворимость, [мкмоль]
	MW, [г/моль]	logD		
7	351	2.63	1.56	3.94

Янг и коллеги разработали соединение **8**, структура которого представлена на рисунке 7.

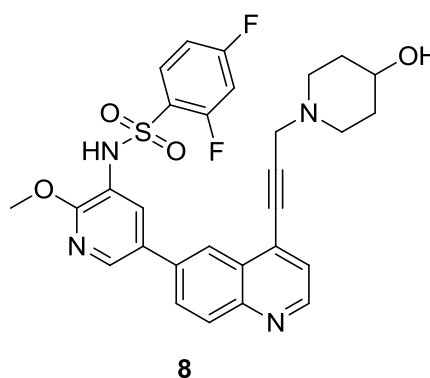


Рисунок 7 - Химическое строение соединения **8**

Соединение **8** продемонстрировало сильную ингибирующую активность против PI3K α и mTOR [23]. Полученные характеристики представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Молекулярные параметры соединения **8**

Comp.	Молекулярные параметры		PI3K α , IC ₅₀ , [нмоль]
	MW, [г/моль]	clogP	
8	564	3.58	1.63

В последнее время PI3K рассматриваются как многообещающие мишени для лечения рака. Коули и соавторы в своей работе синтезировали новые ингибиторы киназ на основе производных бензофурана [24]. Чтобы понять способ ингибирования PI3K α вновь синтезированными соединениями

требовалось провести молекулярное моделирование. Наиболее активные синтезированные соединения **9**, **10** и **11** представлены на рисунке 8.

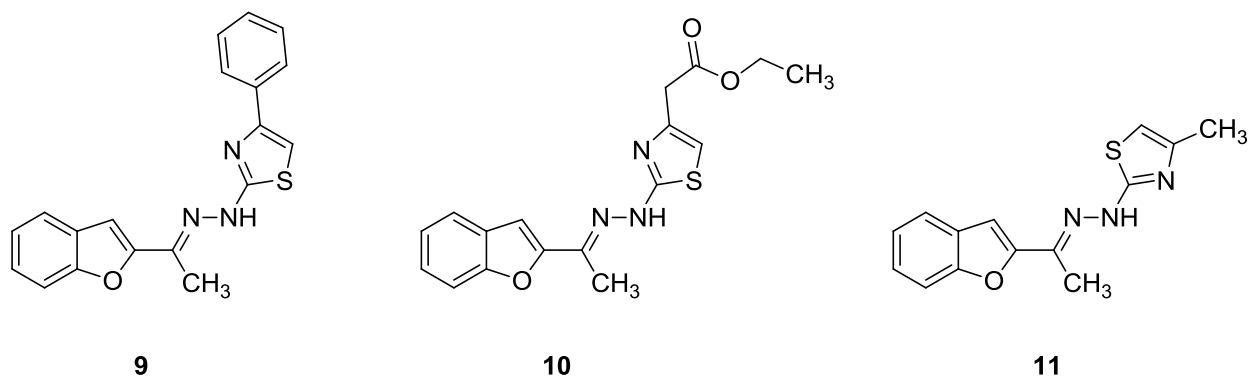


Рисунок 8 – Производные бензофурана, которые могут использоваться в качестве ингибиторов Р13К

Показанные соединения были протестированы на соответствие правилу Липинского (таблица 8). Активность данных веществ сравнивали с активностью этанола (Алпелисиб). Результаты показали, что синтезированные соединения соответствуют правилу Липински, как и алпелисиб, предполагая, что эти соединения будут обладать характеристиками лекарственного сходства.

Эксперименты по растворению синтезированных веществ в воде показали, что все соединения имеют в основном аналогичную растворимость с Алпелисибом, однако было установлено, что синтезированные производные бензофурана **9**, **10** и **11** имеют более высокую абсорбцию в желудочно-кишечном тракте, чем абсорбция Алпелисиба.

Таблица 8 – Соответствие правилу Липинского для соединений 9, 10 и 11.

Соединение	Log[S] ^a	MW ^b г/моль	Log[P] ^c	nRB ^d	nHBA ^e	nHBD ^f	Нарушения ^g
9	-5.74	333.41	4.42	4	3	1	0
10	-4.49	343.40	3.27	7	5	1	0
11	-4.55	271.34	3.40	3	3	1	0
Алпелисиб	-4.42	441.50	2.95	4	8	2	0

^aПараметр растворимости

^bМолекулярная масса

^cПараметр липофильности

^dКоличество вращающихся связей

^eКоличество акцепторов водородных связей

^fКоличество доноров водородных связей

^gКоличество нарушений правил Липинского

1.3 Влияние липофильности на ADMET характеристики

Известно, что абсорбция является одной из ADMET характеристик. Растворимость имеет решающее значение для абсорбции и последующей биодоступности лекарственного средства. Растворимость зависит от липофильности (log). Было установлено, что для большинства молекул уменьшение logP приводит к увеличению растворимости соединения [25]. Проницаемость мембран также является основным фактором, определяющим фармакокинетическое поведение, в частности, для абсорбции, распределения и выведения лекарств [26]. Взаимосвязь между проницаемостью и липофильностью была установлена в многочисленных исследованиях проницаемости с использованием различных типов лекарственных соединений с различными биологическими мембранами. Эти исследования продемонстрировали, что существует линейная [27], билинейная [27], сигмоидальная [28], [29], гиперболическая [30] отношения между

проницаемостью и липофильностью, однако, взятые вместе это означает, что более низкая проницаемость коррелирует с более низкой липофильностью [7].

Липофильность важна для определения распределения лекарственного средства *in vivo*. Объем распределения, также известный как кажущийся объем распределения, является мерой, используемой для количественной оценки распределения лекарственного средства между плазмой и остальной частью тела. При рассмотрении объема распределения лекарственного средства важно понимать способность лекарственного средства специфически или неспецифично связываться с различными белками или тканями, поскольку только свободное лекарственное средство доступно для распределения по организму. Основываясь на этом понимании, способность лекарственного средства связываться с белками плазмы, особенно с сывороточным альбумином и *альфа*-кислотным гликопротеином, влияет на измерение объема распределения [31]. Повышение липофильности обычно приводит к усилению связывания с белками, поскольку гидрофобные силы управляют взаимодействием с белками плазмы. Кислые соединения имеют более высокое связывание с белками по сравнению с основными и нейтральными молекулами [32]. Основные соединения имеют тенденцию проявлять высокое сродство к *альфа*-кислотным гликопротеинам из-за электростатического взаимодействия с кислотными остатками [33]. Распространение (проникновение) лекарств в центральную нервную систему представляет собой особый случай, поскольку ЦНС находится за гематоэнцефалическим барьером. Гематоэнцефалический барьер состоит из эндотелиальных клеток капилляров головного мозга со стенками сосудов, соединенных плотными контактами, и которые содержат насосы оттока, такие как *p*-гликопротеин, которые удерживают второстепенные молекулы вне мозга и поэтому имеют ограниченную проницаемость [34]. В общем, пассивное проникновение небольших высоколипофильных соединений может происходить через мембраны клеток, составляющих

гематоэнцефалический барьер, и увеличение липофильности, вероятно, увеличивает проникновение в гематоэнцефалический барьер. Таким образом, на протяжении многих лет учет липофильности в значительной степени основывался на разработке лекарств для воздействия на ЦНС.

В метаболизме и последующем клиренсе лекарств *in vivo* участвует множество ферментов и тканей, в том числе печеночная, почечная и желчная системы, и этот параметр ADMET считается наиболее трудным для прогнозирования. В нескольких исследованиях предпринимались попытки определить оптимальную липофильность для прогнозирования этого параметра, и в целом снижение липофильности часто считается допустимым для достижения пониженного метаболического клиренса [35]. Эта стратегия согласуется со сценарием *in vivo*, где в целом метаболизм превращает липофилитические препараты в более полярные метаболиты для облегчения клиренса, и действительно, в нескольких исследованиях было показано, что снижение $\log D$ коррелирует с улучшенным почечным клиренсом [36, 37]. Кроме того, аналогичные результаты были получены при анализе скорости клиренса *in vivo* для препаратов, вводимых внутривенно, где более низкие средние значения клиренса также наблюдались при низких значениях $\log P$ [38].

Многочисленные исследования физико-химических свойств соединений показали, что токсичность коррелирует с липофильностью [39]. Исследование фирмы «Pfizer» продемонстрировало, что препараты с $\log P > 3$ в 2,5 раза более токсичны, в то время как препараты с $\log P < 3$ в 2,5 менее токсичны [40]. Лекарственно-индуцированный фосфолипидоз возникает при избыточном накоплении фосфолипидов в клетках, которое может происходить в результате лечения многими катионными амфифильными препаратами, включая антидепрессанты, антиангинальные, противомаларийные и понижающие холестерин агенты [41-43]. Лекарственно-индуцированный фосфолипидоз сильно коррелирует с липофильностью, особенно для основных соединений. При анализе физико-

химические свойства известных препаратов, приводящих к лекарственно-индуцированному фосфолипидозу, было продемонстрировано, что риск увеличивается, если сумма $\log(P)$ и pK_a составляет > 90 [44].

