

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)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Синтез новых производных 7-азаиндола

Обучающийся

Н.А. Евстифеев

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

Р. Э. Гасанов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Аннотация

Данная бакалаврская работа состоит из введения, трех разделов, включая 22 рисунка, 26 схем, 2 таблицы, заключения, списка из 96 источников, в том числе 95 на иностранном языке.

Ключевым вопросом бакалаврской работы является разработка производных 7-азаиндола, потенциально способных воздействовать на противоопухолевые биологические мишени.

Объектом бакалаврской работы является стратегия селективного конкурентного ингибирования биологической мишени путем разработки простого и универсального структурного мотива.

Предмет бакалаврской работы – компьютерное моделирование, синтез и *in vitro* тестирование полученных соединений на клеточной линии.

Бакалаврская работа может быть разделена на следующие смысловые части: литературный обзор, результаты и их обсуждение, экспериментальная часть.

В первой части описаны структурные особенности 7-азаиндольного скаффолда, увеличивающие эффективность при использовании данного структурного ядра в качестве важного мотива для взаимодействия на многие биологические мишени.

Во второй части описана стратегия синтеза соединений, результаты компьютерного моделирования библиотеки соединений в мишень ROCK1 и биологические испытания на клеточных линиях HEK 293 и iPS.

Третья часть описывает общие методики проведения испытаний.

Результаты исследования показывают, что селективное ингибирование белка ROCK1 может быть использовано для увеличения выживаемости клеточной линии iPS при их культивировании за счет снижения адгезии между клетками.

Abstract

The graduation work consists of an introduction, three sections, including 22 figures, 26 schemes, 2 tables, conclusion, a list of 96 references, including 95 foreign sources.

The key issue of this graduation work is the development of 7-azaindole derivatives with the potential to act on antitumor biological targets.

The object of the senior graduation work is a strategy for selective competitive inhibition of a biological target by developing a simple and versatile structural motif.

The subject of the graduation work is computer modeling, synthesis and in vitro testing of the obtained compounds on a cell line.

Graduation work can be divided into the following interconnected parts which are literature review, results and their discussion, experimental part.

The first part describes structural features of the 7-azaindole scaffold that increase the efficiency in using this structural core as an important motif for interaction on many biological targets.

The second part describes the compound synthesis strategy, results of computer modeling of the compound library into the ROCK1 target, and biological tests on HEK293 and iPS cell lines.

The third part describes general test procedure.

The results show that selective inhibition of ROCK1 protein can be used to increase the survival of iPS cell line during their cultivation by reducing cell-to-cell adhesion.

Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Азотсодержащие гетероциклические соединения в качестве скаффолда для биологических мишеней.....	8
1.2 Азаиндол и его производные в качестве скаффолда для биологических мишеней	11
1.3 7-Азаиндол в качестве скаффолда для биологических мишеней	20
1.4 Синтез тиазола по методу Ганча для сборки ингибиторов	34
2 Результаты и их обсуждение.....	40
2.1 Синтез исследуемых соединений.....	43
2.2 Молекулярное моделирование	51
2.3 Биологические испытания.....	56
3 Экспериментальная часть.....	59
3.1 Реагенты и оборудование.....	59
3.2 Синтез исходных соединений.....	59
3.3 Синтез целевых соединений	62
3.4 Компьютерное моделирование.....	65
3.5 Биологические испытания.....	66
Заключение	68
Список используемой литературы	69

Определения, обозначения и сокращения

В данной работе используются следующие термины с соответствующими определениями:

ALK	киназа анапластичной лимфомы
CDK	циклин-зависимая протеинкиназа
DMFMDA	диметилформаид диметилацеталь
DYRKA1	киназа 1A, регулируемая тирозинфосфорилированием двойной специфичности
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
FDA	управление по контролю за продуктами и лекарствами
FGFR	рецептор фактора роста фибробластов
GSK3 β	киназа 3 β -гликоген синтазы
GSTO1-1	глутатион-S-трансфераза омега-1
HDAC	гистондеацетилаза
HOBT	гидроксibenзотриазол
PI3K	фосфатидилинозитол-3-киназа
RAF-1	прото-онкогенная серин/треониновая протеинкиназа RAF
RTK	рецепторная тирозинкиназа
TGF β	трансформирующий фактор роста бета
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов

Введение

Рак – это неконтролируемая организмом аномальная пролиферация клеток в этом же организме, образующаяся в результате aberrаций в наследственной информации конкретной клетки. Это очень серьезное заболевание, которое по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) [1] и по исследованиям других групп ученых из ряда стран приводит к смерти около 9,5-10 миллионов человек ежегодно [2, 3]. Можно сказать, что каждая шестая смерть в этом мире случается по вине раковой опухоли.

И по сегодняшний день рак как целая группа различных заболеваний, которых только самых распространенных насчитывается около 38 разновидностей для каждого из полов, наносит сильный удар по численности населения в каждой стране и занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний по числу заболевших. Опираясь на работы Jacques Ferlay – руководителя ежегодными статистическими исследованиями в международном агентстве по исследованию рака, можно заметить ужасающую тенденцию, что за последнее десятилетие количество новых случаев развития опухолевых заболеваний возросло почти в полтора раза с 14.1 млн. до 19.3 млн. Смертность, по разным оценкам, тоже возросла на 2 млн., что можно связать с ростом населения за это же десятилетие на миллиард [2, 4, 5].

Также по выводам ВОЗ и группы Jacques Ferlay существует около 20% риска заболеть раком в течении жизни до 75 лет включительно и 10% риска смерти от этого заболевания. Самым распространенным видом злокачественного новообразования является рак молочной железы с 2.26 млн случаев, но одновременно указанный вид опухоли является и самым щадящим и приводит к летальному исходу в четверти случаев [1, 2]. Это все показывает какой пласт проблем требуется решить современному научному сообществу при разработке новых лекарственных препаратов для конкретного новообразования.

Несмотря на большой прогресс в разработке противоопухолевых препаратов, все еще существуют множественные препятствия на пути групп исследователей. К таким препятствиям можно отнести низкую эффективность, особенно по истечении времени, когда у опухолевой клетки развивается резистентность, являющаяся причиной неудачного лечения в 90% случаев. Также ряд препаратов не могут использоваться вместе, поскольку приводят к сильной токсичности для пациента, что серьезно влияет и на жизнь человека, и на дальнейшее планирование того, какие препараты следует использовать для эффективного лечения.

Поэтому поиск новых и безопасных противораковых препаратов, которые заключаются в разработке соединений с высокой селективностью к мишени является важной темой современных исследователей. Одним из частых подходов является разработка будущей малой молекулы на базе хорошо зарекомендовавшего себя структурного мотива, являющимся пусть и не универсальным, но в определенной мере облегчающим разработку. [6, 7].

Целью данной работы является синтез новых производных 7-азаиндола, направленных на противоопухолевые биологические мишени.

Для достижения данной цели требуется:

1. Оценить *in silico* возможность связывания в сайте мишени библиотеки исследуемых соединений.
2. Провести синтез производных 7-азаиндола, соответствующих общему разработанному дизайну лигандов.
3. Провести *in vitro* тестирование разработанных малых молекул.

1 Литературный обзор

1.1 Азотсодержащие гетероциклические соединения в качестве скаффолда для биологических мишеней

Гетероциклические соединения можно обнаружить во многих природных источниках, где они выполняют разнообразную роль, начиная от биологически активных молекул, регулирующих процессы в организме, заканчивая красителями и другими продуктами растительного сырья. За последние десятилетия интерес к таким типам соединений не угас, а наоборот набирал обороты, ведь значительная часть из таких молекул могла быть применена в фармацевтике в качестве лечебных препаратов [8].

Многие гетероциклические соединения хорошо себя продемонстрировали в качестве скаффолдов для противоопухолевых средств с различными клеточными эффектами: индукцией апоптоза, протеосомной деградации, остановкой клеточного цикла на одной из фаз и т.д [9]. В пример разнообразия скаффолдов можно привести соединения, одобренные FDA за последние 10 лет (рисунок 1) [10].

Например, препарат Alectinib (**1**), который был разработан для лечения ALK-позитивного рака легких и имеющий в своей структуре индольный скаффолд. Alectinib функционирует как специфический конкурентный ингибитор АТФ рецепторных тирозинкиназ. Благодаря блокированию сайта связывания АТФ, фосфорилирование нарушается, что препятствует активации сигнального пути STAT, PI3K/AKT, которые рекрутируются фосфорилированными участками на ферменте ALK [11].

Препарат Panobinostat (**2**), направлен на лечение множественной миеломы и тоже содержит индольный скаффолд в структуре. Механизм действия заключается ингибировании HDACs I, II и IV классов в низких наномолярных концентрациях, что свидетельствует о пан-DAC активности [12, 13].

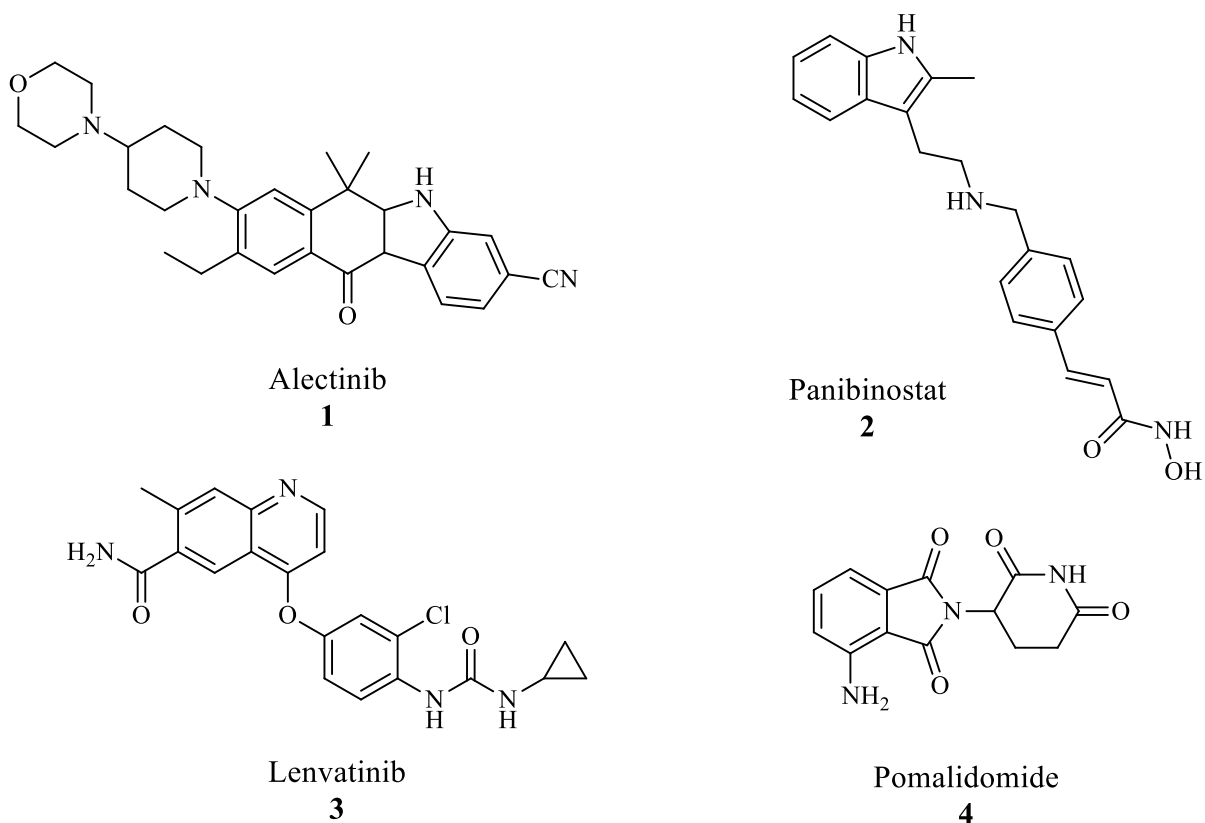


Рисунок 1 – Структуры гетероциклических соединений одобренных FDA

Другим скаффолдом в своей структуре обладает Lenvatinib (3) он содержит хинолиновый фрагмент. Lenvatinib – это мультитаргетный ингибитор рецепторной тирозинкиназы, который ингибирует киназную активность всех рецепторов VEGF (Flt-1, KDR, VEGFR3), FGFR1-4, PDGFR α и ряда других белков. Помимо их роли в нормальной клеточной функции, эти киназы были вовлечены в патогенный ангиогенез, рост опухоли и прогрессирование рака. Lenvatinib разрабатывался для лечения солидных опухолей, в первую очередь рака щитовидной железы [14].

Последним примером можно назвать Pomalidomide (4), содержащий изоиндол в структуре. Механизм действия завязан на протеосомной деградации белков интереса – системе PROTAC, где Pomalidomide используется в разработке деградирующих белков, нацеленных на CRBN. Pomalidomide является одним из лигандов, используемых для нацеливания на

Е3 лигазу, которая в дальнейшем и отвечает за деградацию необходимого белка [15-17].

Показанные соединения не покрывают всего того разнообразия скаффолдов, которого достигло научное сообщество за все эти годы. Некоторые из них не позволяют достигнуть необходимой селективности или эффективности. Поэтому на данный момент предпринимаются попытки поиска структуры, обладающей свойствами для быстрой разработки аналога соединения при возникновении резистентности.

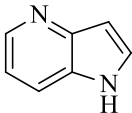
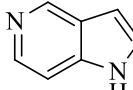
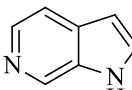
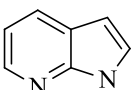
Одним из первых, часто используемых гетероциклов был индол из-за своего широкого распространения в природе качестве алкалоидов [18]. Данный скаффолд использовался при разработке гербицидных [19] и инсектицидных препаратов [20]. В терапии индольное кольцо встречается в противосудорожных [21, 22], противовоспалительных [23] и противовирусных препаратах [24]. Среди противоопухолевых средств уже достаточно давно успешно были разработаны ингибиторы RTK, c-Kit и EGFR и многих других киназ [25-27].

Недостаток данного скаффолда в том, что ингибиторы не всегда получают высокоселективными и эффективными. Это может быть связано с тем, что структура получается перегруженной из-за карбонильной группы во 2 положении и необходимости во введении заместителей в 3 для взаимодействия с АК. Это объясняется киназным паттерном, образующимся NH в структуре индола и карбонильной группой во 2 положении, что позволяет глубже связаться ингибитору в АТФ сайте, но также снижает мобильность для взаимодействия с другими АК, располагающимися неподалеку [28, 29].

1.2 Азаиндол и его производные в качестве скаффолда для биологических мишеней

Азаиндолы интересны с точки зрения оптимизации лекарственных средств, несмотря на их редкость в природе по сравнению с другими гетероциклами [30]. Многие характеристики можно модулировать, используя ядро азаиндола вместо других бициклических слитых гетероциклов [31].

При изучении вопроса о том какое азаиндольное производное чаще всего используется при разработке препаратов можно предположить, что из-за сходства с метаболитами индола это должно быть 5-азапроизводное [32]. Однако данные, представленные на рисунке 2, показывают совсем иную картину.

Scifinder				
	4-Azaindole 5	5-Azaindole 6	6-Azaindole 7	7-Azaindole 8
Chemical structures:	16505	13632	34762	100384
Commercially available:	2517	2006	2749	4273
References (patents):	2158 (1187)	2923 (961)	10497 (1756)	6576 (2863)

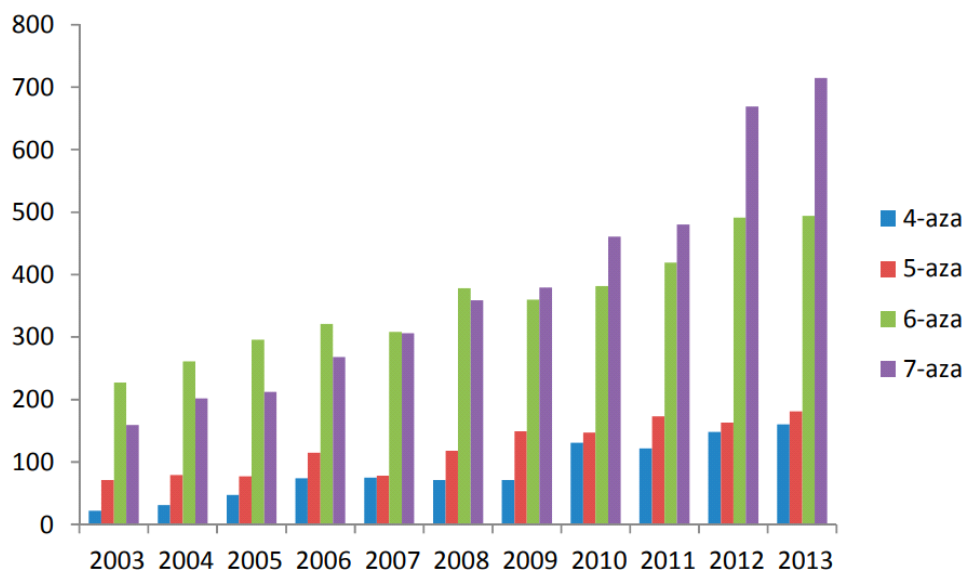


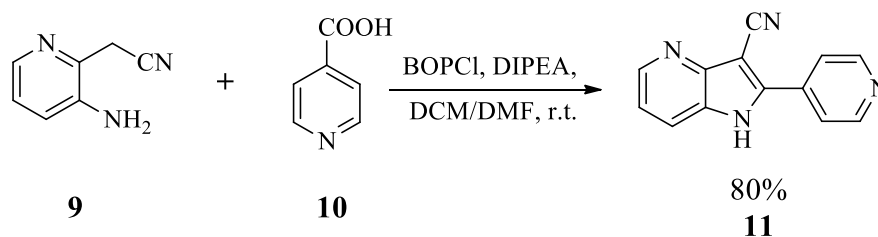
Рисунок 2 – Статистика использования скаффолдов производных азаиндола в литературе

Данные за период с 2003-2013 годы [32] показывают, что самым используемым и доступным с коммерческой точки зрения (более чем в 2 раза больше доступных производных), скаффолдом является 7-азаиндол.

Дополнительно отмечается, что 7-азаиндолный скаффолд обладает хорошей селективностью и эффективностью из-за наличия киназного паттерна в изначальной структуре. Этот паттерн образуется аминогруппой в пиррольной части и азотом в пиридиновой части молекулы [33].

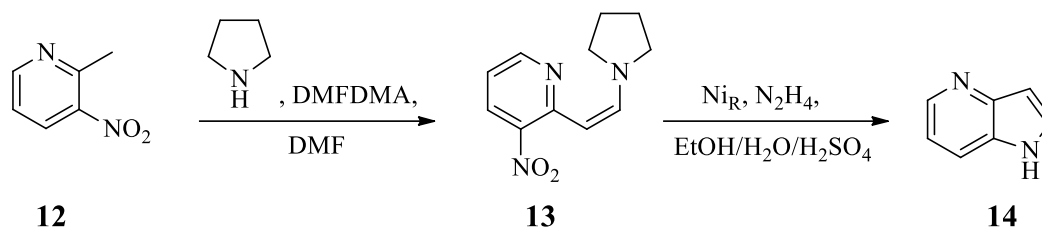
Для получения производных азаиндола в основном используются реакции образования пиррольного кольца [34], так, например, функциональный 4-азаиндол можно синтезировать по модифицированной реакции Маделунга, с высоким выходом от 50-80% в зависимости от субстрата. В работе [35] 2-пиридин-3-цианометил-4-азаиндол (**11**) образовывался из 3-амино-2-цианометилпиридина (**9**) при использовании *n*-карбоксипиридина (**10**) и активирующего реагента BOP по схеме 1.

Схема 1



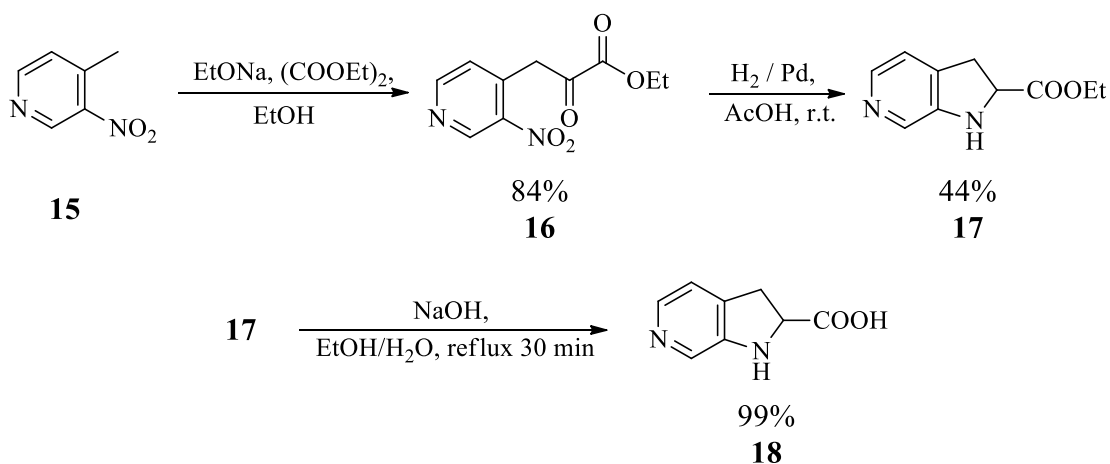
К еще одному способу синтеза 4-азаиндольного кольца относится синтез по Лемгруберу-Бача [36, 37], представленный на схеме 2. В данном синтезе при действии на 2-метил-3-нитропиридин (**12**) пирролидина с DMFDMA образуется енамин (**13**), который циклизуется до 4-азаиндола под действием восстанавливающих реагентов.

Схема 2



Для получения 6-азаиндольного кольца можно применить синтез по Рейсерту, что показано на схеме 3. В результате трехстадийного синтеза образуется 2-карбокси-6-азаиндол (**18**), где карбоксильная группа может быть удалена при необходимости под действием высокой температуры [38].

Схема 3

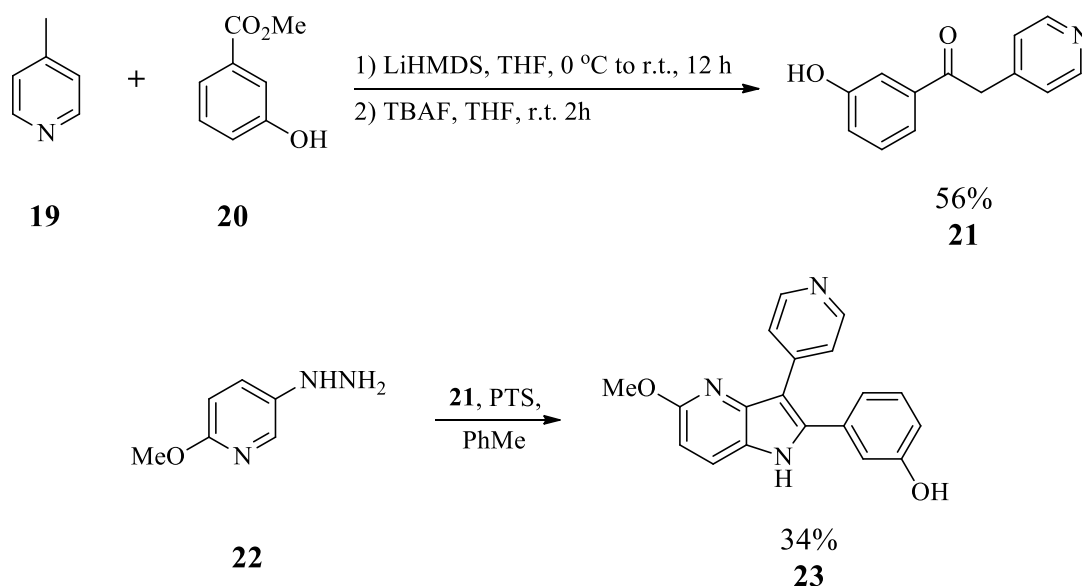


Стоит сказать, что при помощи этих реакций можно получать разные производные азаиндола, а не только указанные на схемах. Охватить все возможные способы образования пиррольного кольца нетривиальная задача из-за постоянного развития синтетических возможностей. Ведь за несколько лет, мы перешли от циклизации по Лоренцу [39], по которой синтезировались 7-азаиндольные структуры с 52% выходом, до вариаций кросс-сочетания, где выход конечного продукта может достигать 91% [40].

Азаиндол в качестве скаффолда для противоопухолевых препаратов используется давно, поэтому для его производных изучены важные взаимодействия, обеспечивающие хорошее связывание в активном сайте белков. Первым примером удачного использования производного азаиндола была работа Frederic Pin с коллегами [41]. Группу ученых заинтересовала работа японских коллег [42], где утверждалось о возможном использовании 4-азаиндола в качестве скаффолда для синтеза и изучения на их основе нового ряда ингибиторов 1 типа для белка GSK3 β .

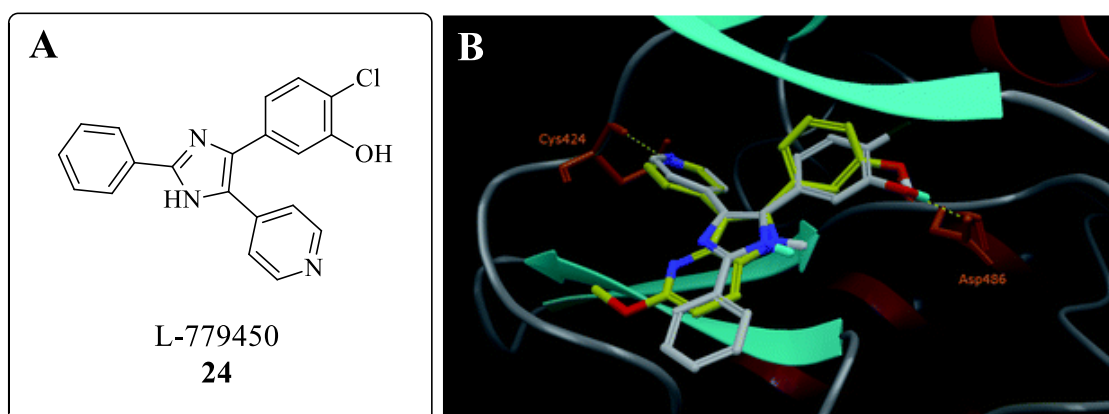
В статье Frederic Pin осуществил синтез и проверил данное утверждение для других киназ. На панели из всех молекул, соединение **23** продемонстрировало хорошую ингибирующую активность к RAF-1 и DYRK1A, со значениями IC₅₀ = 0.286 и 0.7 μ Моль соответственно. Синтез соединения лидера представлен на схеме 4.

Схема 4



По итогам SAR оптимизации выявили, что для регулирования активности к белкам важны 2- и 3- положения. Модифицируя их можно сильно влиять на селективность. Например, замена бензольного кольца во 2

положении полностью нарушает ингибирование RAF-1, не затрагивая активность к белку DYRK1A. Молекулярный докинг (рисунок 3) с использованием соединения **24** в качестве эталонного, показал сильное совпадение по необходимым взаимодействиям. Правда 4-азаиндольный скаффолд в обеих работах не проявляет взаимодействий с АК, предполагается лишь то, что азот в 4 положении сохраняет водородные связи с водой вокруг каталитического сайта [41, 42].



A – Структура эталонного соединения; B – Связывание соединений 23 и 24 в активном сайте RAF-1 (**23** – зеленый; **24** – серый)

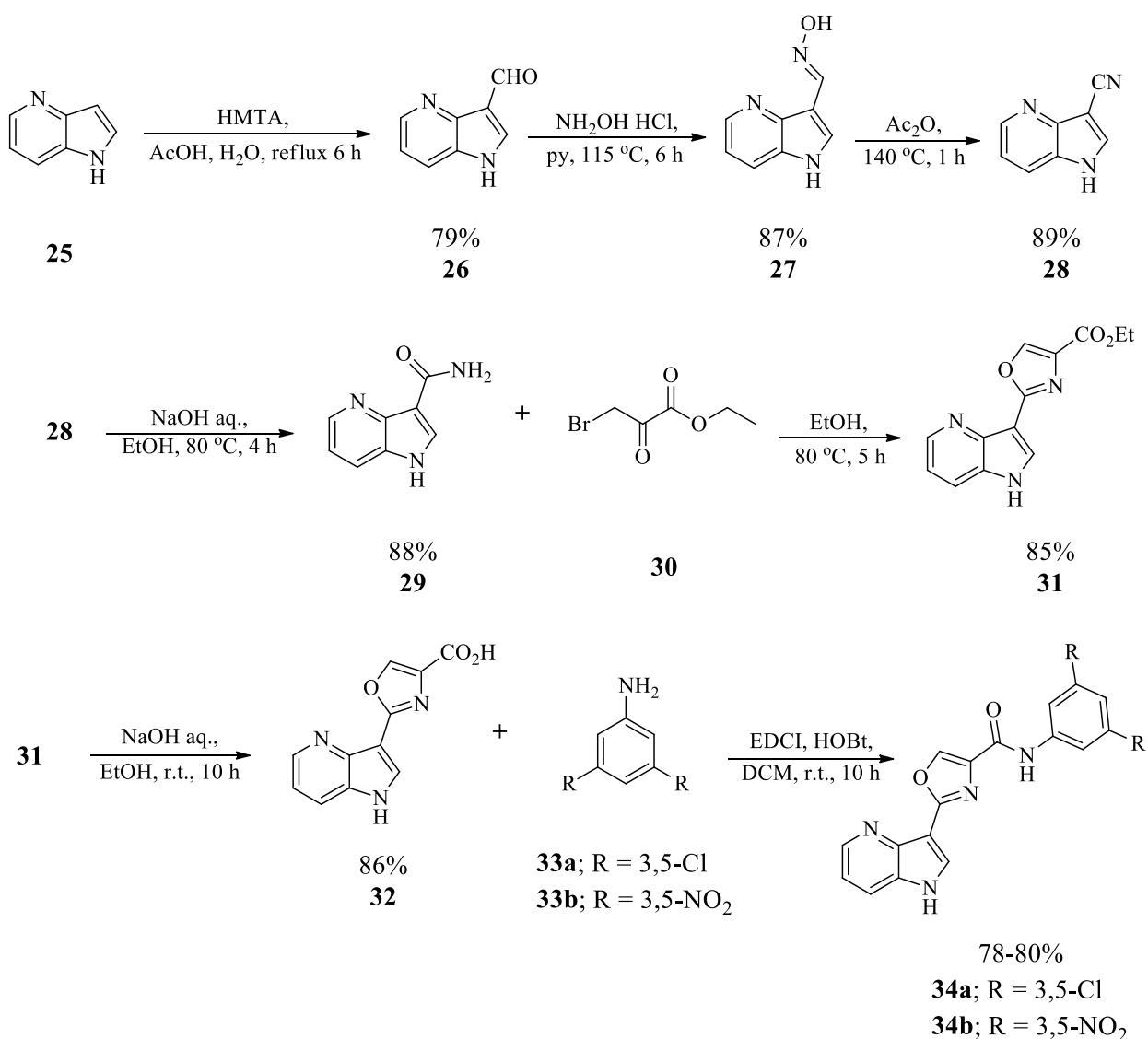
Рисунок 3 – Молекулярное моделирование соединений лидеров RAF-1 и DYRK1A

К другим выводам пришли авторы в исследовании [43], где на противоопухолевую активность в отношении EGFR проверяли новый ряд амидных производных азаиндол-оксазолов. На этапе оптимизации самыми активными были соединения **34a** и **34b**, синтезированные по схеме 5, со значениями $IC_{50} = 360$ и 340 нМоль соответственно.

Синтез соединений производился путем модификации 4-азаиндола (**25**) в семь этапов с выходами около 80% на каждой из стадий. Первоначально в β -положение вводилась формильная группа через реагент НМТА с образованием продукта **26**. Данный продукт под действием гидроксиламина образовывал альдоксим (**27**), способный под действием ацилирующих

агентов переходить в нитрил (**28**). Нитрил в последствии гидролиза приводил к амиду (**29**), способному к гетероциклизации с получением оксазола (**31,32**). Структурное разнообразие достигалось путем карбодиимидной активации карбоксильной группы реагентом EDCI с добавлением HOBT, для увеличения скорости реакции, и соответствующим амином.

Схема 5



Для изучения взаимодействий, отвечающих за связывание в АТФ сайте, использовали методы молекулярного моделирования (рисунок 4). Было выявлено три ключевых водородных взаимодействия с АК на расстоянии

2.5-3 Å: Thr830 и кислород оксазола, Met769 и амидная группа, Asp831 и азот азаиндола, все водородные взаимодействия показаны белыми пунктирными линиями. Данные соединения в дальнейшем будут изучаться для выявления других взаимодействий и увеличения потенции к мишени.