Появляется все больше свидетельств того, что контроль физико-химических свойств, таких как липофильность, в пределах определенного оптимального диапазона может улучшить качество соединения и вероятность терапевтического успеха [45]. Липофильность является важным фактором для поддержания соединений-кандидатов в пределах желаемых параметров ADMET и оказывает специфическое влияние на несколько важных физико-химических свойств, необходимых для достижения желаемой фармакокинетики *in vivo* [45-47]. Таким образом, особое внимание к оптимальной области липофильности, а также мониторинг показателей липофильной эффективности могут существенно повлиять на общее качество лекарственных препаратов-кандидатов на различных этапах открытия.

1.4 Методы определения липофильности

1.4.1 Метод «встряхивания»

Классическим и наиболее надежным методом определения $\log P$ является метод встряхивания [48]. Метод встряхивания состоит из растворения исследуемого образца в смеси предварительно забуференной воды и октанола, взбалтывания до достижения равновесия, тщательного разделения октанольной и водной фаз и измерения концентрации растворенного вещества в каждом растворителе с помощью УФ/видимой спектроскопии. Стандартное измерение во встряхиваемой колбе - длительный и трудоемкий процесс, который позволяет определять $\log P$ в узком диапазоне от -3 до 3 (ограничения аналитических методов, используемых для определения концентрации).

В настоящее время ведется работа по модификации метода встряхивания. Прежде всего, разработка высокопроизводительных методов скрининга новых лекарств приводит к миниатюризации стандартной процедуры встряхивания в колбе. Алелиунас осуществлял измерение липофильности с применением 96-луночной встряхиваемой колбы и фотоионизационной масс-спектрометрии при атмосферном давлении. Метод был протестирован на 72 литературных соединений с различными значениями ионизации [49].

Другой разновидностью классического метода встряхивания колбы является твердофазная микроэкстракция. Суть метода заключается в экстракции, в ходе которой образец разделяется между волокном из плавленого кварца, покрытым полимером, и водной фазой [50].

Также на сегодняшний день эффективным методом определения липофильности является метод встряхивания с детектированием ЖХ-УФ, ЖХ-МС или ЯМР [51].

Следует отметить ряд преимуществ метода встряхивания перед другими методами определения липофильности:

- данный метод позволяет охватить широкий круг веществ (нейтральные и заряженные соединения);
- для определения липофильности данным методом химическая структура соединения не обязательно должна быть известна заранее;
- метод встряхивания дает довольно точные результаты.

Среди основных недостатков метода встряхивания отмечают:

- данный метод определения липофильности занимает значительное количество времени;
- октанол и вода должны быть предварительно смешаны и уравновешены (для уравновешивания требуется не менее 24 ч.);
- перед проведением анализа необходимо достичь полной растворимости анализируемого вещества;

- концентрация по отношению к ультрафиолетовому излучению должна быть линейной по всему диапазону концентрации растворенного вещества.

1.4.2 Метод титрования

Еще одним примером прямого метода определения липофильности является титрование [52]. Титрование является распространенным методом определения pK_a . Модификацию этого метода можно использовать для определения липофильности. Испытуемое соединение сначала титруют путем добавления известных эквивалентов кислоты или основания для получения кривой титрования. Затем титрование повторяют в присутствии определенного количества октанола. Сдвиг кривой титрования получается за счет распределения испытуемого соединения между фазами. Липофильность рассчитывается по сдвигу кривой. К достоинствам метода можно отнести полную автоматизацию, что значительно сокращает время анализа. Но такой метод подходит только для кислотных или основных соединений, требует образцов высокой чистоты и может не подходить для высоколипофильных веществ из-за проблем с растворимостью.

1.4.3 Хроматографические методы

Поскольку на ранних этапах разработки фармацевтических препаратов упор делается на высокопроизводительные измерения, низкое потребление соединений и универсальность методов для работы с различными соединениями, в последние годы были разработаны альтернативные подходы к определению липофильности, направленные на обеспечение более быстрого и удобного для пользователя подхода. К ним относятся хроматографические методы. Среди хроматографических методов наиболее популярными являются метод ВЭЖХ и метод ОФ-ТСХ.

1.4.3.1 Тонкослойная хроматография

Применение метода ОФ-ТСХ в исследовании липофильности было введено Бьяджи [53]. Значение липофильности в таком методе оценивают величиной R_M , которая определяется в соответствии со следующей формулой (уравнение 3):

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right), \quad (3)$$

где R_f – расстояние от пятна соединения до линии старта на ТСХ-пластине, см.

Поскольку значение R_M линейно зависит от концентрации органического модификатора в подвижной фазе, это значение экстраполируется на чистую воду как подвижную фазу в соответствии с уравнением Сочевинского-Вахтмайстера (уравнение 4):

$$R_M = R_{MW} + S\varphi, \quad (4)$$

где φ - объемный процент органического модификатора;

S - наклон графика регрессии (указывает на механизм удерживания);

R_{MW} - значение R_M , экстраполированное на $\varphi = 0$.

Славик и соавторы изучали липофильность и влияние различных растворителей подвижной фазы (ацетон, ацетонитрил, метанол) на удерживание семи производных 1,2-бензизотиазол-3(2*H*)-она с высокой антимикробной активностью. Для каждого из исследованных органических растворителей установлены высокие значения коэффициентов корреляции между объемной долей органических модификаторов и значениями R_M [54].

Константинеску и исследовательская группа в своей работе устанавливали липофильность тиазольных халконов, флаванонов, 3-гидроксифлавононов и их ацетилированных- производных методом ОФ-ТСХ [55]. Анализ проводили с использованием алюминиевых пластинок силикагеля, покрытых флуоресцентным индикатором RP-18F254s. Пятна проявляли в УФ-свете при 254 и 365 нм. В качестве подвижной фазы использовали изопропанол. Все обсуждаемые соединения в расчетах

показали превосходные лекарственные свойства с оптимальными значениями липофильности. Основываясь на полученных результатах, авторы сделали вывод о том, что на липофильность влияет основная структура молекулы, а также природа, положение и количество функциональных групп в основной структуре. Ароматические группы и *N*-акцепторные заместители, по-видимому, имели решающее значение для объясняя липофильность изучаемых соединений.

Чирский в своей статье описал метод определения липофильности ибупрофена, кетопрофена, напроксена и флурбипрофена [56]. В качестве стационарной фазы в исследовании служили пластины, покрытые силикагелем. Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и воды в различных пропорциях. Содержание ацетонитрила варьировалось от 5% до 80%. По результатам исследования было установлено, что флурбипрофен характеризуется самым высоким значением $\log P$: 3,82. Самый низкий показатель - у кетопрофена: 2,66. Определенные значения $\log P$ тестируемых соединений были аналогичны значениям, рассчитанным с помощью программного обеспечения.

Как правило, режим хроматографии с обращенной фазой используется для имитации октанола. Из широкого диапазона доступных стационарных фаз силикагель с привитыми C_{18} -группами является рекомендуемым материалом для оценки липофильности лекарственного средства. Однако свободные силанольные участки обуславливают дополнительные полярные взаимодействия (водородная связь, электростатическое взаимодействие) и фазовую неустойчивость при pH выше 8, что является отрицательными аспектами. Определение значений удерживания на чистой воде (без органического модификатора) невозможно (чрезмерно длительное время удерживания, R_f близко к нулю), поэтому в качестве растворителей применяются смеси метанол/вода или ацетонитрил/вода. ОФ-ТСХ является ценным методом оценки коэффициента распределения $\log P$, если использование прямых методов затруднительно.

Использование ОФ-ТСХ позволяет преодолеть некоторые трудности, связанные с классическим методом встряхивания колбы. Преимуществами метода ТСХ являются скорость определения липофильности, лучшая воспроизводимость и менее строгие требования к чистоте образца из-за разделения во время хроматографического процесса. Этот метод прост в исполнении и позволяет одновременно анализировать и сравнивать несколько соединений с широким диапазоном измеряемых значений липофильности.

1.4.3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Наиболее быстрым методом определения липофильности является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [57]. Определение $\log R$ растворенного вещества основывается на корреляции его времени удерживания со временем удерживания аналогичных соединений с известными значениями $\log R$. Аналогично ОФ-ТСХ удерживание в ОФ-ВЭЖХ часто описывается моделью линейной растворимости, где логарифм коэффициента удерживания $\log k$ для аналита линейно связан с объемной долей органического модификатора в двухкомпонентном элюенте (уравнение 5):

$$\log k = \log k_W - S\varphi, \quad (5)$$

где φ – концентрация органического растворителя;

S – наклон графика регрессии (специфичный для органического модификатора на рассматриваемой стационарной фазе);

$\log k_W$ – параметр липофильности.