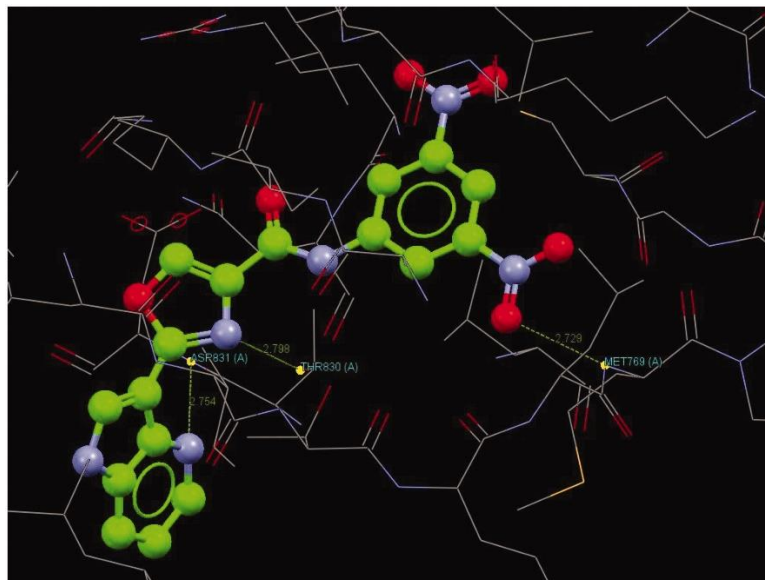
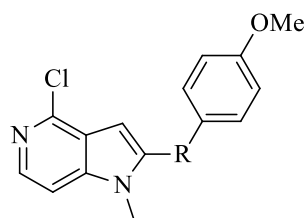


Рисунок 4 – Ключевые взаимодействия соединения **34a** в АТФ сайте EGFR

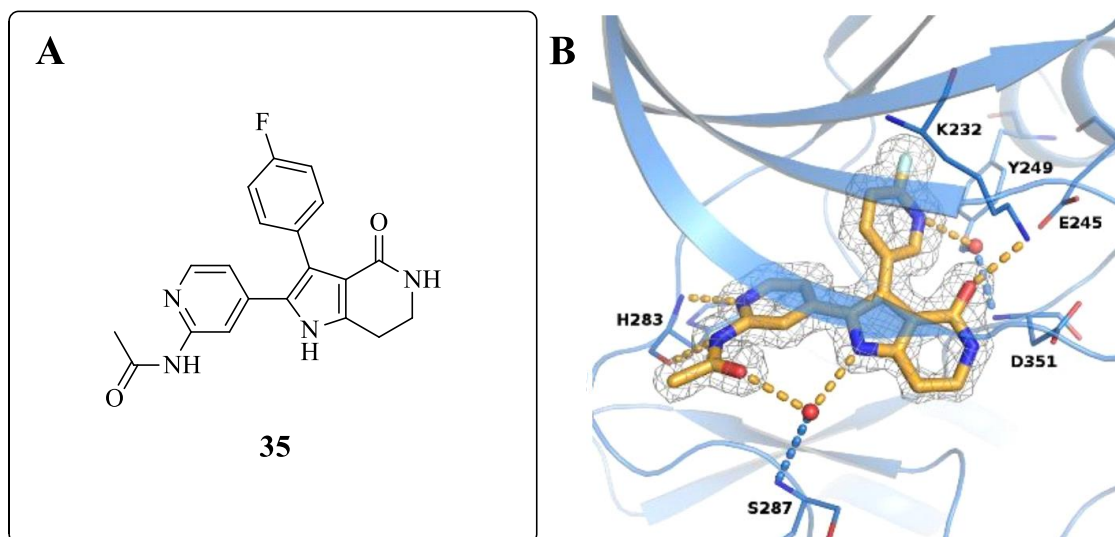
Одним из первых примеров разработки новой платформы для обратимых ингибиторов полимеризации микротрубочек является работа Renaud Prudent [44]. Данная статья заложила основы для дополнительных оптимизаций соединений, поскольку структура полученных ингибиторов была облегчена по сравнению с теми, которые использовались на тот момент. Ингибиторы имели в своей основе 5-азаиндольный скаффолд (рисунок 5) и успешно ингибировали рост микротрубочек в диапазоне от 0.1 до 12.7 μM на клеточной линии с множественной лекарственной резистентностью (MDR).



R = CH(CH₃); C=CH₂; C=O; C(OH)CH₃

Рисунок 5 – Представленный в статье скаффолд для соединений лидеров

В 2018 году группой во главе с Yong Zhang проводилась работа над исследованием новых ингибиторов TGF β [45]. Опираясь на хорошо известный 5-азаиндольный скаффолд (**35**) и его кристаллическую структуру в активном сайте белка (рисунок 6) было выявлено, о сильном влиянии на потенцию 3-го положения азаиндольного ядра. Такие выводы сделаны на основе того, что само ядро и амидный радикал глубоко погружены в сайт связывания, в то время как другие группы находятся в чуть более гибком состоянии.

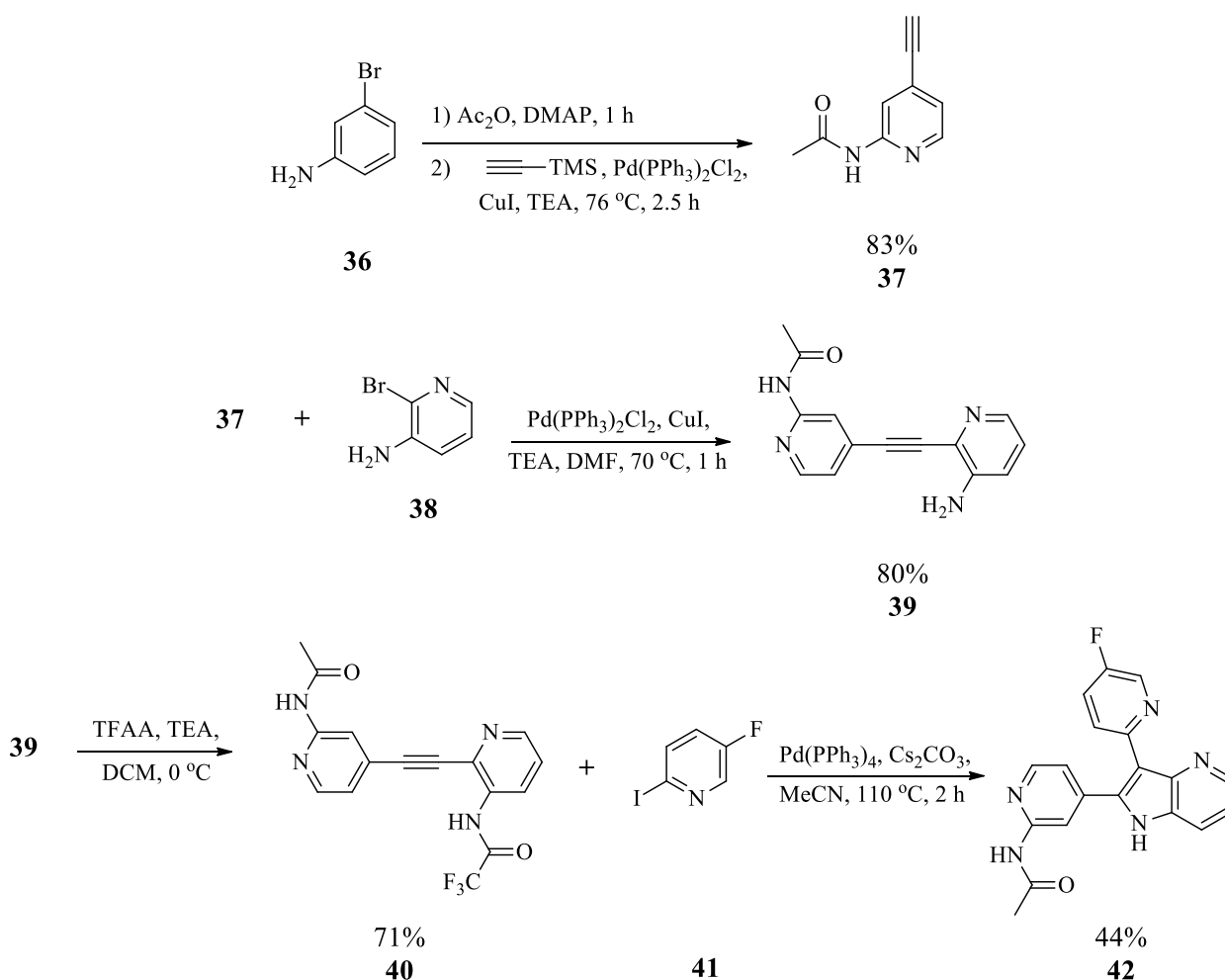


А – Структура исследуемого соединения **35**; В – Связывание соединения **35** в активном сайте TGF β R1

Рисунок 6 – Молекулярное моделирование соединения лидера для TGF β R1

Авторами была проверена гипотеза о сильной гибкости АТФ сайта с использованием соединений, синтезированных по схеме 6 с использованием нескольких реакций кросс-сочетания: по Соногашире и по Какчи. Выводом работы стало утверждение, о приемлемой гибкости сайта без нарушения водородных взаимодействий, которые достигались дополнительным связыванием с водой. Также указано о возможности менять скаффолд на другие азаиндолные производные с дополнительным увеличением потенции к мишени.

Схема 6



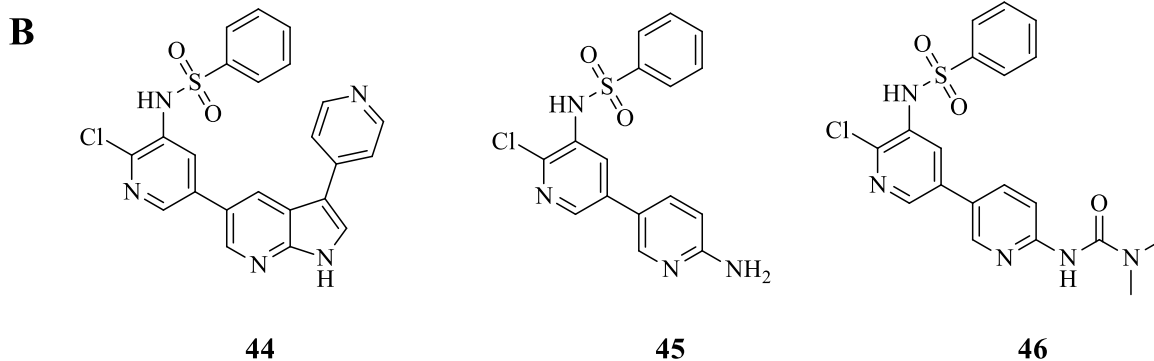
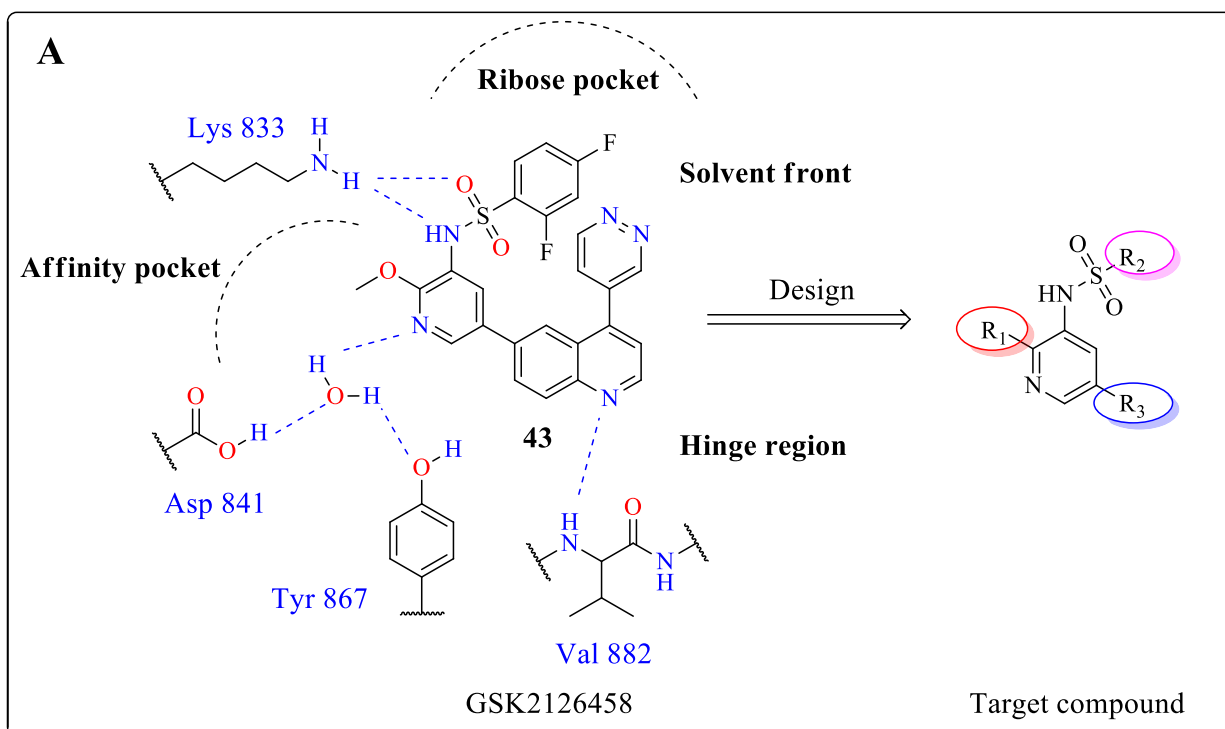
Из вышеописанных статей можно сделать вывод об успешном и частом использовании производных азаиндола в качестве структурного ядра для разработки противоопухолевых препаратов. Данное ядро очень легко модулировать и тем самым синтезировать новые структурные ряды, это связано с большим количеством реакций образования азаиндольного кольца и не менее обширным количеством реакций его модификации. Известно, что скаффолд легко связывается глубоко в активном сайте и эффективность зачастую зависит от 2-го и 3-го положений заместителей. Но есть и исключения, где азаиндольный фрагмент направлен к растворителю, поэтому чтобы этого избежать можно использовать 7-азаиндол, обладающий киназным паттерном, способным еще лучше связываться в активном сайте белка. Поэтому стоит рассмотреть действительно ли 7-азаиндольная структура исключает неудачные взаимодействия и позволяет наиболее явно регулировать активность к белку.

1.3 7-Азаиндол в качестве скаффолда для биологических мишеней

Данный обзор, посвященный синтезу и использованию азаиндолов для разработки новых ингибиторов киназ, показывает, что платформа на основе 7-азаиндола может быть успешнее реализована для данных целей по нескольким причинам: наличие киназного паттерна в изначальном скаффолде, высокая биосовместимость из-за биоизостерности к индольному кольцу и легкость в модификации структуры. Каждый год количество литературных ссылок с упоминанием в них 7-азаиндола растет, что доказывает эту теорию. А использование привычных реакций лийтирования, кросс-сочетаний и циклизации является ключом для структурного разнообразия препаратов. И данный раздел показывает каких сложных структур можно достичь и на какие белки можно взаимодействовать, используя единый скаффолд.

1.3.1 Ингибиторы PI3K

К настоящему времени известно несколько ингибиторов PI3K γ , которые можно разделить на две основные категории: пан-ингибиторы и селективные. Первые нацелены на все формы p110, вторые на какую-либо конкретную isoформу. Некоторые из таких ингибиторов вошли в клинические испытания как таргетные противоопухолевые препараты — это, например, GSK2126458 (43, рисунок 7).



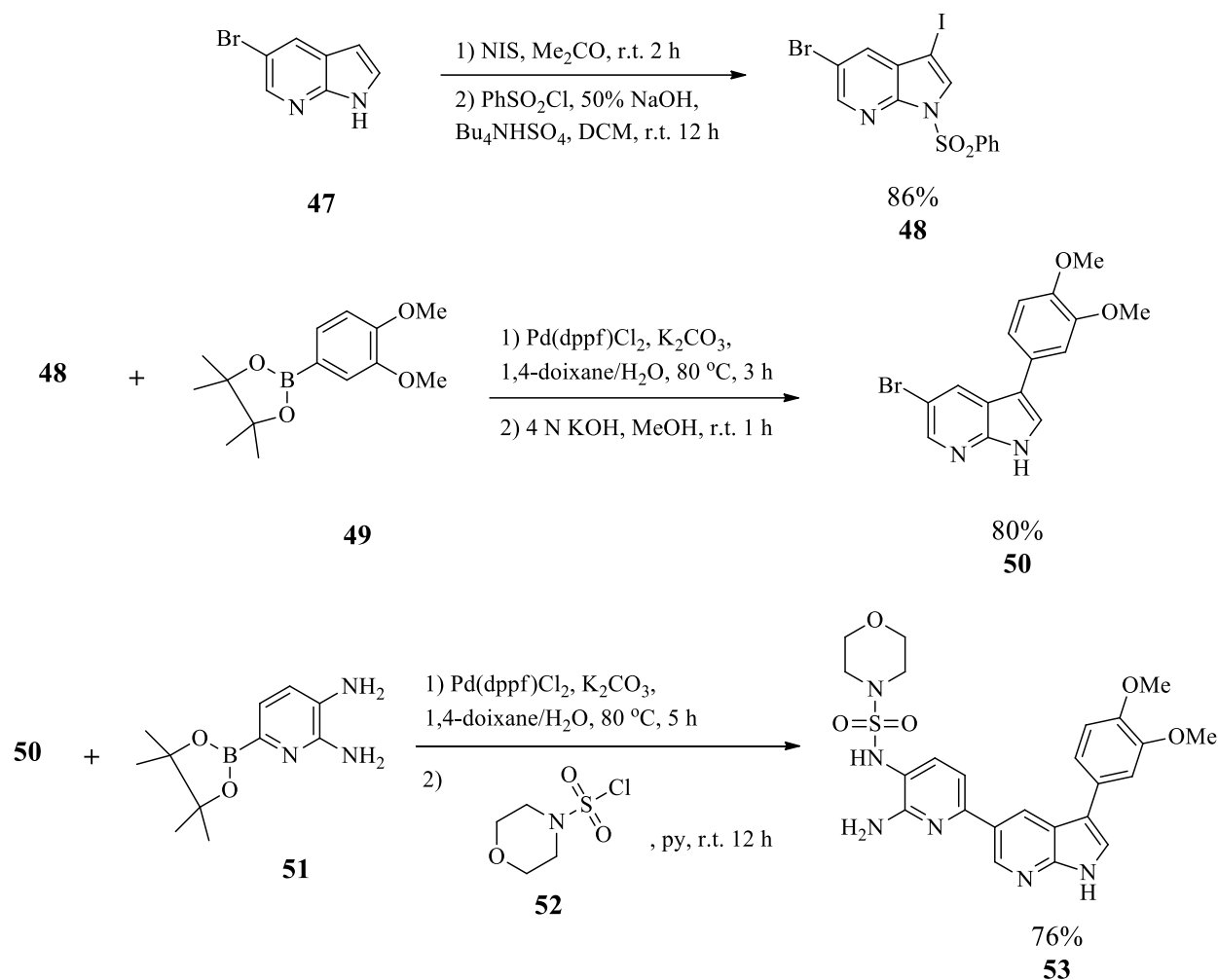
A – Фармакофорная модель с основными взаимодействиями для мишени PI3K γ ;
B – Соединения лидеры

Рисунок 7 – Общая стратегия оптимизации и соединения лидеры

Конечно в своей первоначальной структуре в данной молекуле не присутствует индольный фрагмент, но авторы статьи [46] провели ряд умозаключений, чтобы подобрать фармакофор и на его основе провести оптимизацию, что привело к интересным результатам.

Изначальное хинолиновое ядро использовалось для взаимодействия в шарнирной области с Val882, но водородная связь была единичной. Поэтому были предложены структуры увеличивающие количества этих взаимодействий. По итогам оптимизации 7-азаиндольный фрагмент (44) увеличил потенцию к мишени $IC_{50} = 0.5$ нМоль против 375 нМоль первоначального соединения (45) без явного паттерна к нескольким водородным связям, из-за одной донорной аминогруппы. Доказательством, что это не случайность, может служить факт, что все заместители, не только индольные, проявляли положительный эффект на ингибирование мишени. Сюда можно отнести соединение (46) с фрагментом мочевины и значениями $IC_{50} = 68$ нМоль, который достаточно часто используется в ингибиторах [46].

Для разработки препаратов требуется большое количество различных подходов. Большинство описанных выше примеров были разработкой ингибиторов 1 типа, такие молекулы конкурируют за связывание в АТФ сайте с самой молекулой АТФ за счет того, что некоторые гетероциклические фрагменты имитируют пиримидиновую часть АТФ. Но есть пример других таких ингибиторов 2 типа, где соединения связываются в рядом располагающемся DFG мотиве [47, 48]. И совершенно неудивительно, что первые соединения нового типа были направлены на мишень PI3K γ и содержали в структуре 7-азаиндольный фрагмент. И такая стратегия подходит для данного соединения, ведь ряд азаиндола и его производных достаточно просто синтезируются по схеме 7 [46].



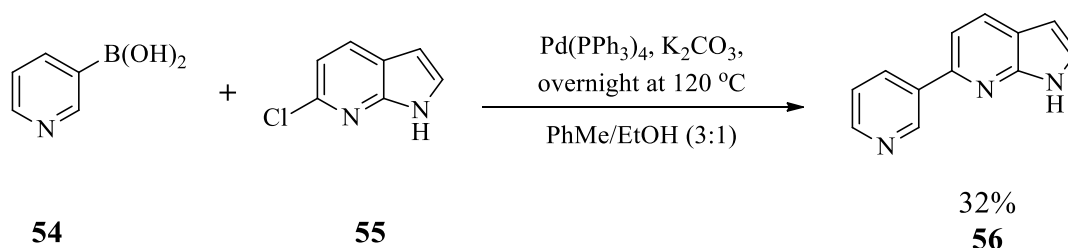
Для получения ряда соединений в данной статье использовалась селективная реакция кросс-сочетания по Сузуки, где индольный фрагмент (**48**) выступал в качестве арилгалогенида, полученного из коммерчески доступного 5-бром-7-азаиндола (**47**) по реакции Воля-Циглера [46].

1.3.2 Ингибиторы CDK9/Cyclin T

В исследовании Lianie Pieterse [49] оценивался ингибирующий потенциал двух структурно родственных серий в отношении CDK9. Данный белок как и все CDK отвечает за регуляцию клеточного цикла, путем связывания с циклинами, для данной киназы циклин T и циклин K. Первая серия состояла из 6-замещенных производных 7-азаиндола, вторая – из 4-замещенных 7H-пирроло[2,3-d]пиримидина. В данном исследовании

соединения были синтезированы похожим образом, что и для РІЗКγ – по реакции Сузуки-Мияура, как на схеме 8 [50].

Схема 8



Соединение **56** в прошлой работе показало себя неплохо по отношению к протеинкиназе Haspin со значениями $IC_{50} = 13 \mu\text{Моль}$. Поэтому группа ученых во главе с Lianie Pieterse решили повторить свое прошлое исследование, где они работали с этой мишенью. Синтез соединений не претерпел изменений, поэтому в данном случае стоит указать на потенциал полученных соединений в качестве двойных ингибиторов, ведь по сравнению с работой выше, аффинность к белку Haspin была увеличена в десятки раз. До 206 нМоль в отношении CDK9/Cyclin T и 118 нМоль в отношении Haspin для соединения **57-59** (рисунок 8).

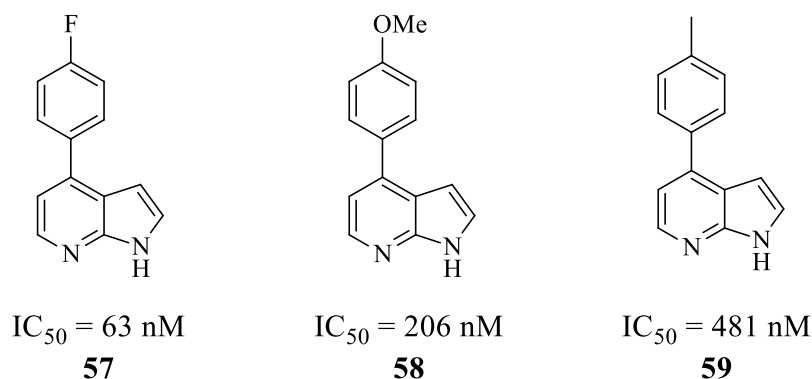


Рисунок 8 – Соединения хиты способные к двойному ингибированию CDK9/Haspin

Двойное ингибирование мишеней способно дать дополнительный антимиотический эффект и требует клинических исследований [51].

Данные работы показывают каким потенциалом обладает структурное ядро 7-азаиндола. Дополнительная простая модификация позволяет данной структуре быть стартом для многих рядов вероятных клинических кандидатов с разнообразными мишенями. Также из одного соединения, как показано в статьях выше, может получиться либо двойной агент, либо партнер для синергии.

1.3.3 Ингибиторы c-Met

Китайская группа ученых описала в статье [52] синтез и оптимизацию ряда производных 7-азаиндола с дигидропиридазиновым фрагментом для ингибирования белка c-Met – рецепторной тирозинкиназы, отвечающей за сигналинг, приводящий к регенерации тканей, ангиогенезу и усилению подвижности клеток. Как и любой белок при абберации он приводит к постоянной пролиферации клеток, что в конечном итоге способствует метастазированию опухоли [53].

Ряд новых соединений анализировался на четырех клеточных линиях с Foretinib (**60**) в качестве положительного контроля ($IC_{50} = 2.05 \mu\text{Моль}$). В итоге было определено соединение лидер (**61**) (рисунок 9), обладающий большей потенцией к мишени ($IC_{50} = 1.06 \mu\text{Моль}$) [53].

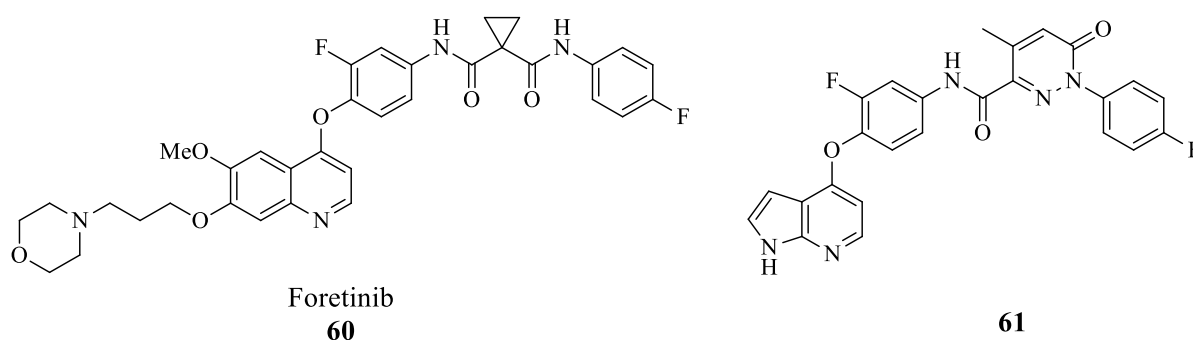
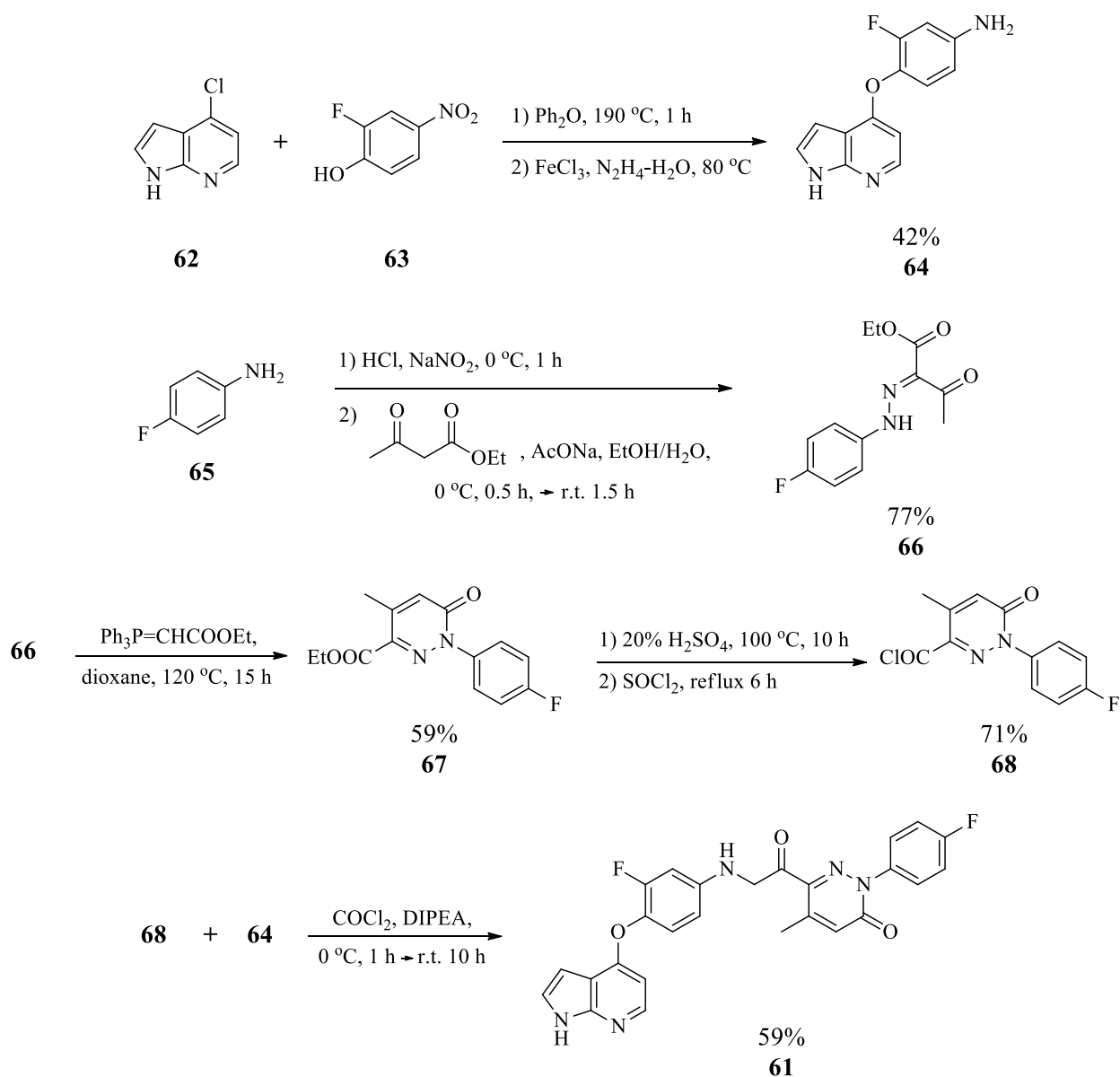


Рисунок 9 – Положительный контроль Foretinib и соединение лидер **61**

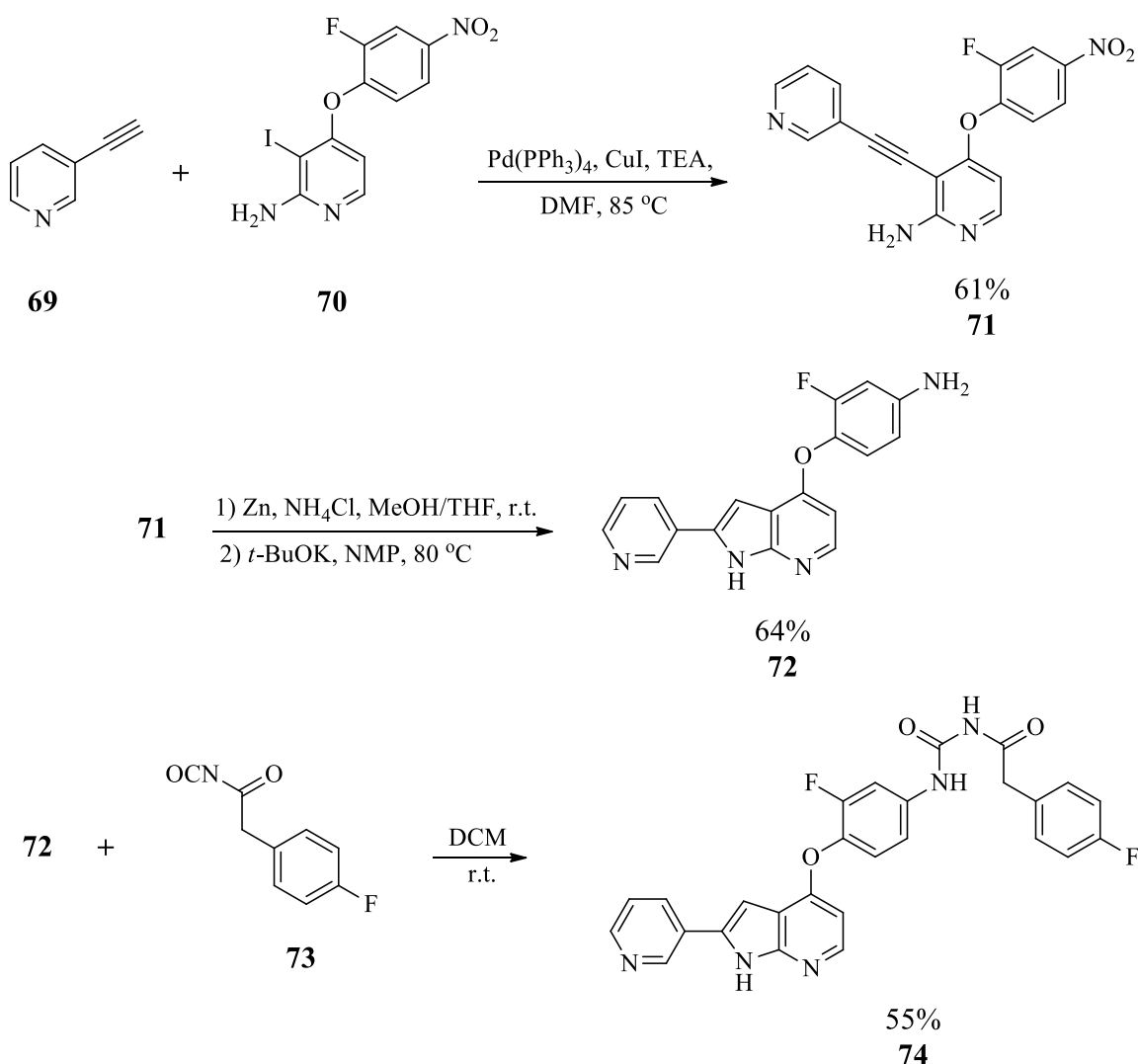
Дополнительно отмечается, что снижение площади полярной поверхности соединения в будущем должно благоприятно повлиять на проницаемость и биодоступность. Хинолиновый фрагмент был заменен на 7-азаиндольный, который был использован для более удобного связывания с Met1160 в АТФ сайте. Общий синтез соединения был упрощен за счет того, что азаиндольный фрагмент был в терминальной части конечной молекулы и использовался для реакции этерификации как представлено на схеме 9 [53].