Отношение между φ и коэффициентом удерживания k , полученное из серии измерений, не является линейным для всего диапазона концентраций органического растворителя. Коэффициент удерживания k определяется выражением (уравнение 6):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad (6)$$

где t_R и t_0 – время удерживания испытуемого соединения и неудерживаемого соединения (мертвое время), соответственно, мин.

Коэффициент удерживания, k (или R_M) аналита может быть связан с коэффициентом распределения (P) между двумя фазами уравнением 7:

$$\log k = \log P + \log \frac{V_S}{V_M}, \quad (7)$$

где $\frac{V_S}{V_M}$ – отношение объемов стационарной и подвижной фаз.

Хроматографическая система разделения для оценки липофильности должна моделировать коэффициент распределения вещества в системе октанол/вода.

Октадецил-связанный диоксид кремния и другие алкильные лиганды, связанные с диоксидом кремния, обычно используют как стационарные фазы для оценки липофильности методом ВЭЖХ. Следует отметить, что материалы на основе силикагеля нестабильны при высоком значении pH, поэтому исследование основных аналитов является затруднительным, также как и определение липофильности ионизируемых соединений на колонках C_{18} или C_8 . Основной проблемой, связанной с этими стационарными фазами, является возможность взаимодействия полярных фрагментов (электростатические или водородные взаимодействия) с остаточными силанольными группами на поверхности силикагеля, что приводит к асимметрии пиков. Чтобы ограничить упомянутые выше взаимодействия, такие стационарные фазы могут быть защищены полярными группами. Коммерчески доступными являются алкиламидные, а также карбаматные фазы.

Гиагинис и коллеги [58] смоделировали систему октанол/вода с помощью фазы на основе дезактивированного диоксида кремния (BDS). Кроме того, в случае основных аналитов можно использовать *n*-дециламин в качестве маскирующего агента в подвижной фазе.

Бенхайм добился минимизации силикофильного эффекта с использованием колонки Ascentis RPAmide, предназначенной для оценки липофильности [59]. Полярная амидная группа связывается через алкильную цепь вблизи поверхности диоксида кремния, поэтому предотвращается доступ к растворенному веществу. Добавление *n*-октанола показывает улучшенную корреляцию между значениями $\log P$ и экстраполированным $\log k_w$. Удерживание в быстром градиенте метанол-вода с использованием коротких колонок поливинилового спирта также показывает еще более высокую корреляцию. Современные монолитные кремниевые стационарные фазы преодолевают недостатки обычных стационарных фаз, основанных на частицах носителей.

Мркицкова определила липофильность потенциальных противотуберкулезных агентов с помощью ВЭЖХ на монолитной стационарной фазе и рассчитала теоретические значения $\log P$ для всех соединений, используя химические программы. Методика значительно сократила время анализа (более высокая стабильность колонок позволила увеличить скорость потока) и были достигнуты соответствующие формы пиков [60].

Как было показано выше, использование новых стационарных фаз в системе ВЭЖХ весьма эффективно для прогнозирования коэффициента распределения октанол/вода. Однако необходимо подчеркнуть, что октанол является изотропной фазой и в этом отношении отличается от естественных мембранных барьеров, которые состоят из упорядоченных и анизотропных липид-белковых мембран. В литературе широко подчеркивается, что для более точного описания распределения соединений между различными компартментами *in vivo* требуется применение различных типов липофильности [61].

Выводы по разделу

Анализ литературных данных, приведенных в подразделах 1.1 – 1.4, позволяет сделать вывод, что основным фактором, определяющим способность лекарственного средства проникать к мишени и распределяться по организму, является липофильность. При дизайне ингибиторов РІЗК установлено, что варьирование заместителей в скаффолде позволяет регулировать значения липофильности. Так, введение в соединение полярных групп, которые зачастую оказываются акцепторными заместителями, приводит к снижению значения липофильности, а объемные неполярные, как правило, электронодонорные заместители, способствуют его увеличению.

При пероральной форме приема важно оптимальное соотношение полярных и неполярных групп, первые ответственны за растворимость, вторые – за преодоление межклеточных мембран.

2 Обсуждение результатов

По полученным экспериментальным данным были найдены значения $\log k_0$. $\log k_0$ – логарифм фактора удерживания при полном отсутствии метанола в подвижной фазе. Значение $\log k_0$ для каждого соединения находили при помощи экстраполяции рассчитанных значений $\log k$ на $x=0$. Зависимости $\log k$ от доли метанола в подвижной фазе приведены на рисунках 9 – 14.

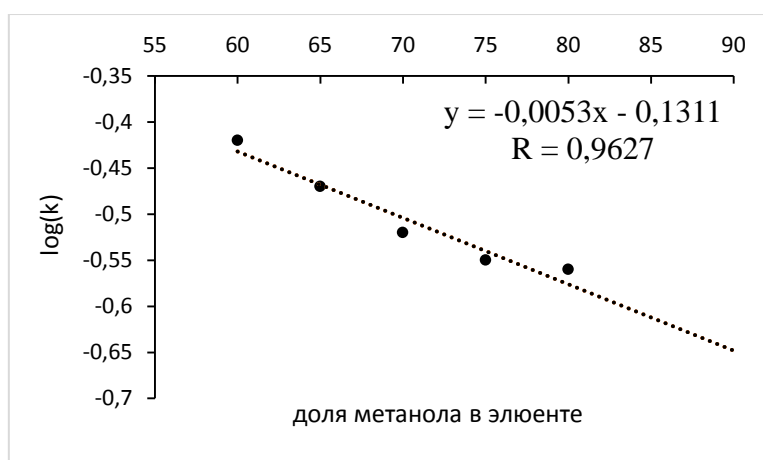


Рисунок 9 – Зависимость фактора удерживания 2-бутанона от доли метанола в составе подвижной фазы

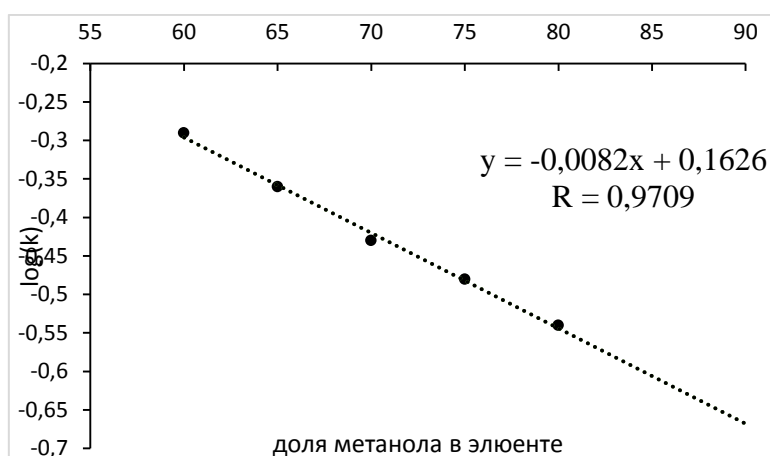


Рисунок 10 – Зависимость фактора удерживания анилина от доли метанола в составе подвижной фазы

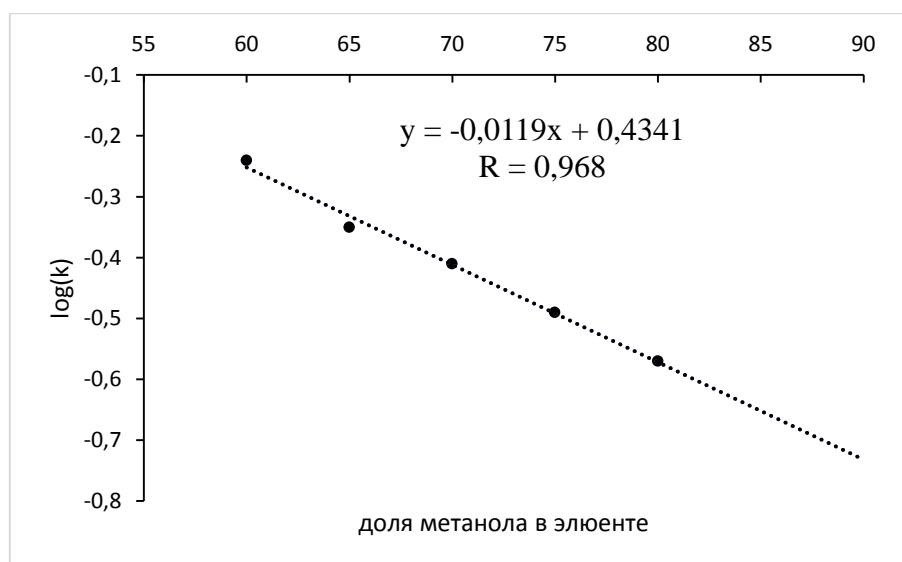


Рисунок 11 – Зависимость фактора удерживания ацетанилида от доли метанола в составе подвижной фазы

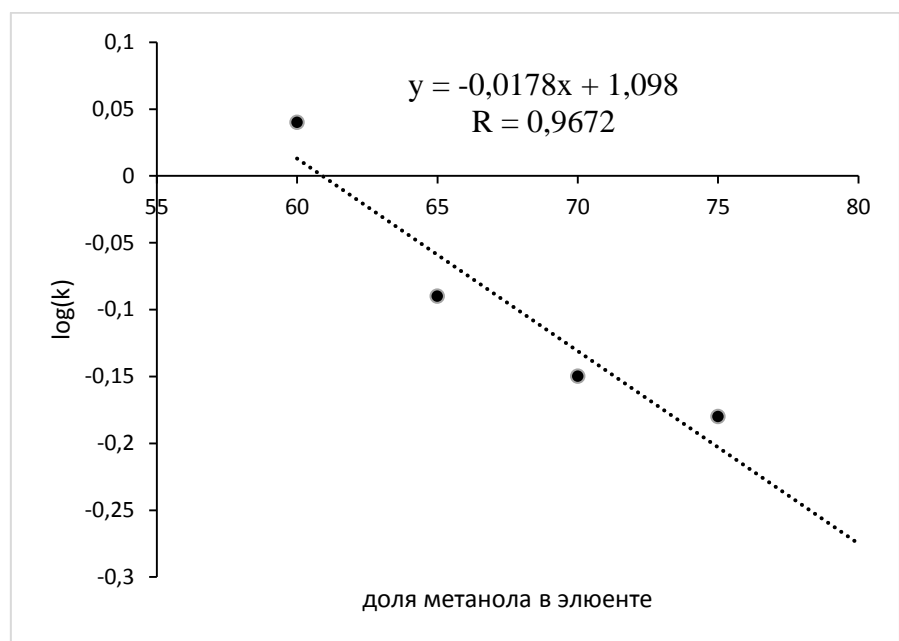


Рисунок 12 – Зависимость фактора удерживания ацетофенона от доли метанола в составе подвижной фазы

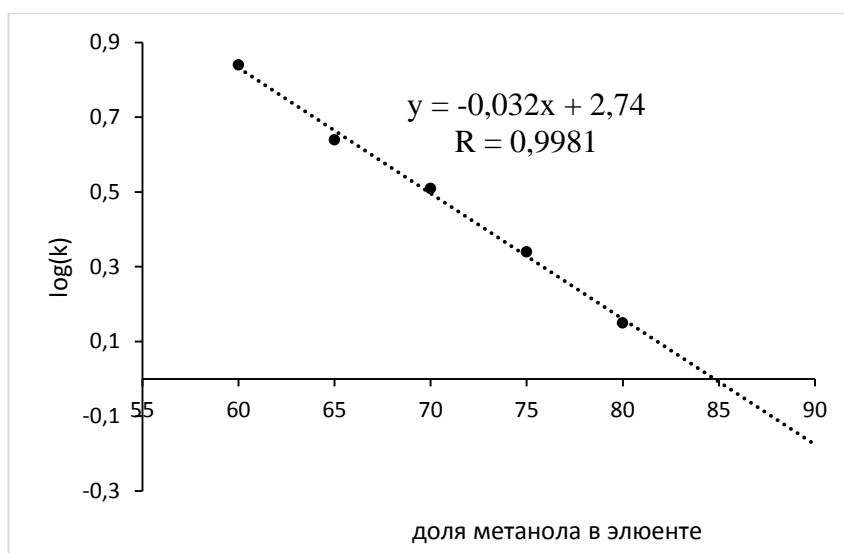


Рисунок 13 – Зависимость фактора удерживания бромбензола от доли метанола в составе подвижной фазы

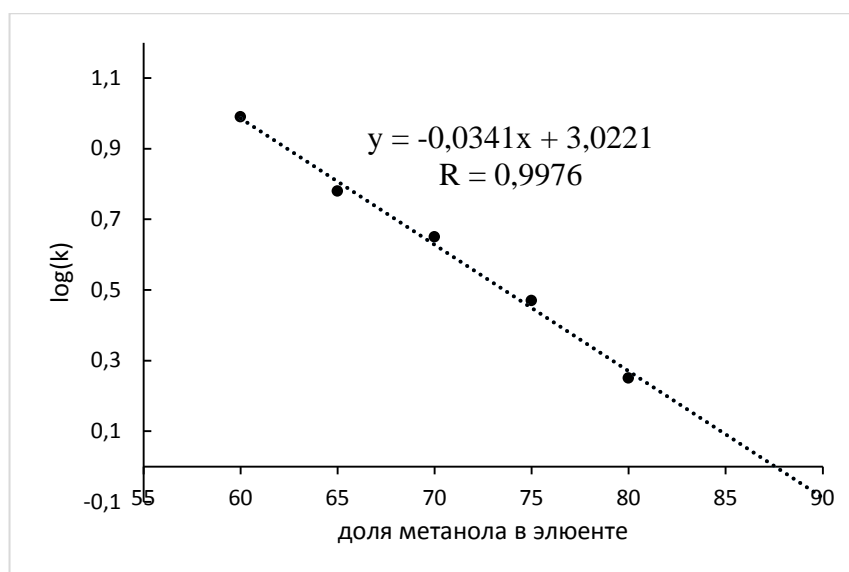


Рисунок 14 – Зависимость фактора удерживания нафталина от доли метанола в составе подвижной фазы

По данным графическим зависимостям были найдены значения $\log k_0$ для каждого соединения, используемого в качестве стандарта. Результаты занесены в таблицу 9.

Таблица 9 – Результаты анализа, полученные для эталонных соединений.

Эталон	Log k_0	Log $P_{o/w}$
2-бутанон	-0.13 ± 0.01	0.3 ± 0.01
анилин	0.16 ± 0.01	0.9 ± 0.02
ацетанилид	0.43 ± 0.01	1.0 ± 0.02
ацетофенон	1.09 ± 0.02	1.7 ± 0.03
бромбензол	2.74 ± 0.05	2.8 ± 0.06
нафталин	3.02 ± 0.06	3.5 ± 0.07

На основе полученных данных построена зависимость логарифма коэффициента распределения вещества от логарифма его фактора удерживания. Полученный график представлен на рисунке 15.

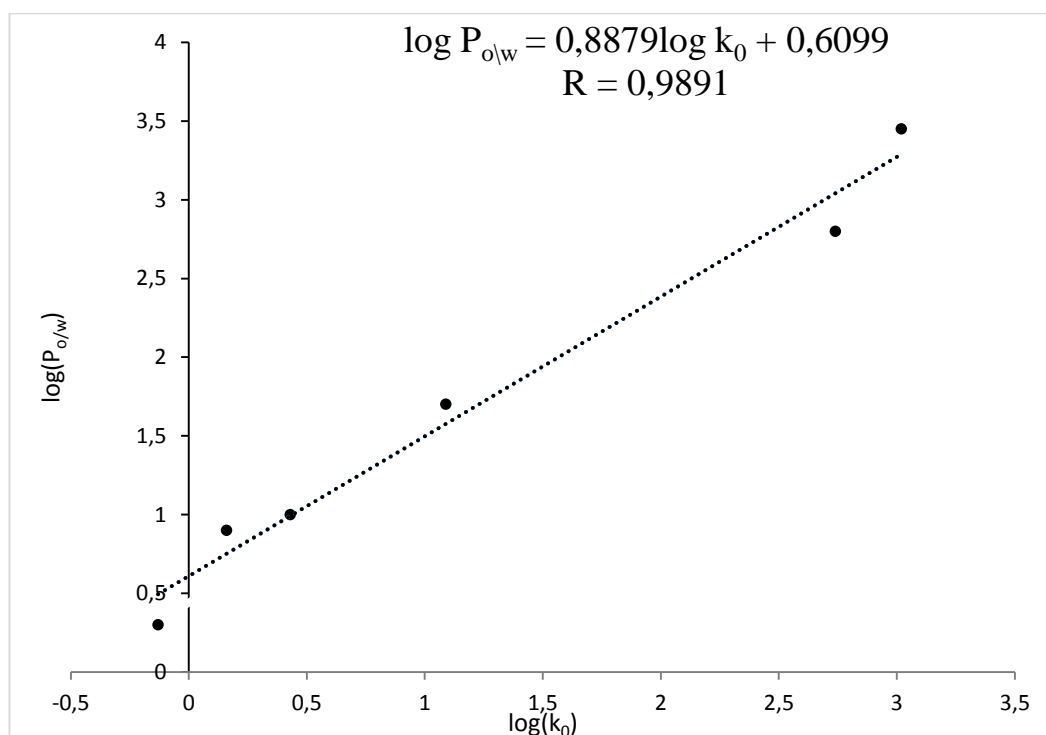


Рисунок 15 – Зависимость логарифма коэффициента распределения вещества от логарифма его фактора удерживания

На основе полученной зависимости вывели уравнение (8), связывающее между собой величины $\log k_0$ и $\log P_{o/w}$:

$$\log P_{o/w} = 0.8879 \log(k_0) + 0.6099, \quad (8)$$

где $\log P_{o/w}$ – логарифм коэффициента распределения вещества;

$\log k_0$ – логарифм фактора удерживания вещества.