Схема 9



Совершенно другой подход к синтезу был использован в работе Zhen-Wei Cai, где полученный ингибитор **74** обладал значениями IC₅₀ для с-Met: 50 нМоль и был получен путем цепочки реакций. Изначально из функционального 2-амино-4-(*n*-нитро-*o*-фторфенокси)-3-йодпиридина (**70**) по реакции кросс-сочетания по Соногашире был получен интермедиат **71**, который в дальнейшем циклизовался под действием основания *t*-BuOK в NMP и нитро группа восстанавливалась цинком с хлоридом аммония с получением **72**. В дальнейшем широкий ряд производных получался путем образования амидной связи у мочевиного фрагмента с помощью ацилизоцианата (**73**) как показано на схеме 10 [54, 55].

Схема 10



1.3.4 Ингибиторы BRAF

Привлечение киназы BRAF в качестве мишени для лечения рака обусловлено биологической важностью сигнального пути Raf-Mek-Erk в стимулировании пролиферации и выживании клеток. Уже одобрено несколько ингибиторов BRAF как Sorafenib (**75**) [56] и SB-590885 (**76**) [57] (рисунок 10), но их проблема в том, что они недостаточно селективны к мишени и ингибируют еще и VEGFR2, что в некоторых случаях может лишь навредить пациенту, так как частично нарушается процесс ангиогенеза в здоровых клетках [57].

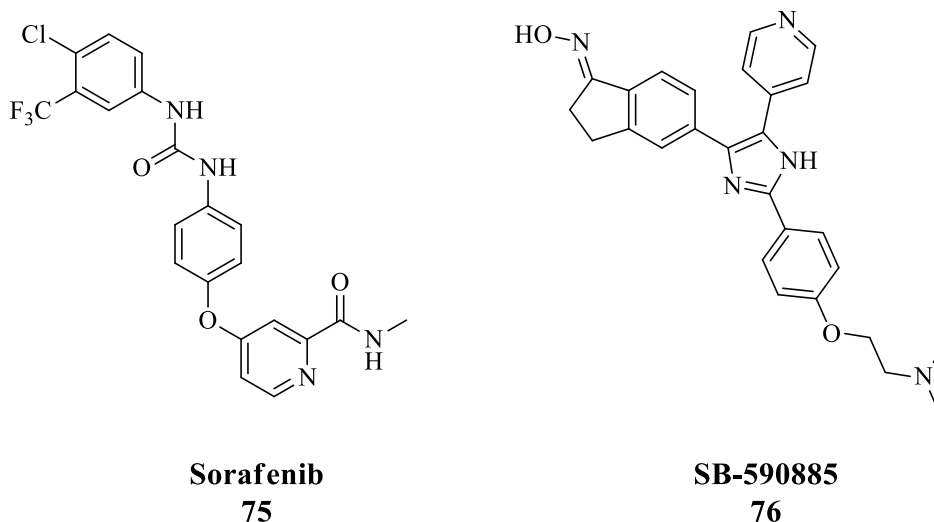


Рисунок 10 – Неселективные ингибиторы BRAF

Поэтому авторы данной статьи решили увеличить селективность соединения путем полного изменения скаффолда. Их новое производное 7-азаиндола продемонстрировало отличную эффективность в отношении мишени с наномолярным значением IC_{50} . Полученный ингибитор стал селективнее по отношению к VEGFR2 и другим киназам на пару порядков [57].

Было это достигнуто путем разработки фармакофорной карты (рисунок 11) с критическими областями связывания в АТФ сайте. Все киназы

разрабатываются с опорой на похожие карты, но данный пример лишь для BRAF. Для связывания в *шарнирной области* использовался азаиндол как обладатель киназного паттерна. *Внутренний гидрофобный карман* подразумевает ароматическое кольцо или его биоизоостер. Сам карман большой и подстраивается под молекулу, важно лишь связаться с гибким Phe594 (для киназы BRAF). Для *линкера* использовали фрагмент мочевины из Sorafenib, плюс мочевины должна обеспечить связь с Glu500. Дополнительно для увеличения селективности была предусмотрена *направляющая молекула* – 1,3,4-тризамещенный 1H-пиразол, для более глубокого связывания в сайте.

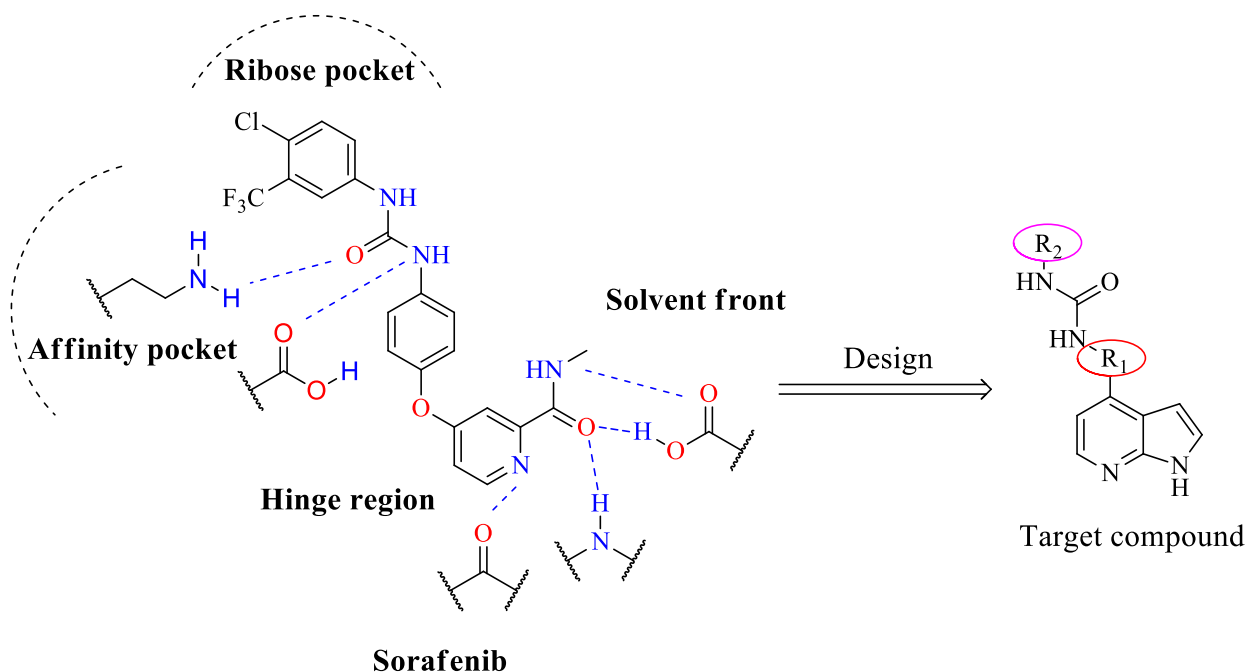
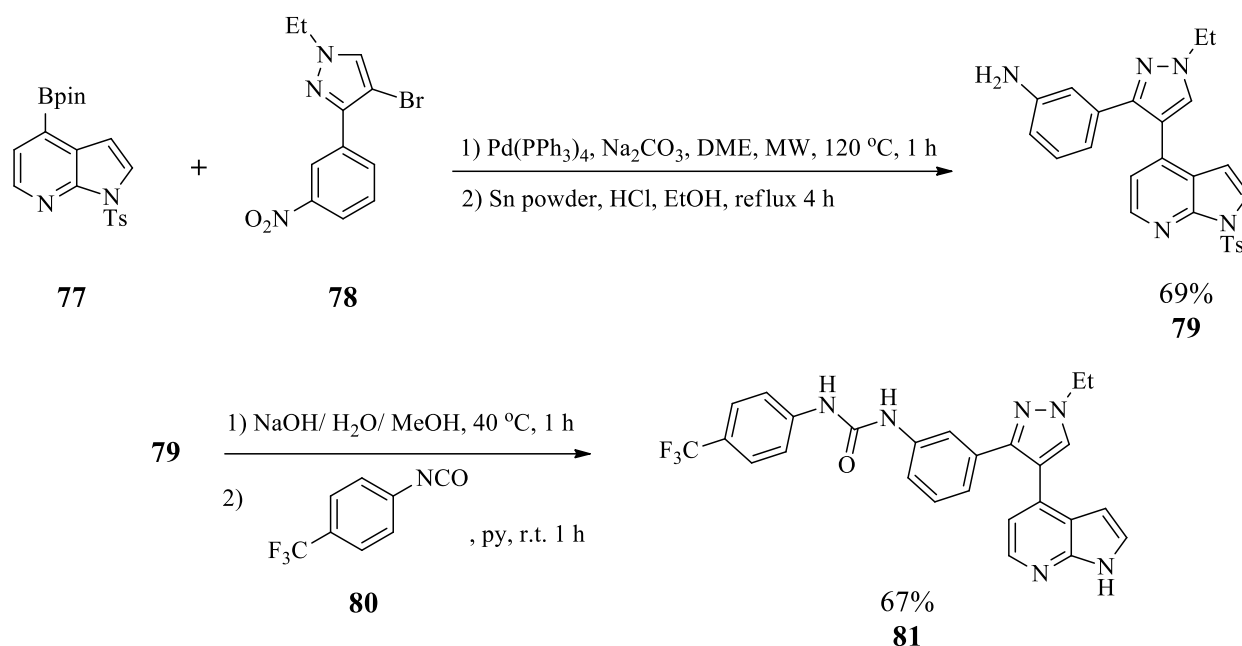


Рисунок 11 – Фармакофорная модель для АТФ сайта киназы BRAF

Ингибитор синтезировался по схеме 11 путем модификации готовой азаиндолбороновой кислоты (**77**) с производным бромимидазола (**78**) для получения продукта кросс-сочетания с последующим его восстановлением порошком олова до соединения **79**. Сам ингибитор **81** получили после образования мочевинового фрагмента соединения **79** с 4-трифторметил-фенилизоцианатом.



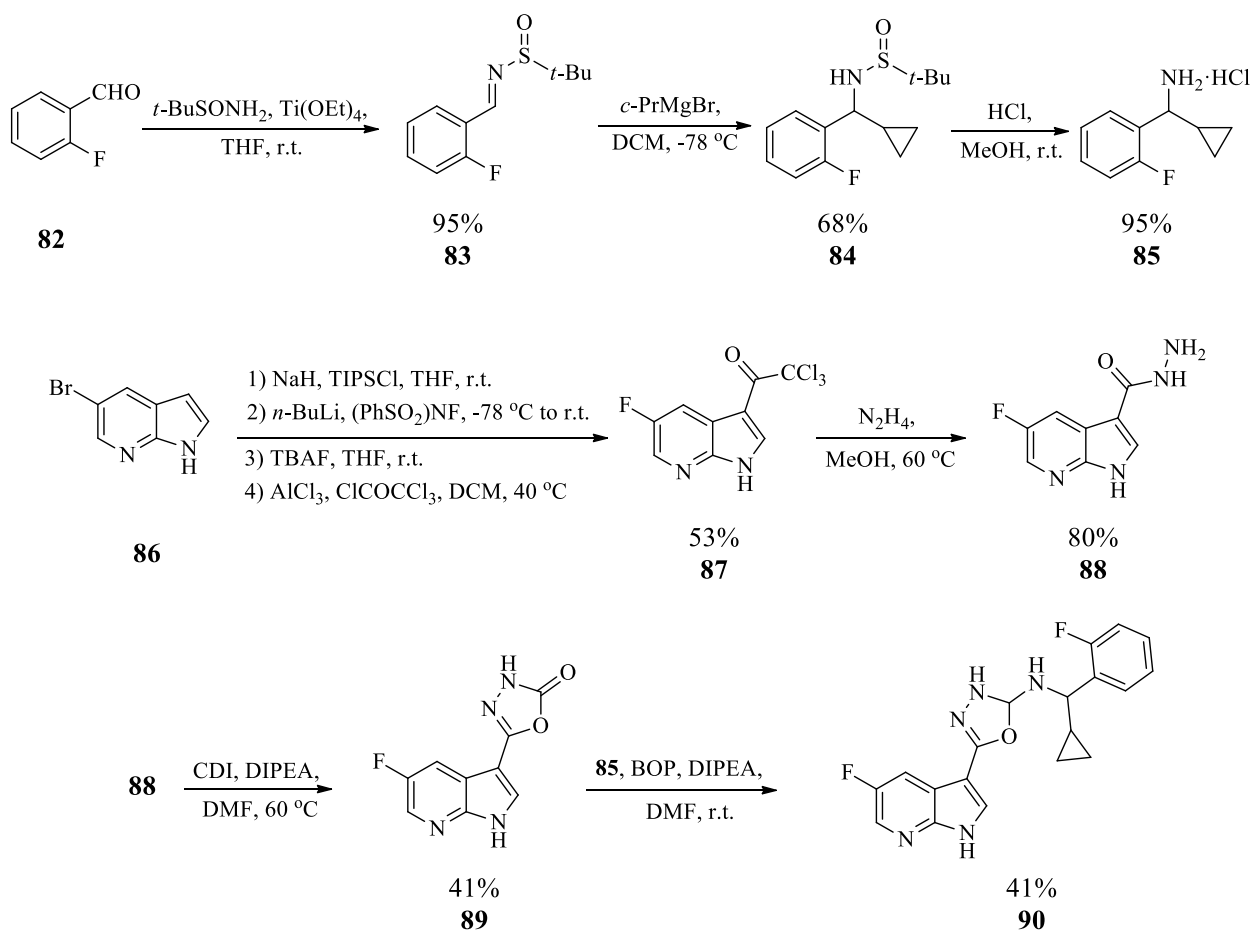
1.3.5 Ингибиторы CDC7

Белок CDC7, относящийся к классу серин/треониновых протеинкиназ, играет важнейшую роль в активации репликации ДНК в S-фазе клеточного цикла. CDC7 активируется путем связывания с серином на белке Dbf4, затем, после фосфорилирования субъединицы данного белка образуется следующий комплекс, но уже для фосфорилирования MCM2, что приводит к раскручиванию двухцепочечной ДНК [58]. Сверхэкспрессия CDC7 в опухолевых клетках рака молочной железы и толстой кишки может быть подавлена ингибиторами без сильного влияния на нормальные клетки [59].