На следующем этапе работы для каждого исследуемого соединения построены графические зависимости (рисунки 16-19) $\log k$ от доли метанола в подвижной фазе.

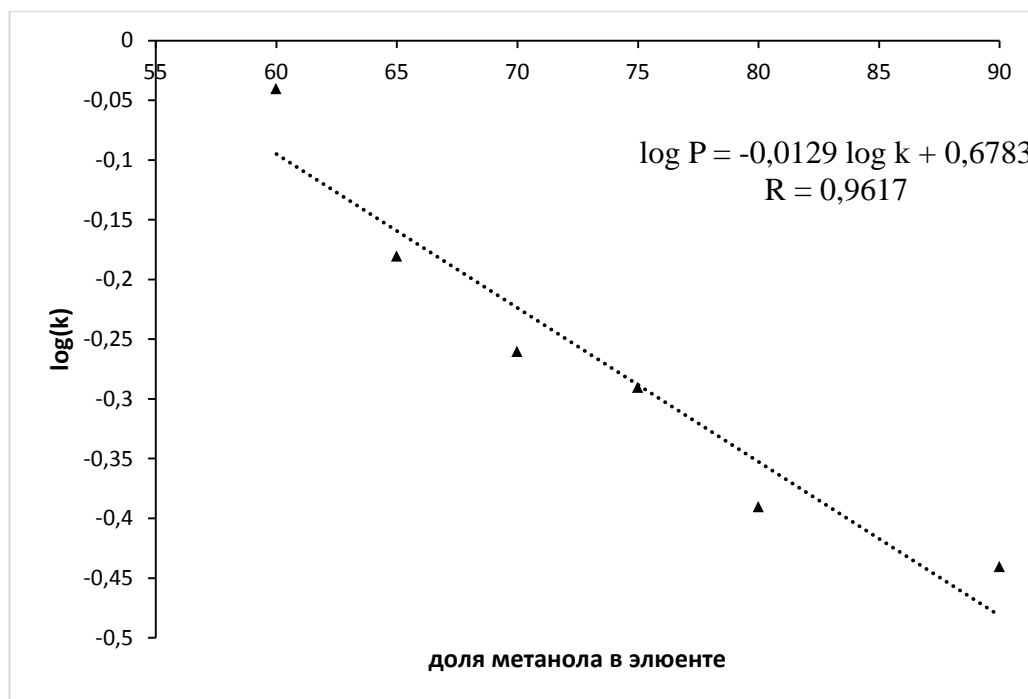


Рисунок 16 – Зависимость фактора удерживания РНД-168 от доли метанола в составе подвижной фазы

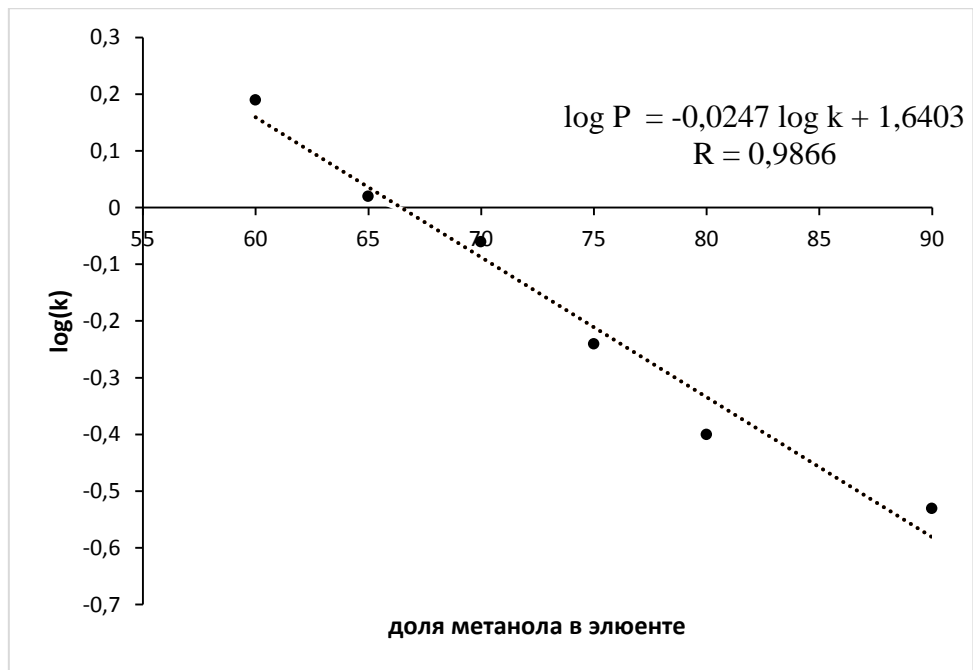


Рисунок 17 – Зависимость фактора удерживания PND-169 от доли метанола в составе подвижной фазы

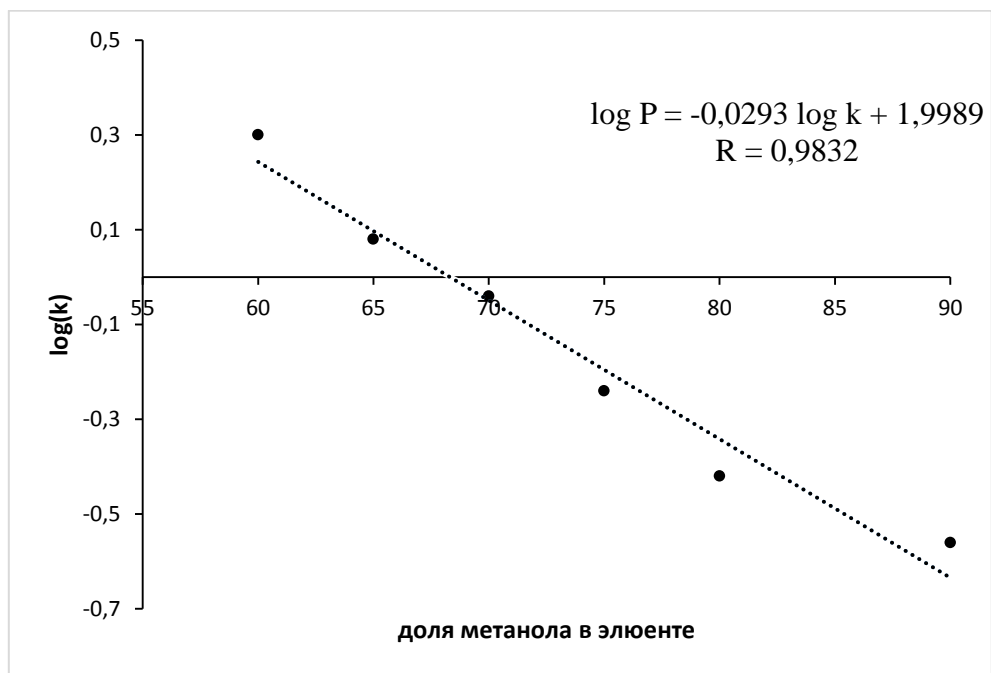


Рисунок 18 – Зависимость фактора удерживания PND-172 от доли метанола в составе подвижной фазы

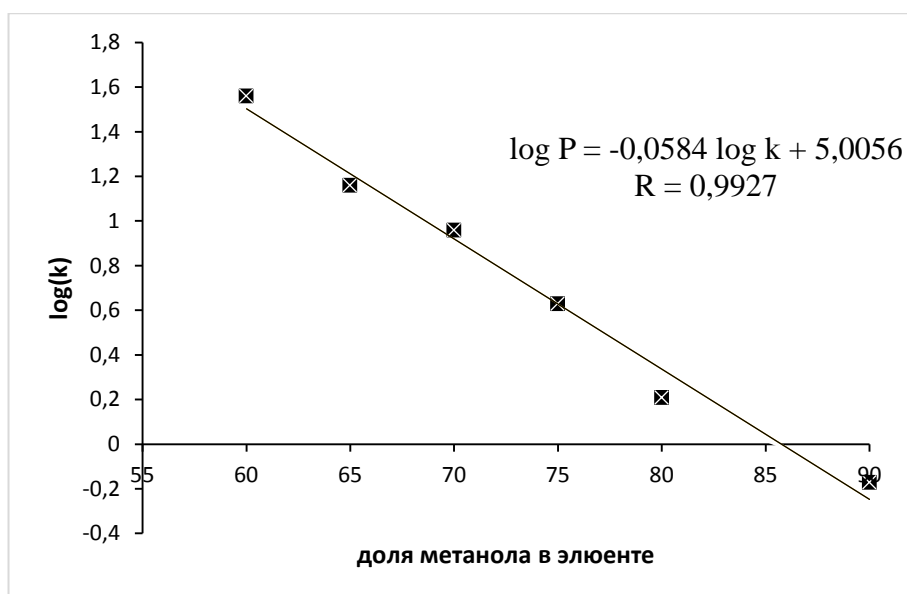
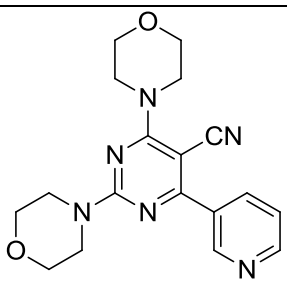