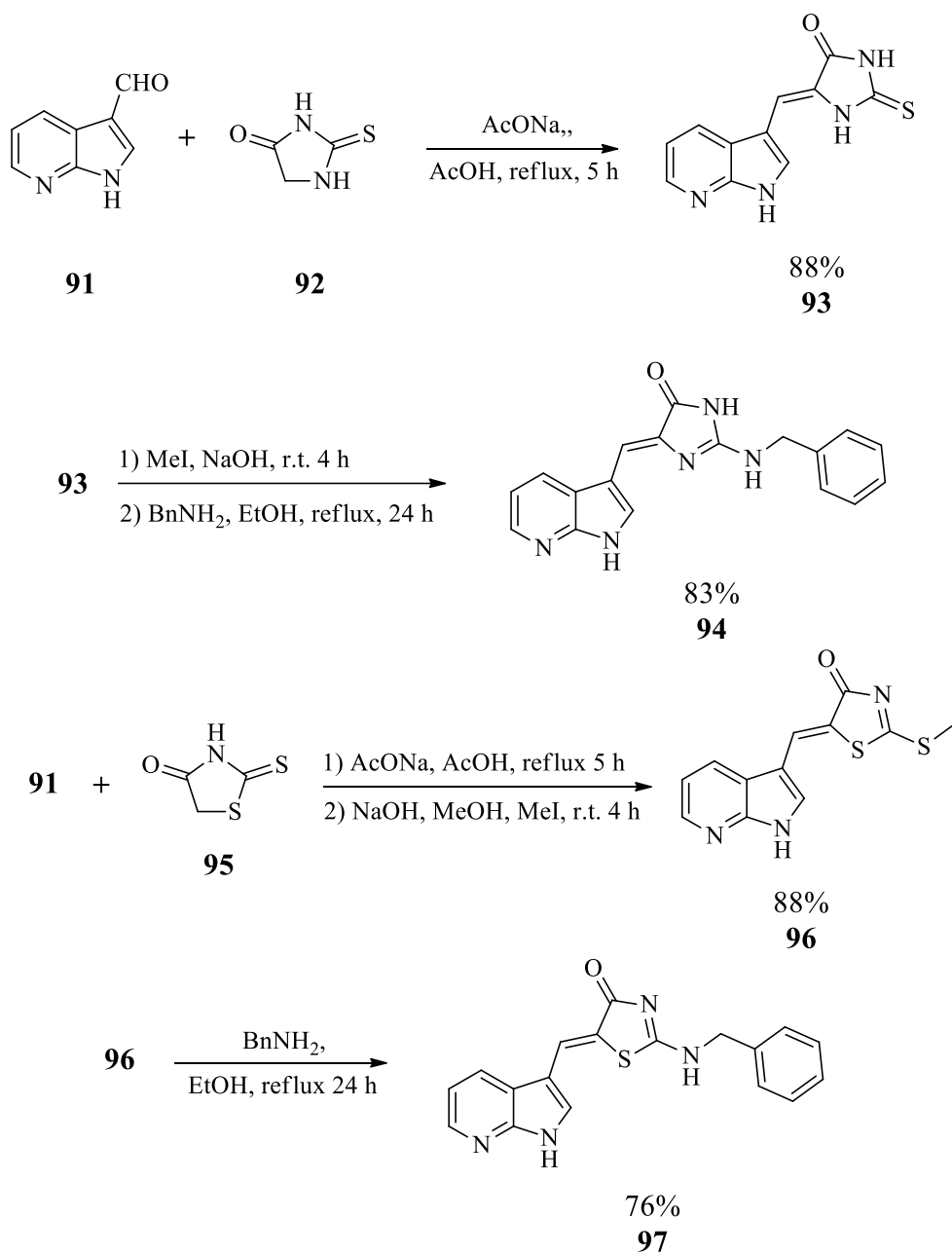
Почти 10 лет назад группой ученых во главе с Paul E. Harrington [60] было проведено исследование, по итогу которого удалось оптимизировать ряд аминоксодиазолов с точки зрения селективности и РК. Азаиндол в качестве скаффолда позволил улучшить микросомальную стабильность, не нарушив при этом профиль потенцирования и селективности *in vitro*. Соединение **90** с IC₅₀ = 1.1 нМоль для CDC7 и 32 нМоль для pMCM2 уже спустя 6 ч продемонстрировал устойчивое снижение фосфорилирования комплекса

минихромосомы. Общая схема синтеза ингибитора представлена на схеме 12 [60].

Схема 12



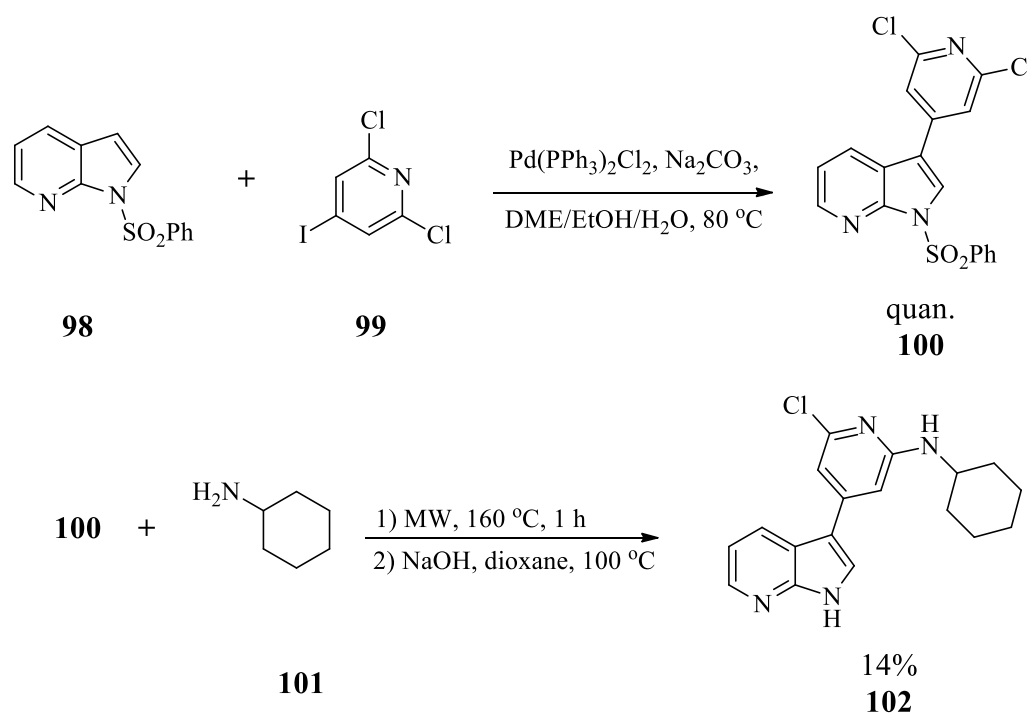
При скрининге некоторых новых азаиндолилиден-имидазолонов и азаиндолилиден-тиазолонов, соединение **97** (схема 13) продемонстрировало превосходное ингибирование CDC7 и Cdk9/CyclinT со значениями $\text{IC}_{50} = 0.009$ $\mu\text{Моль}$ и 0.015 $\mu\text{Моль}$ соответственно. Анализ активности проводился на клеточной линии карциномы яичников человека (A2780) [61].



Ингибитор легко получили из 7-азаиндола путем формилирования уротропином в уксусной кислоте и последующей конденсацией тиогидратона с 3-формил-7-азаиндолом (**91**). Соединение **94** уже имело приемлемые значения константы ингибирования, но дальнейшая оптимизация привела к тиазолу (**97**), что увеличило потенцию к мишени в 2.2 раза [61].

Другая работа [62] была направлена на проверку гипотезы о важности влияния карбонильной группы на связывание с мишенью. В соединении **97** присутствует карбонильная группа, необходимая для связывания с консервативной АК в АТФ сайте, и такой идеи придерживались до 2013 года, когда не был предложен принцип связывания малой молекулы с галогеном в этом месте, что не только не снизило потенцию к мишени, но и в первичной SAR оптимизации привело к $K_i = 0.9$ нМоль. Общий синтез ингибитора представлен на схеме 14. В синтезе к коммерчески доступному функциональному пиридину (**99**) был присоединен 7-Азаиндольный фрагмент с фенилсульфонамидной защитной группой (**98**) по реакции Сузуки с получением продукта кросс-сочетания **100**. Затем один из галогенов замещался на циклогексиламинную группу по механизму SN_2 , а защитная группа снималась путем щелочного гидролиза с образованием конечного продукта **102**.

Схема 14



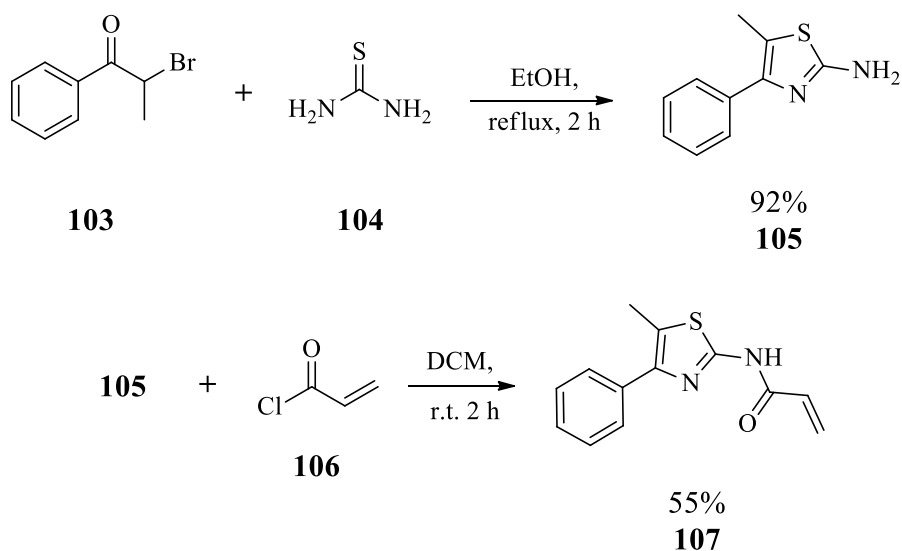
1.4 Синтез тиазола по методу Ганча для сборки ингибиторов

Подбор группы, которая была бы универсальной для большинства ингибиторов очень сложный процесс. Обычно для взаимодействий с АК в активном сайте используются гетероциклические соединения. Одним из часто используемых гетероциклических соединений является функциональный тиазол [63]. Данное гетероциклическое соединение достаточно давно использовалось в качестве лиганда для структур, направленных на мускориновые, дофаминовые и серотониновые рецепторы [64]. Поэтому его наличие и в структурах, направленных на лечение многих заболеваний спустя много лет не является удивительным.

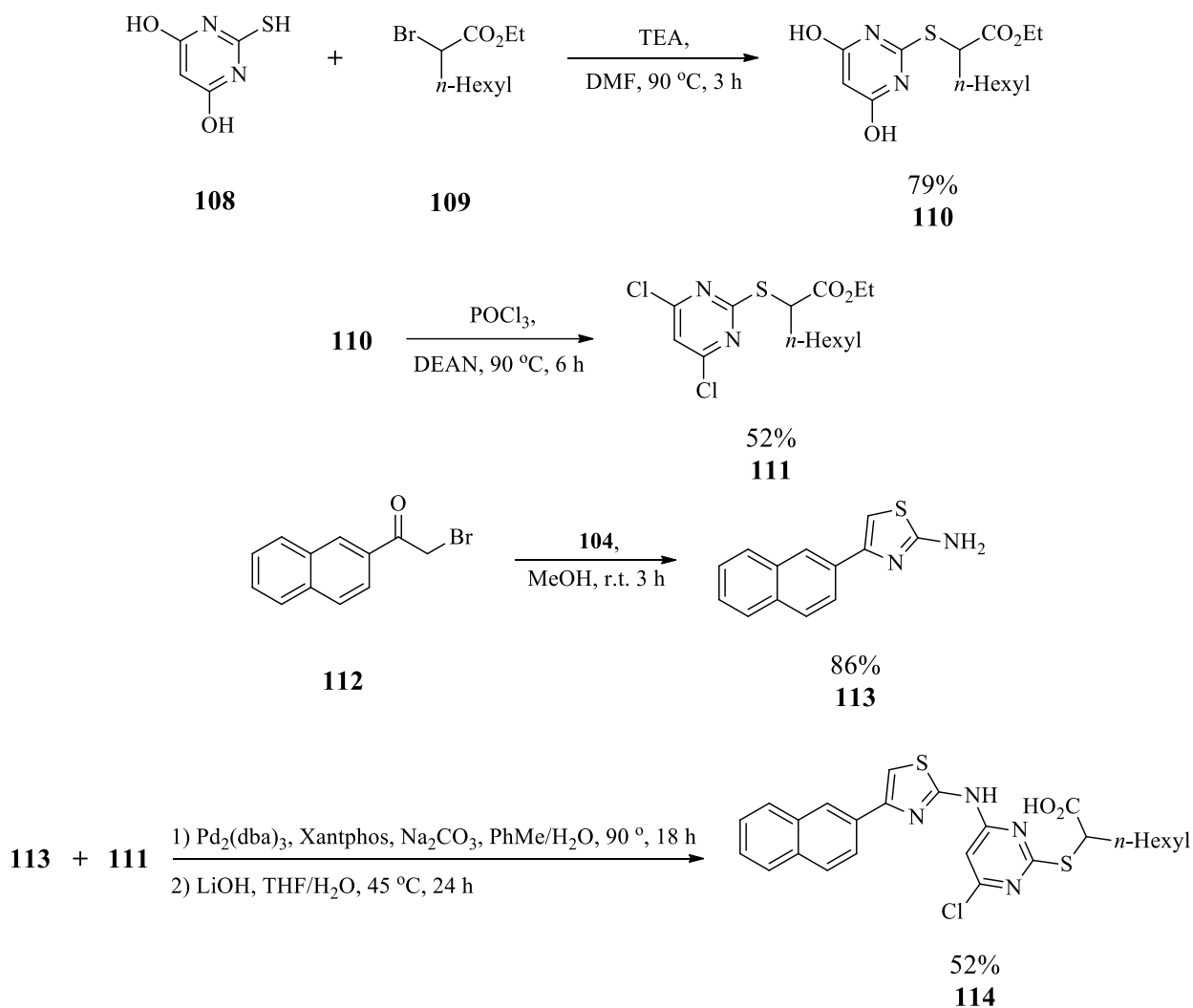
Одним из простых способов синтеза такой группы является метод Ганча. Суть синтеза состоит в нагревании тиамида с α -галогенкарбонильным соединением, что и приводит к получению конечной молекулы. В данном разделе будут описываться примеры использования данного метода для сборки различных лекарственных препаратов [65].

Дополнительно стоит сказать, что большинство гетероциклических соединений — это жесткие молекулы и их связывающаяся конформация и низкоэнергетическая конформация, скорее всего, будут достаточно близки, но в работе Weiyang Dai [65], где проводилась разработка ингибитора для белка GSTO1-1 было замечено, что при использовании в качестве лиганда 5-фенилтиазола, при наложении трехмерных структур положение фенильной группы было сдвинуто, чего у других циклов — имидазола и пиперидина не наблюдалось.

Предполагается, что это связано с уникальным углом связи S-C в тиазольном кольце (88.6°) [66]. Такой эффект позволяет бензольному кольцу входить в узкую гидрофобную щель, что увеличивает потенцию к мишени до значений $IC_{50} = 3.11 \mu\text{Моль}$ для одного из соединений хитов. Синтез показан на схеме 15 [65].



Тиазольный фрагмент также часто использовался в структурах различных противовоспалительных препаратов [67], поэтому группа ученых во главе с Thomas Hanke [68] была вдохновлена этими данными и использовала их для разработки ингибиторов 5-LO и mPGES-1. В прошлых структурах малых молекул использовались дифенильные фрагменты, которые снижают простор для модификаций препаратов. Поэтому наличие богатого гетероатомами мотива могло привести к новым взаимодействиям в активном сайте. По итогу SAR оптимизации значения IC_{50} для клинического кандидата составляли 0.4 μ Моль для обоих белков. Схема синтеза конечного соединения на схеме 16.

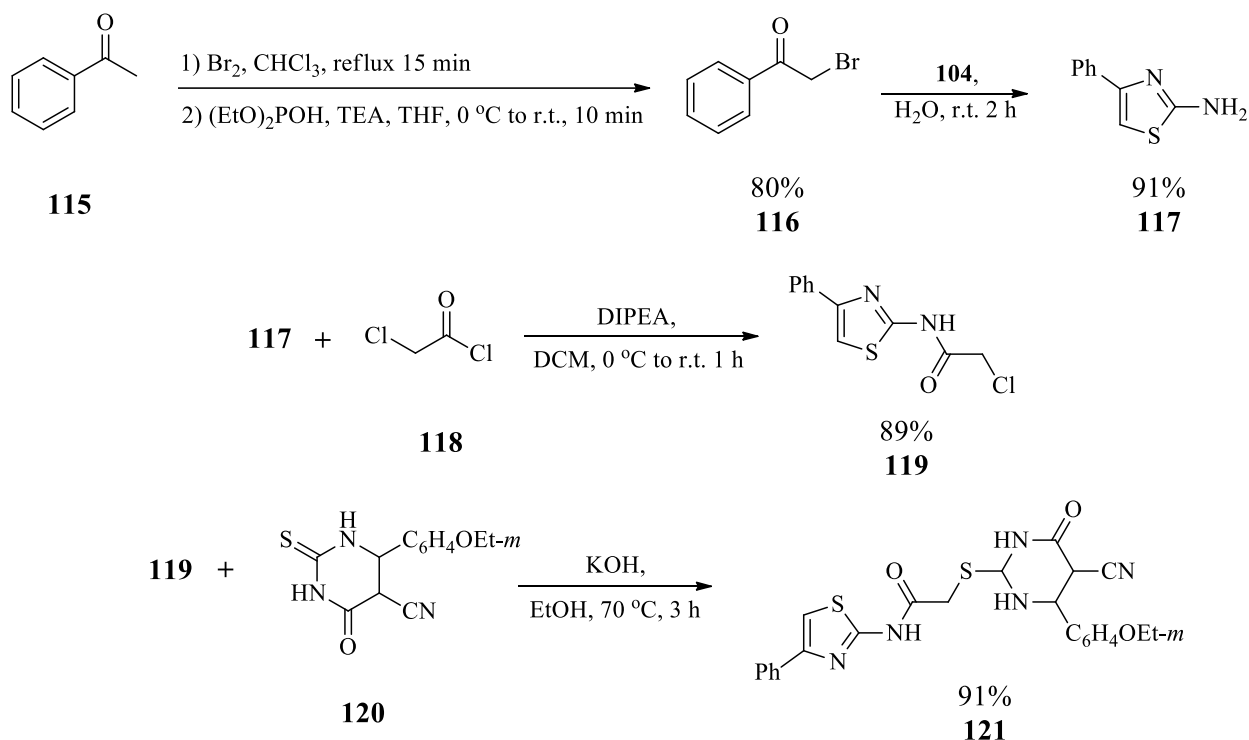


Весь синтез представлен пятью основными стадиями. Первым этапом было нуклеофильное замещение тиобарбитуровой кислоты (**108**) соответствующим α -бромоефиром (**109**) с получением тиоэфира (**110**). Затем под действием оксихлорида фосфора гидроксильные группы были замещены хлором. Синтез Ганча был использован для получения 2-аминотиазола (**113**), который в условиях аминирования по Бухвальду-Хартвигу с ранее полученным соединением **111** и последующим щелочным гидролизом образовывал конечный продукт **114**.

Также метод Ганча для синтеза 2-аминотиазола использовался при разработке ингибитора VАСЕ1 со значениями $\text{IC}_{50} = 17.5 \mu\text{Моль}$. Тиазол был

выбран на основе *in silico* скрининга, где гетероатомы образовывали водородные связи с АК в каталитическом сайте. Полный синтез представлен на схеме 17 [69].

Схема 17

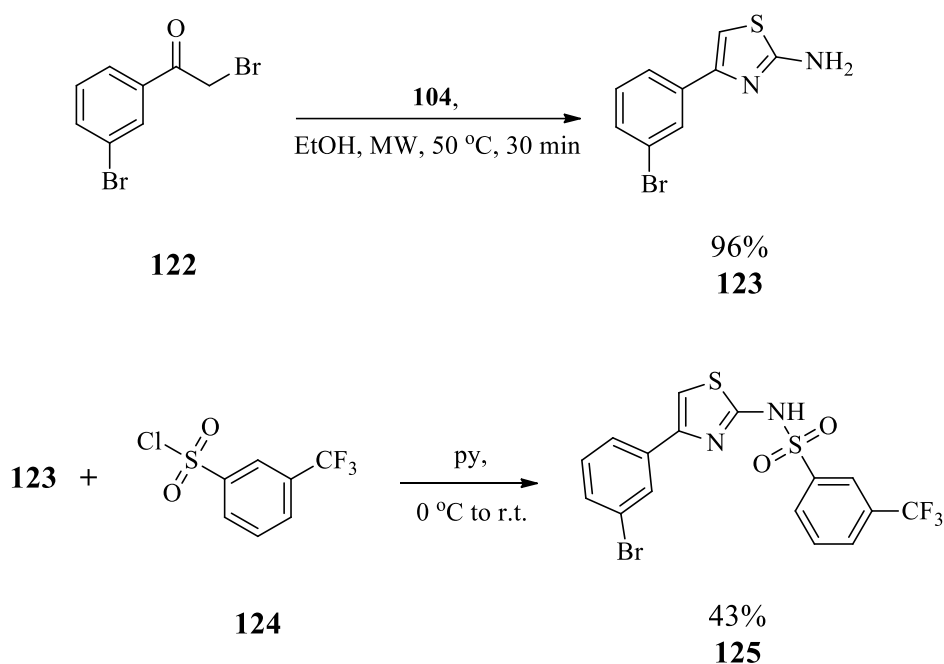


Индивидуальный путь синтеза был начат с ацетофенона (**115**), который подвергался прямому бромированию с образованием 2-бром-1-фенилэтан-1-она (**116**). Продукт в дальнейшем подвергался реакции Ганча с использованием тиомочевины (**104**) с образованием 2-амино-4-фенилтиазола (**117**). Это соединение преобразовывалось в 2-хлор-*N*-(4-фенилтиазол-2-ил)-ацетамид (**119**) из прошлого продукта и хлорацетилхлорида (**118**) по механизму $\text{S}_{\text{N}}2$. Конечное соединение **121** было получено в результате нуклеофильного замещения между **119** и монотиопроизводным барбитуровой кислоты (**120**) [69].

В литературных данных присутствует упоминание аминотиазольного фрагмента в структурах антибактериальных препаратов для мецитилин

резистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) [70]. Конечная роль данного фрагмента в увеличении эффективности неизвестна и требует дополнительных исследований, но многие одобренные антибиотики имеют в своей структуре тиазольный участок. Синтез одного из таких препаратов представлен на схеме 18 [71].

Схема 18



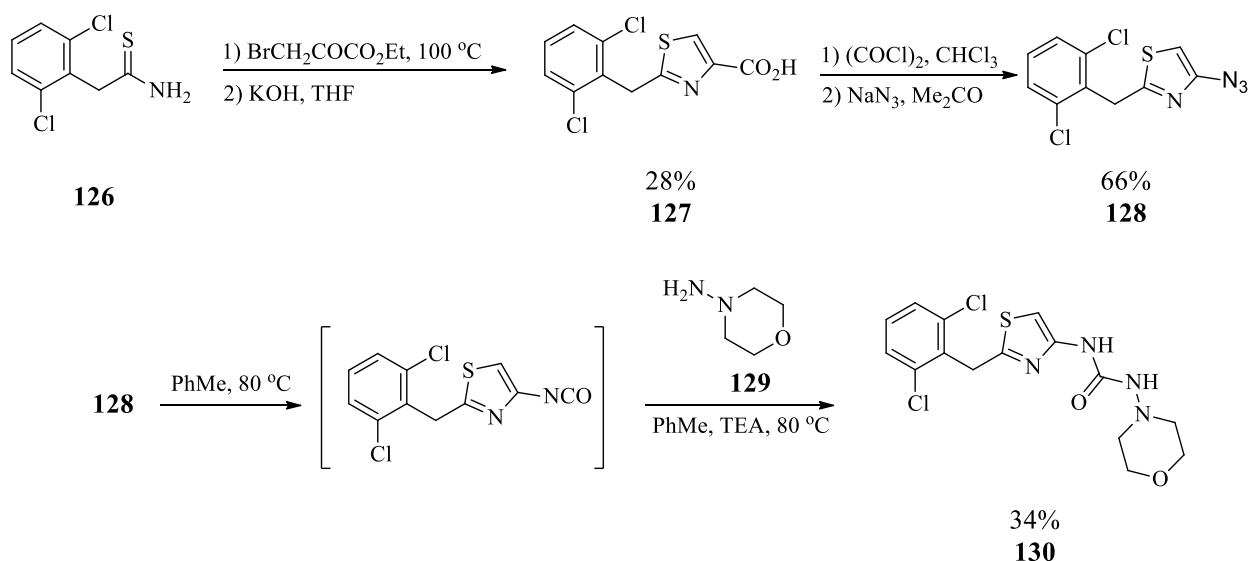
Синтез каркаса с помощью микроволнового излучения, включающий замещенный α -бромацетофенон (122) и тиомочевину (104) проходил с высокими выходами. В работе [72] упоминается, что при использовании в качестве лиганда для α -бромкетона пиперидина, морфолина и пирролидина требуется замена растворителя с EtOH на MeOH, для увеличения конверсии в целевые аминотиазолы. В случае отсутствия коммерческого α -бромкетона, соответствующий замещенный ацетофенон можно подвергнуть прямому йодированию в термических условиях с йодом и тиомочевинной для образования гетероциклического соединения. Конечный арилсульфонамидный фрагмент был включен в каркас конденсацией с

бензолсульфонилхлоридом (**124**) в присутствии основания. В работе [73] отмечается, что на данном этапе есть шанс низкого выхода из-за образования биссульфонамидного продукта, и для увеличения выхода стоит проводить щелочное восстановление моносулфонамида, но в данной работе такого не предпринималось, поэтому выходы, в зависимости от заместителя, варьировались в пределах 12-64%.

Тиазольное ядро позволяет легко синтезировать двумерные комбинаторные библиотеки, варьируя заместители в 2 и 4 положениях. И как показано выше, подход через реакцию Ганча используется для разработки самых разнообразных лекарственных средств. Из неуказанных это антагонист АСhЕ, агонист 5-НТ и модулятор GLT-1 [72].

В работе [74] при разработке ингибитора для CDK5 был избран такой же путь синтеза, представленный на схеме 19. Он был выбран для того, чтобы избежать образования промежуточных неустойчивых 4-амино-1,3-тиадиазолов из 4-аминозаместителя в форме изоцианата. Хотя, как утверждалось авторами, их конечный ингибитор можно было получить этим способом из изначального соединения, но выход продукта был сильно низким.

Схема 19



2 Результаты и их обсуждение

Как уже было сказано выше – 7-азаиндольный скаффолд является достаточно универсальным для разработки препаратов, направленных на ингибирование различных киназ путем конкурентного связывания в АТФ сайте. За счет наличия в самой структуре киназного паттерна, образующего коррелированные водородные связи, не требуется получать производные с заместителями во втором положении, и, следовательно, можно направить оптимизацию на образование взаимодействий с более специфичными АК, обеспечивающими повышенную селективность будущей малой молекулы.

В качестве основного заместителя был выбран тиазол. Данный гетероцикл обладает достаточным атомным разнообразием для достижения взаимодействий с АК, а пространственная особенность расположения угла связи C-S-C может дополнительно помочь разрабатываемой малой молекуле глубже упаковаться в АТФ сайте будущей мишени.

В ходе анализа литературных данных было обнаружено, что 7-азаиндольный скаффолд с тиазолом присутствует в селективных ингибиторах ROCK1 [75]. Дополнительные поиски в данном направлении натолкнули на возможный путь оптимизации будущих соединений. Отмечается, что заместители в 3 положении благоприятно влияют на селективность и ингибирующую способность по отношению к ROCK1/2 [76]. Стоит отметить, что часто в качестве линкера используется амидная связь, но любые заместители у атома азота в данном линкере снижают активность [77]. В работах, где присутствовал тиазол был проведен недостаточно полный анализ заместителей, авторы остановились на вариациях пиперазина и пиперидина [78]. В смежных же работах по оптимизации ингибиторов ROCK выделяют еще и замещенные фенилы, пирролидины, азепины и другие.

Мы хотели оценить ингибирующую активность потенциальных ингибиторов ROCK с 4-(7-азаиндол-3-ил)-тиазолом в качестве основного

скаффолда и большим разнообразием заместителей, а также изучить влияние на активность линкера.

По итогам литературного анализа нами была выбрана мишень – фермент ROCK1/2. ROCK – это серин-треониновая протеинкиназа, являющаяся нижележащей мишенью RhoA-GTP и вовлеченной в активность большого числа клеточных функций. От активности ROCK зависит регуляция легкой цепи миозина и цитоскелетных белков [79]. Его активная роль в цитоскелетном сокращении и перестройке делает его важным для многих фундаментальных клеточных процессов, будь то апоптоз, миграция, цитокинез, пролиферация или дифференцировка [80].

В некоторых работах [81] отмечается, что ингибирование ROCK может способствовать выживанию диссоциированных клеток ES (Embryonic stem cells) и iPS (Induced pluripotent stem cells), что делает ингибиторы ROCK полезным инструментом при культивировании данных клеточных линий, поскольку это повышает эффективность манипуляций в исследовании на стволовых клетках (рисунок 12).

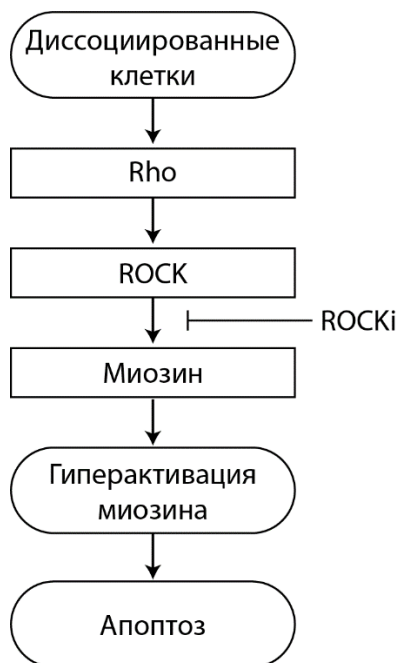


Рисунок 12 – Предполагаемый механизм увеличения жизнеспособности стволовых клеток

Предполагается, что при культивировании диссоциированные стволовые клетки теряют опосредованное кадгерином-Е межклеточное взаимодействие, что ведет к повышенной гиперактивации белка миозина по пути Rho/ROCK/Myosin и в конечном итоге к апоптозу. Соответственно снижение фосфорилирования миозина путем ингибирования ROCK противодействует апоптозу [81]. Дополнительно это было подтверждено путем ингибирования самого миозина в ES клеточной линии Blebbistatin [82].

Дизайн исследования представлен на рисунке ниже (рисунок 13).

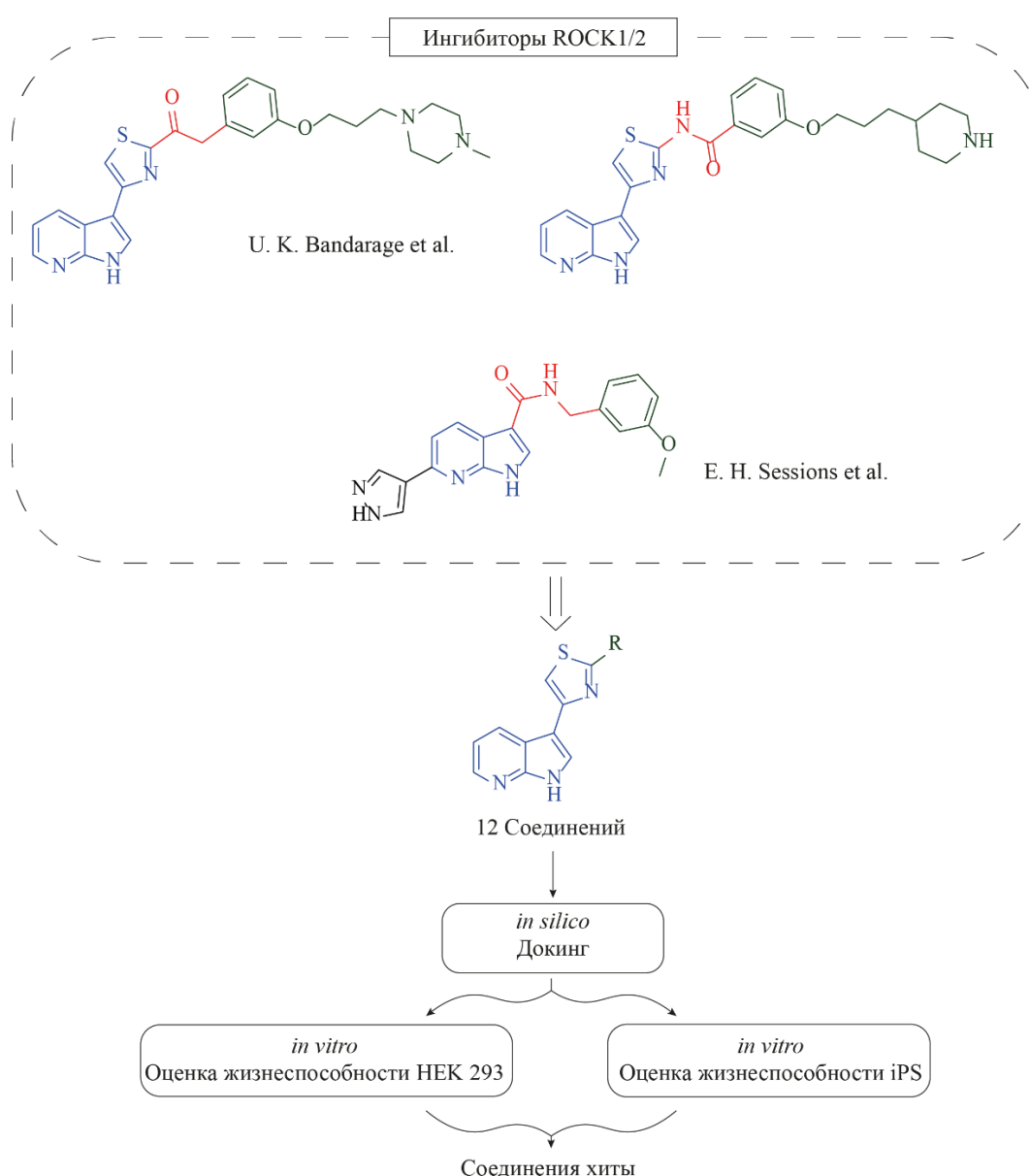


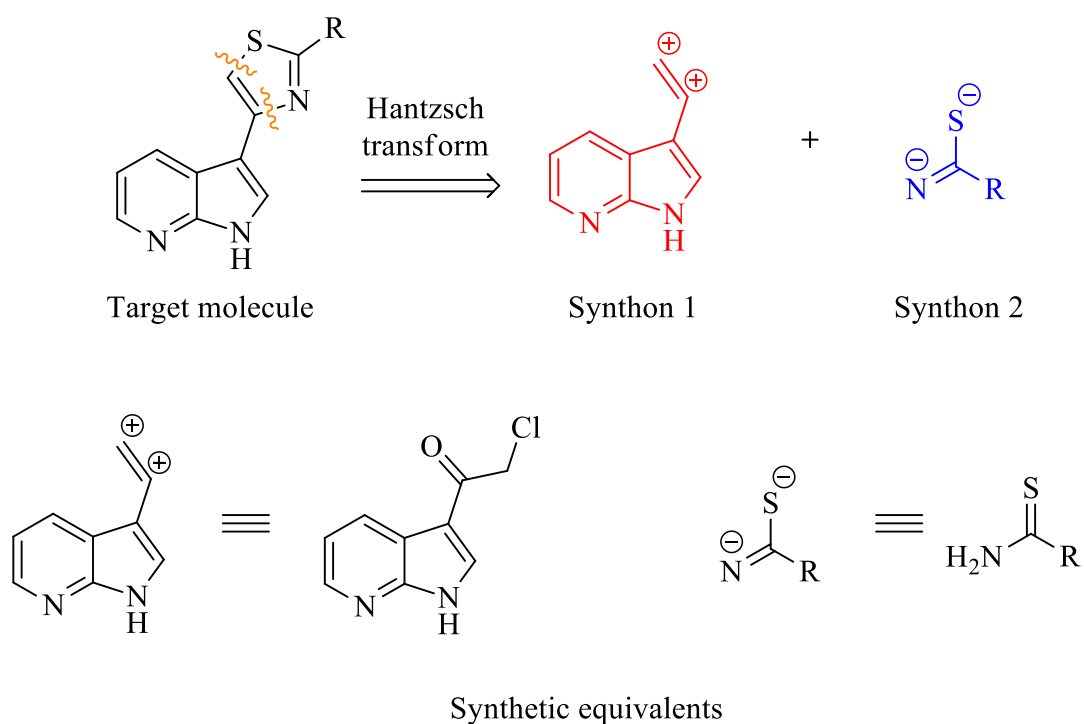
Рисунок 13 – Дизайн исследования

В конечном итоге мы решили попытаться разработать селективные ингибиторы ROCK1 на основе представленных выше примеров с небольшим увеличением выбора заместителей и с изменением линкера, для анализа его влияния на ингибирующую активность. Вспомогательная оценка способов связывания соединений и их проверка на ингибирование ROCK1, за счет воспроизведения *in vitro* гипотезы о увеличении жизнеспособности, должны дать достаточные первичные данные о потенциальных хитах.