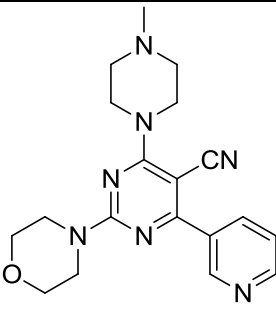
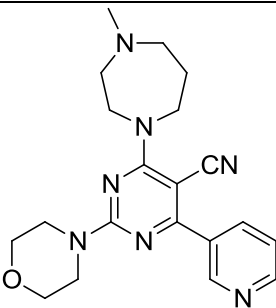
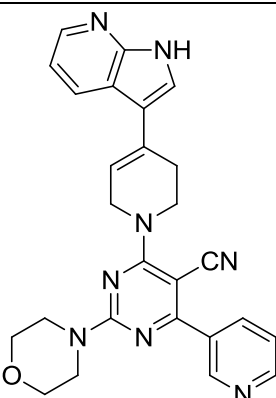
Рисунок 19 – Зависимость фактора удерживания РНД-174 от доли метанола в составе подвижной фазы

По приведенным выше зависимостям для каждого исследуемого соединения были найдены значения $\log k_0$. Эти значения были использованы в качестве переменных в ранее выведенном уравнении для расчета липофильности исследуемых производных 5-цианопиримидинов. Результаты расчетов представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты анализа, полученные для исследуемых производных 5-цианопиримидинов.

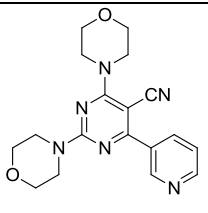
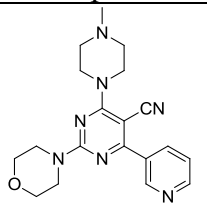
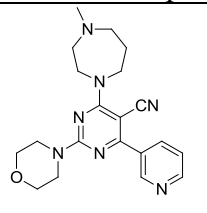
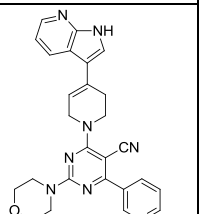
Исследуемое соединение	Log k_0	Log $P_{o/w}$
1	2	3
 PHD-168	0.68 ± 0.01	1.21 ± 0.02

Продолжение таблицы 10

1	2	3
 <p>PHD-169</p>	<p>1.64 ± 0.03</p>	<p>2.07 ± 0.04</p>
 <p>PHD-172</p>	<p>2.00 ± 0.04</p>	<p>2.38 ± 0.05</p>
 <p>PHD-174</p>	<p>5.01 ± 0.10</p>	<p>5.05 ± 0.10</p>

При анализе литературных данных (раздел 1.2) было установлено, что любой эффективный ингибитор РІЗК должен соответствовать основным положениям правил Липинского. Для определения биодоступности разрабатываемых ингибиторов на следующем этапе работы каждое соединение было проанализировано на соответствие «правилам пяти». Данные анализа представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Соответствие молекулярных параметров исследуемых производных 5-цианопиримидинов правилам Липинского.

Основные положения правил Липинского	Исследуемые производные 5-цианопиримидина			
				
Молекулярная масса не более 500	+	+	+	+
Не более 10 атомов N и O в качестве акцепторов H-связи	+	+	+	+
Не более 5 групп OH и NH в качестве доноров H-связи	+	+	+	+
Значение липофильности (logP) не более 5	+	+	+	±

Таким образом, определены значения липофильности для исследуемых производных 5-цианопиримидинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. При оценке полученных значений липофильности и других молекулярных параметров все изученные соединения практически полностью соответствуют правилу Липинского (таблица 11). Наименьшее значение липофильности было получено для соединения PND-168, наибольшее – для соединения PND-174. Из полученных результатов следует, что значение липофильности зависит от объема молекулы. Чем объемнее молекула, тем больше липофильность.

Также для каждого исследуемого пиримидина экспериментальные значения липофильности сравнили с теоретическими.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Реагенты использовались коммерчески доступные, без дополнительной очистки.

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 объемом 50 мкл;
4. Метанол для ОФ ВЭЖХ, 99.9 %;
5. Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
6. Вода дистиллированная;
7. Нитрит натрия, х. ч.;
8. Нафталин, х. ч.;
9. 2-бутанон, х. ч.;
10. Ацетофенон, 99.9 %;
11. Бромбензол, х. ч.;
12. Ацетанилид, х. ч.;
13. Анилин, 99.9%;

3.2 Объекты исследования

В качестве объектов исследования выступают производные 5-цианопиримидины (таблица 12), которые были синтезированы по схеме, представленной на рисунке 20.

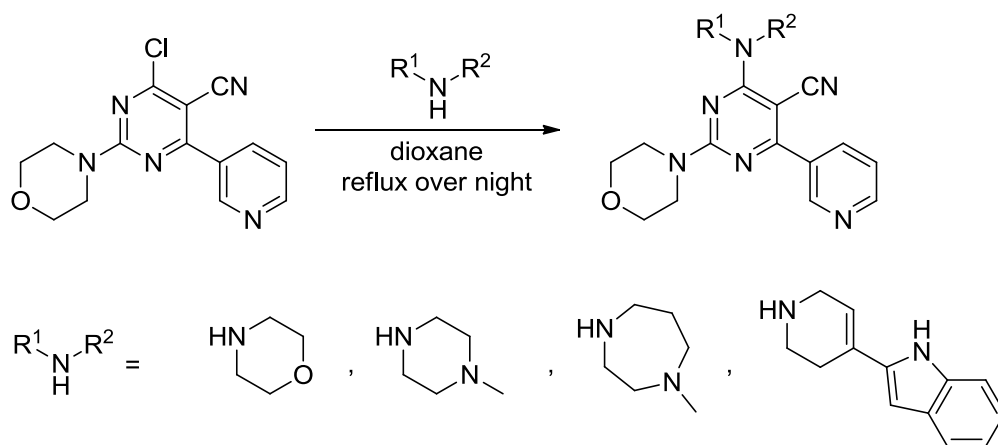
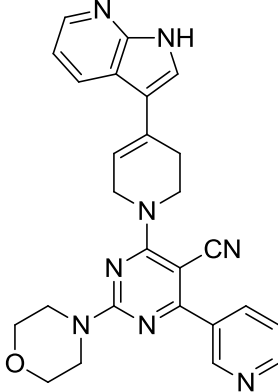


Рисунок 20 – Схема синтеза исследуемых 5-цианопиримидинов

Таблица 12 – Характеристики исследуемых производных 5-цианопиримидинов.

Название	Код	Формула	Молекулярная масса, г/моль
1	2	3	4
2,4-диморфолино-6-(пиридин-3-ил)-5-цианопиримидин	PHD-168		352.40
4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-морфолино-6-(пиридин-3-ил)-5-цианопиримидин	PHD-169		365.44
4-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)-2-морфолино-6-(пиридин-3-ил)-5-цианопиримидин	PHD-172		379.47

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4
4-(4-(1 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>b</i>]пиридин-3-ил)-5,6-дигидропиридин-1(2 <i>H</i>)-ил)-2-морфолино-6-(пиридин-3-ил)-5-цианопиримидин	PHD-174		463.55

3.3 Методика проведения эксперимента

Исследования проводили на жидкостном хроматографе фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC с хроматографической колонкой (неподвижная фаза) Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 4,6 × 100 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол – вода в различных соотношениях: 90 : 10, 80 : 20, 75 : 25, 70 : 30, 65 : 35, 60 : 40 (об. %).

Опыты проводили при комнатной температуре, расход элюента составляет 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волн УФ – детектора, равной 200–370 нм.

По экспериментальным данным был проведён расчёт факторов удерживания (*k*) исследуемых объектов и соответственно *logk*. В качестве эталонных веществ использовали 2–бутанон, анилин, ацетанилид, ацетофенон, бромбензол и нафталин. В качестве несорбирующегося вещества был использован нитрит натрия (NaNO₂).

3.4 Определение значения фактора удерживания

Фактор удерживания был рассчитан по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}, \quad (9)$$

где t_R – время удерживания исследуемых соединений, с;

t_M – время удерживания несорбирующегося соединения (NaNO_2), с.

Для каждого эталонного соединения и изучаемых соединений рассчитаны факторы удерживания k , а также $\log k$ при всех исследуемых соотношениях метанол–вода (таблицы 13 и 14).

Таблица 13 – Рассчитанные величины логарифма от фактора удерживания для стандартных соединений при различных соотношениях метанол-вода.

Эталон	Значение $\log k$					
	(90:10)	(80:20)	(75:25)	(70:30)	(65:35)	(60:40)
2-бутанон	-0.59±0.01	-0.57±0.01	-0.55±0.01	-0.52±0.01	-0.47±0.01	-0.42±0.01
анилин	-0.52±0.01	-0.53±0.01	-0.41±0.01	-0.43±0.01	-0.35±0.01	-0.29±0.01
ацетанилид	-0.59±0.02	-0.57±0.01	-0.49±0.01	-0.41±0.01	-0.35±0.01	-0.24±0.01
ацетофенон	-1.39±0.03	-0.36±0.01	-0.18±0.01	-0.15±0.01	-0.09±0.01	0.05±0.01
бромбензол	-0.12±0.01	0.15±0.01	0.34±0.01	0.52±0.01	0.64±0.01	0.84±0.02
нафталин	-0.03±0.01	0.25±0.01	0.47±0.01	0.65±0.01	0.78±0.02	0.99±0.02

Таблица 14 – Рассчитанные величины логарифма от фактора удерживания для изучаемых соединений при различных соотношениях метанол-вода.

Исследуемое соединение	Значение $\log k$					
	(90:10)	(80:20)	(75:25)	(70:30)	(65:35)	(60:40)
RHD-168	-0.44±0.01	-0.39±0.01	-0.29±0.01	-0.26±0.01	-0.18±0.01	-0.04±0.01
RHD-169	-0.53±0.02	-0.40±0.01	-0.24±0.01	-0.06±0.01	0.02±0.01	0.19±0.01
RHD-172	-0.56±0.01	-0.42±0.01	-0.24±0.01	-0.04±0.01	0.08±0.01	0.30±0.01
RHD-174	-0.17±0.01	0.21±0.01	0.63±0.01	0.96±0.02	1.16±0.02	1.56±0.03

Заключение

В ходе данной бакалаврской работы была достигнута цель, а также выполнены поставленные задачи. По проделанной исследовательской работе можно сделать следующие выводы:

1. Осуществлена литературная проработка по заданной теме, в ходе которой определены эффективные методы экспериментального определения значений липофильности. Показано, что наряду с классическим методом определения гидрофобности в системе *n*-октанол – вода, все большее распространение принимают методы ВЭЖХ в режиме обращенно-фазового варианта. Показатель липофильности (гидрофобности) один из ключевых параметров в правилах Липинского. Установлена принципиальная возможность использования правил Липинского в дизайне ингибиторов киназ. Проанализированы основные обзоры в этом направлении.

2. В ходе лабораторных экспериментов определены факторы удерживания для 6 веществ, взятых за стандарты. Для данных соединений известны значения коэффициента гидрофобности. Набор соединений отражает различные типы межмолекулярных взаимодействий. Коэффициенты гидрофобности данных веществ прокоррелированы с фактором удерживания в ОФ ВЭЖХ. По полученным результатам выведено уравнение, связывающее между собой величины $\log k_0$ и $\log P_{o/w}$, с коэффициентом корреляции 0,989.

3. В условиях ВЭЖХ исследованы производные 5-цианопиримидинов. Данные соединения являются перспективными в качестве ингибиторов киназ с ожидаемым перроральным способом введения. Для такого способа введения, а также для проверки правила 5 Липинского, параметр липофильности является одним из ключевых. По результатам хроматографического эксперимента, по полученному в работе уравнению рассчитаны коэффициенты гидрофобности $\log P$ для 5-цианопиримидинов.

4. Наименьшее значение липофильности было получено для соединения PND-168, наибольшее – для PND-174. Данные значения хорошо согласуются с природой заместителей при основном скафольде цианопиримидинов, а именно с их объемом, поляризуемостью и гидрофобностью. В целом, все изученные в работе соединения соответствуют правилам Липинского, за исключением значения гидрофобности для PND-174 (4-(4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)-5,6-дигидропиридин-1(2H)-ил)-2-морфолино-6-(пиридин-3-ил)-5-цианопиримидина), которое занимает пограничное значение. Следовательно, исследованные 5-цианопиримидины могут быть рекомендованы для дальнейшего исследования их в качестве ингибиторов киназ.

Список используемой литературы

1. Parang, K. Mechanism-based design of a protein kinase inhibitor / K. Parang, J. H. Till, A. J. Ablooglu et al. // *Nature structural biology*. – 2001. – Vol. 8. – P. 37-41.
2. Schröder M. DFG-1 Residue Controls Inhibitor Binding Mode and Affinity, Providing a Basis for Rational Design of Kinase Inhibitor Selectivity / M. Schroder, A. N. Bullock, O. Fedorov et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 63. – №. 18. – P. 10224-10234.
3. Lawrence M. S. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types / M. S. Lawrence, P. Stojanov, C. H. Mermel et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 505. – №. 7484. – P. 495-501.
4. Thakur A. Design, synthesis, and biological evaluation of quinazolin-4-one-based hydroxamic acids as dual PI3K/HDAC inhibitors / A. Thakur, G. J. Tawa, M. J. Henderson et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol. 63. – №. 8. – P. 4256-4292.
5. Yu Y. Design, synthesis, and biological evaluation of imidazo[1, 2-a]pyridine derivatives as novel PI3K/mTOR dual inhibitors / Y. Yu, Y. Han, F. Zhang et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol. 63. – №. 6. – P. 3028-3046.
6. Zhang M. PI3K inhibitors: review and new strategies / M. Zhang, H. Jang, R. Nussinov // *Chemical Science*. – 2020. – Vol. 11. – №. 23. – P. 5855-5865.
7. Waring M. J. Lipophilicity in drug discovery // *Expert opin drug discov.* – 2010. – Vol. 5. – P. 235–248.
8. Gaudette L. E. Relationship between the lipid solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes / L. E. Gaudette, B. B. Brodie // *Biochemical pharmacology*. – 1959. – Vol. 2. – №. 2. – P. 89-96.
9. Leo A. Partition coefficients and their uses / A. Leo, C. Hansch, D. Elkins // *Chemical reviews*. – 1971. – Vol. 71. – №. 6. – P. 525-616.

10. Arnott J. A., Planey S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design // *Expert opinion on drug discovery*. – 2012. – Vol. 7. – №. 10. – P. 863-875.

11. Tsopelas F. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery / F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou // *Expert opinion on drug discovery*. – 2017. – Vol. 12. – №. 9. – P. 885-896.

12. Lipinski C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – Vol. 46, № 3. – P. 3–26.

13. Tsopelas F. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery / F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou // *Expert opinion on drug discovery*. – 2017. – Vol. 12. – №. 9. – P. 885-896.

14. Mérour J. Y. The azaindole framework in the design of kinase inhibitors / J. Y. Mérour, F. Buron, K. Plé et al. // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19. – №. 12. – P. 19935-19979.

15. Carles F. PKIDB: A curated, annotated and updated database of protein kinase inhibitors in clinical trials / F. Carles, S. Bourg, C. Meyer et al. // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – №. 4. – P. 908.

16. 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.

17. 6,7-Dihydrobenzo[*f*]benzo[4,5]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepine derivatives as selective inhibitors of PI3K α / Y. Yin, Y.-Q. Zhang, B. Jin et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23, №6. – P. 1231-1240.

18. Discovery of the highly potent PI3K/mTOR dual inhibitor PF-04979064 through structure-based drug design / H. Cheng, C. Li, S. Bailey et al. // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2013. – Vol. 4. – №. 1. – P. 91-97.

19. 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. Wällberg, S. Ghosal et al. // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2012. – Vol. 22. – №. 21. – P. 6671-6676.

20. Discovery of highly isoform selective orally bioavailable phosphoinositide 3-kinase (PI3K)- γ inhibitors / N. Pemberton, M. Mogemark, S. Arlbrandt et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – №. 12. – P. 5435-5441.

21. Synthesis and structure–activity relationships of PI3K/mTOR dual inhibitors from a series of 2-amino-4-methylpyrido [2, 3-d] pyrimidine derivatives / F. Han, S. Lin, P. Liu et al. // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2014. – Vol. 24. – №. 18. – P. 4538-4541.

22. Design and synthesis of a novel pyrrolidinyl pyrido pyrimidinone derivative as a potent inhibitor of PI3K α and mTOR / P. T. Le, H. Cheng, S. Ninkovic et al. // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2012. – Vol. 22. – №. 15. – P. 5098-5103.

23. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-alkynyl-quinoline derivatives as PI3K/mTOR dual inhibitors / X. Lv, H. Ying, X. Ma et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 99. – P. 36-50.

24. El-Khouly O. A. Synthesis, anticancer and antimicrobial evaluation of new benzofuran based derivatives: PI3K inhibition, quorum sensing and molecular modeling study / O. A. El-Khouly, M. A. Henen, A. A. Magda et al. // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2021. – Vol. 31. – P. 115976.

25. Kakemi K. Absorption and excretion of drugs. XXX. Absorption of barbituric acid derivatives from rat stomach / K. Kakemi, T. Arita, R. Hori et al. // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1967. – Vol. 15. – №. 10. – P. 1534-1539.

26. Camenisch G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight / G. Camenisch, J. Alsenz, H. van de Waterbeemd et al. // *European journal of pharmaceutical sciences*. – 1998. – Vol. 6. – №. 4. – P. 313-319.

27. Adson A. Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: Uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers / A. Adson, P. S. Burton, T. Raub et al. // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1995. – Vol. 84. – №. 10. – P. 1197-1204.
28. Sharma A. Finite element modeling of drug distribution in transdermal drug delivery system / A. Sharma, V. P. Saxena // *Indian Journal of Biomechanics*. – 2011. – Vol. 1. – P. 26.
29. Waters N. J. Use of the Øie-Tozer model in understanding mechanisms and determinants of drug distribution / N. J. Waters, F. Lombardo // *Drug metabolism and disposition*. – 2010. – Vol. 38. – №. 7. – P. 1159-1165.
30. Ghuman J. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin / J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas // *Journal of molecular biology*. – 2005. – Vol. 353. – №. 1. – P. 38-52.
31. Kremer J. M. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease / J. M. Kremer, J. Wilting, L. H. Janssen // *Pharmacological reviews*. – 1988. – Vol. 40. – №. 1. – P. 1-47.
32. Krämer S. D. Physicochemical properties in pharmacokinetic lead optimization / S. D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach // *II Farmaco*. – 2001. – Vol. 56. – №. 1-2. – P. 145-148.
33. Nassar A. E. F. Improving the decision-making process in the structural modification of drug candidates: enhancing metabolic stability / A. E. F. Nassar, A. M. Kamel, C. Clarimont // *Drug discovery today*. – 2004. – Vol. 9. – №. 23. – P. 1020-1028.
34. Borchard U. Pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blocking agents: clinical significance of hepatic and/or renal clearance / Borchard U. // *Clinical physiology and biochemistry*. – 1990. – Vol. 8. – P. 28.
35. Varma M. V. S. Physicochemical determinants of human renal clearance / M. V. Varma, B. Feng, R. S. Obach et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2009. – Vol. 52. – №. 15. – P. 4844-4852.

36. Johnson T. W. Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption / T. W. Johnson, K. R. Dress, M. Edwards // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2009. – Vol. 19. – №. 19. – P. 5560-5564.

37. Meanwell N. A. Improving drug candidates by design: a focus on physicochemical properties as a means of improving compound disposition and safety // *Chemical research in toxicology*. – 2011. – Vol. 24. – №. 9. – P. 1420-1456.

38. Price D. A. Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes: a review / D. A. Price, J. Blagg, L. Jones et al. // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. – 2009. – Vol. 5. – №. 8. – P. 921-931.

39. Anderson N. Drug-induced phospholipidosis / N. Anderson, J. Borlak // *FEBS letters*. – 2006. – Vol. 580. – №. 23. – P. 5533-5540.

40. Reasor M. J. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions / M. J. Reasor, K. L. Hastings, R. G. Ulrich // *Expert opinion on drug safety*. – 2006. – Vol. 5. – №. 4. – P. 567-583.

41. Abdolmaleki A. Computer aided drug design for multi-target drug design: SAR/QSAR, molecular docking and pharmacophore methods / A. Abdolmaleki, J. Ghasemi, F. Ghasemi // *Current drug targets*. – 2017. – Vol. 18. – №. 5. – P. 556-575.

42. Ploemen J. P. Use of physicochemical calculation of pKa and Log(P) to predict phospholipidosis-inducing potential: a case study with structurally related piperazines / J. P. H Ploemen, J. Kelder, T. Hafmans et al. // *Experimental and toxicologic pathology*. – 2004. – Vol. 55. – №. 5. – P. 347-355.

43. Paul S. M. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge / S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie et al. // *Nature reviews Drug discovery*. – 2010. – Vol. 9. – №. 3. – P. 203-214.

44. Tian S. ADME evaluation in drug discovery. 9. Prediction of oral bioavailability in humans based on molecular properties and structural fingerprints / S. Tian, Y. Li, J. Wang et al. // *Molecular pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 8. – №. 3. – P. 841-851.

45. Gleeson M. P. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters / M. P. Gleeson, A. Hersey, D. Montanari et al. // Nature reviews Drug discovery. – 2011. – Vol. 10. – №. 3. – P. 197-208.

46. Sangster J. Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry. – John Wiley & Sons – May 1997.

47. Alelyunas Y. W. A high throughput dried DMSO Log D lipophilicity measurement based on 96-well shake-flask and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry detection / Y. W. Alelyunas, L. Pelosi-Kilby, P. Turcotte et al. // Journal of Chromatography A. – 2010. – Vol. 1217. – №. 12. – P. 1950-1955.

48. Pawliszyn J. Solid phase microextraction: theory and practice. – John Wiley & Sons – April 1997.

49. Port A. Critical comparison of shake-flask, potentiometric and chromatographic methods for lipophilicity evaluation ($\log P_o/w$) of neutral, acidic, basic, amphoteric, and zwitterionic drugs / A. Port, M. Bordas, R. Enrech et al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Vol. 122. – P. 331-340.

50. Scherrer R. A. Automated potentiometric titrations in KCl/water-saturated octanol: method for quantifying factors influencing ion-pair partitioning / R. A. Scherrer, S. F. Donovan // Analytical chemistry. – 2009. – Vol. 81. – №. 7. – P. 2768-2778.

51. Biagi G. L. Thin-layer chromatographic study of the lipophilicity of triazine herbicides: influence of different organic modifiers / G. L. Biagi, A. M. Barbaro, A. Sapone et al. // Journal of Chromatography A. – 1992. – Vol. 625. – №. 2. – P. 392-396.

52. Sławik T. Lipophilicity of a series of 1, 2-benzisothiazol-3 (2H)-ones determined by reversed-phase thin-layer chromatography / T. Sławik, C. Kowalski // Journal of Chromatography A. – 2002. – Vol. 952. – №. 1-2. – P. 295-299.

53. Constantinescu T. Lipophilicity as a central component of drug-like properties of chalcones and flavonoid derivatives / T. Constantinescu, C. N. Lungu, I. Lung // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – №. 8. – P. 1505.

54. Czyrski A. Determination of the lipophilicity of ibuprofen, naproxen, ketoprofen, and flurbiprofen with thin-layer chromatography / A. Czyrski // Journal of Chemistry. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1-6.

55. Pallicer J. M., Sales J., Roses M., et al. Lipophilicity assessment of basic drugs (log P(o/w) determination) by a chromatographic method. J Chromatogr A . – 2011. – Vol. 1218. – №. 37. – P. 6356-6368.

56. Giaginis C. Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of n-octanol as mobile phase additive / C. Giaginis, S. Theocharis, A. Tsantili-Kakoulidou // Journal of Chromatography A. – 2007. – Vol. 1166. – №. 1-2. – P. 116-125.

57. Benhaim D. Characterization of Ascentis RP-Amide column: Lipophilicity measurement and linear solvation energy relationships / D. Benhaim, E. Grushka // Journal of Chromatography A. – 2010. – Vol. 1217. – №. 1. – P. 65-74.

58. Mrkvičková Z. Determination of lipophilicity of novel potential antituberculous agents using HPLC on monolithic stationary phase and theoretical calculations / Z. Mrkvičková, P. Kovaříková, S. Balíková et al. // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2008. – Vol. 48. – №. 2. – P. 310-314.

59. Hartmann T. Lipophilicity–beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies / T. Hartmann, J. Schmitt // Drug Discovery Today: Technologies. – 2004. – Vol. 1. – №. 4. – P. 431-439.

60. van Balen G. P. Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications / G. P. van Balen, C. A. M. Martinet, G. Caron // Medicinal research reviews. – 2004. – Vol. 24. – №. 3. – P. 299-324.

61. Avdeef A. pH-Metric log(P) 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs / A. Avdeef, K. J. Box, J. Comer et al. // Pharmaceutical research. – 1998. – Vol. 15. – №. 2. – P. 209-215.