2.1 Синтез исследуемых соединений

Для выявления оптимального подхода к синтезу был проведен ретросинтетический анализ целевой молекулы, показанная на схеме 20. В качестве трансформа была выбрана реакция Ганча [83], представляющая из себя конденсацию α -галогенкетонов с тиамидами.

Схема 20



Используя конвергентный подход к синтезу целевых соединений, первоначальные усилия были направлены на получение двух исходных соединений – 7-азаиндол-3-ил- α -хлорацетата и замещенного тиамида.

Для увеличения разнообразия получаемых тиазолов в качестве второго исходного соединения, содержащего фрагмент S-C-N, мы использовали замещенные тиамиды и тиомочевины. Данные соединения можно разделить на три основных структурных мотива (рисунок 14).

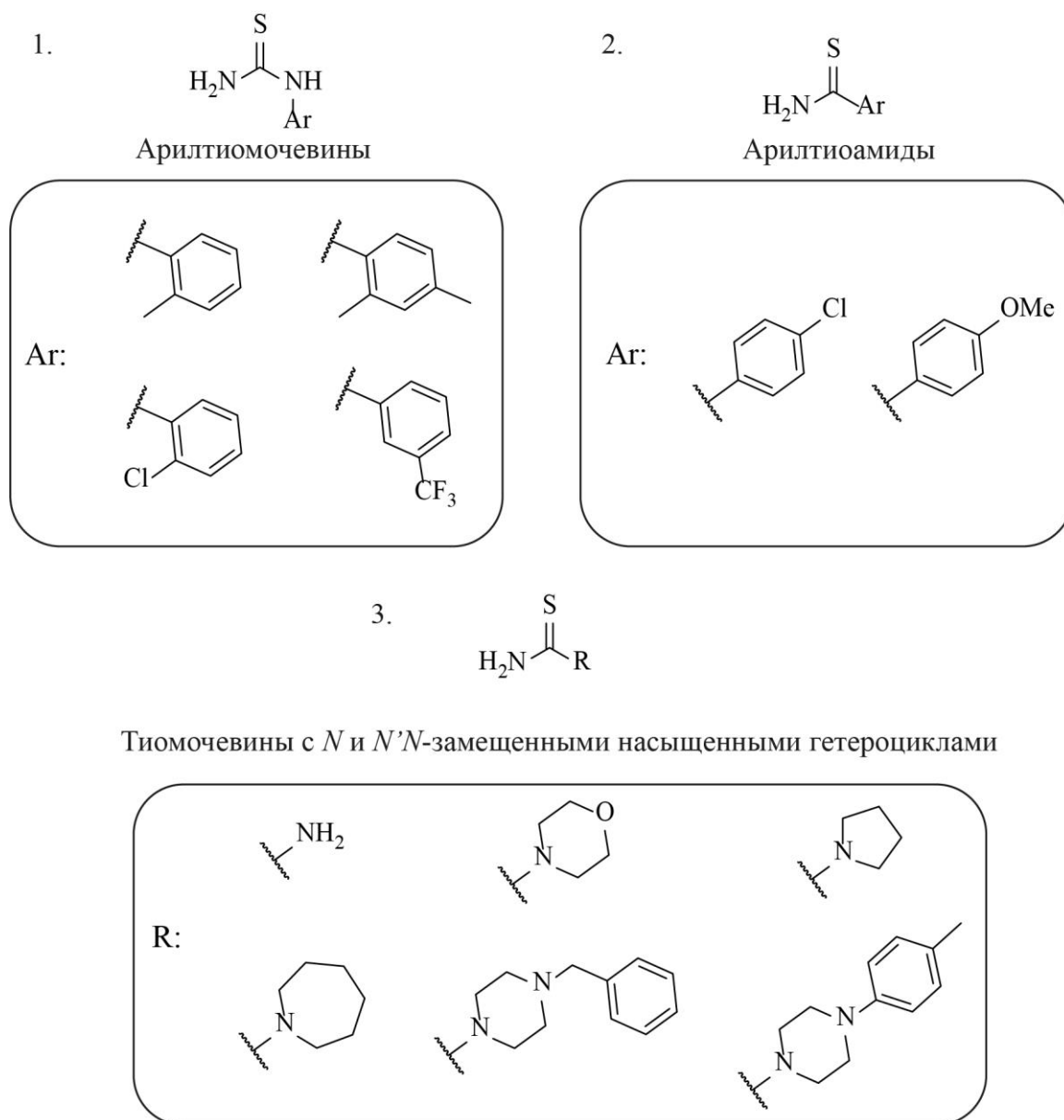
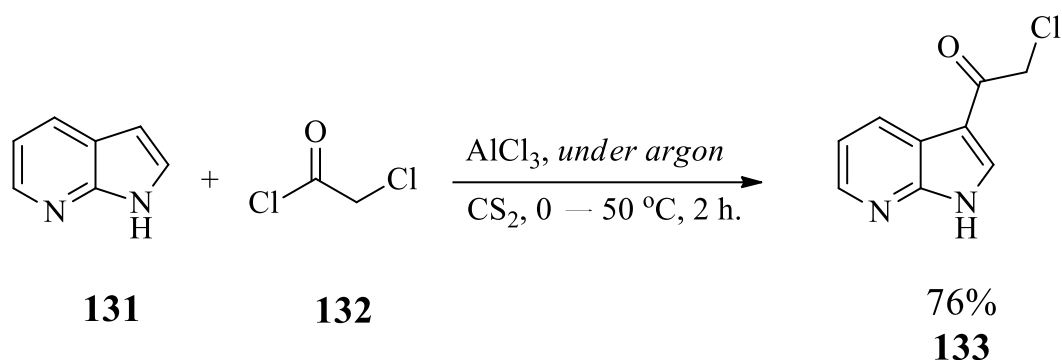


Рисунок 14 – структурные подгруппы для второго исходного соединения

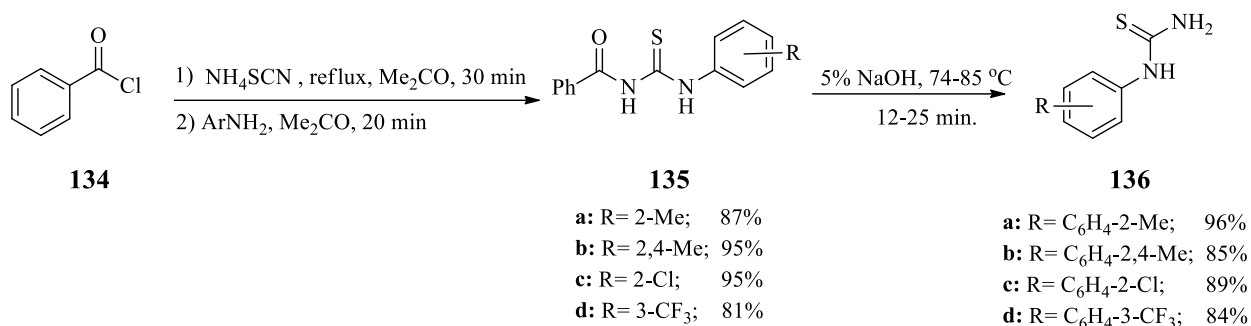
Получение α -галогенкетона, представленное на схеме 21, проводилось путем ацилирования 7-азаиндола (**131**) хлорацетилхлоридом (**132**) в условиях реакции Фриделя-Крафтса с добавлением катализатора – AlCl_3 в качестве кислоты Льюиса. Конечное соединение **133** получалось с хорошим выходом в 76%.

Схема 21



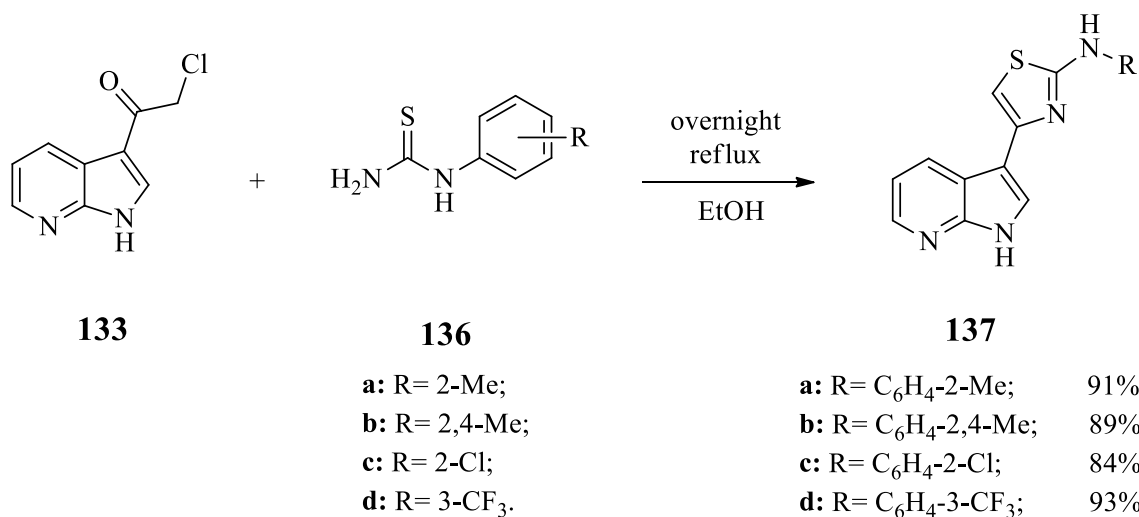
Для синтеза арилтиомочевин (первая структурная подгруппа) использовали двухстадийный подход, показанный на схеме 22 [84]. К роданиду аммония в ацетоне по каплям добавляли бензоилхлорид (**134**). Образующийся *in situ* изоцианат не требует предварительного выделения и используется сразу по мере реакции. После добавления замещенных анилинов полученные *N*-бензоил-*N'*-фенилтиомочевины (**135**) легко гидролизуются в щелочной среде до арилтиомочевин (**136**) с хорошими выходами в пределах 84-96%

Схема 22



Целевые тиазоламины (**137**) были получены по реакции Ганча, показанной на схеме 23, путем кипячения в течении ночи α -хлор-1-(7-азаиндолил-3)-ацетата (**133**) и полученных ранее арилтиомочевин (**136**). Общие выходы продуктов были в интервале 84-93%

Схема 23



Все соединения были подтверждены методом ЯМР спектроскопии. Пример спектра первой структурной подгруппы целевых соединений представлен на рисунке ниже (рисунок 15)

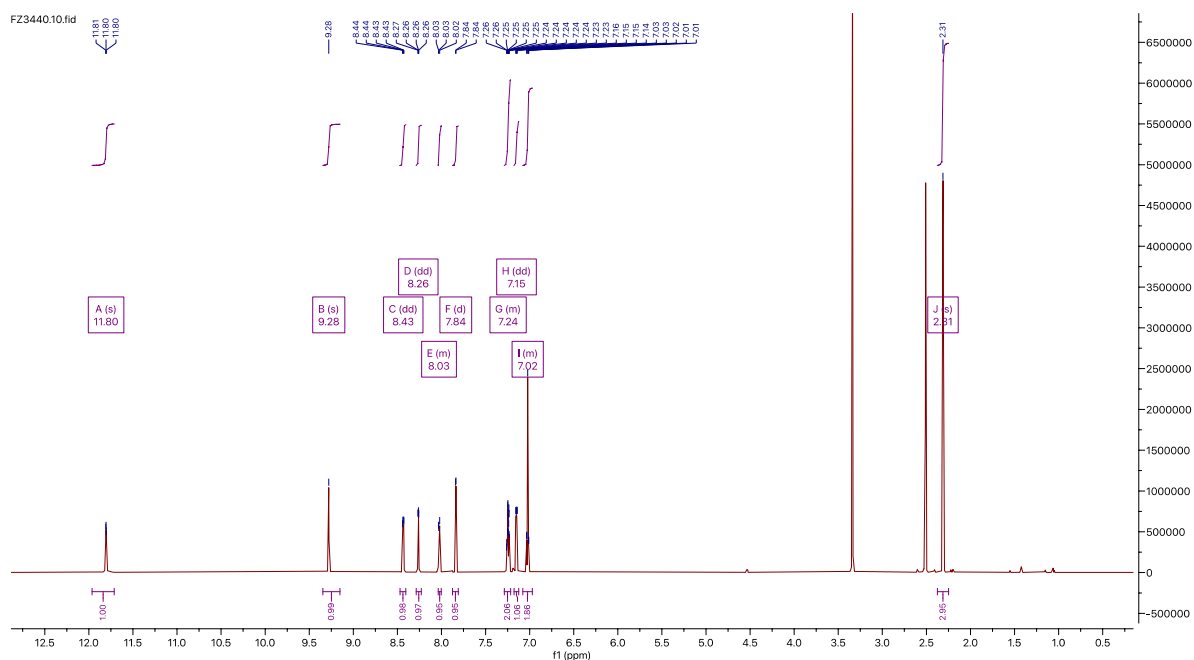
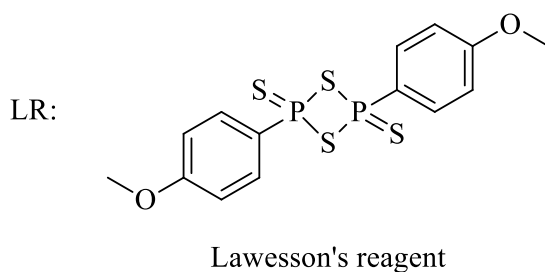
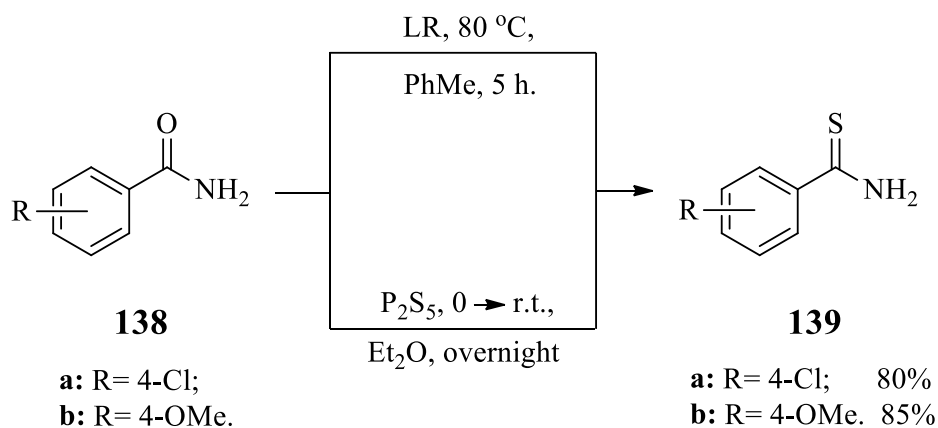
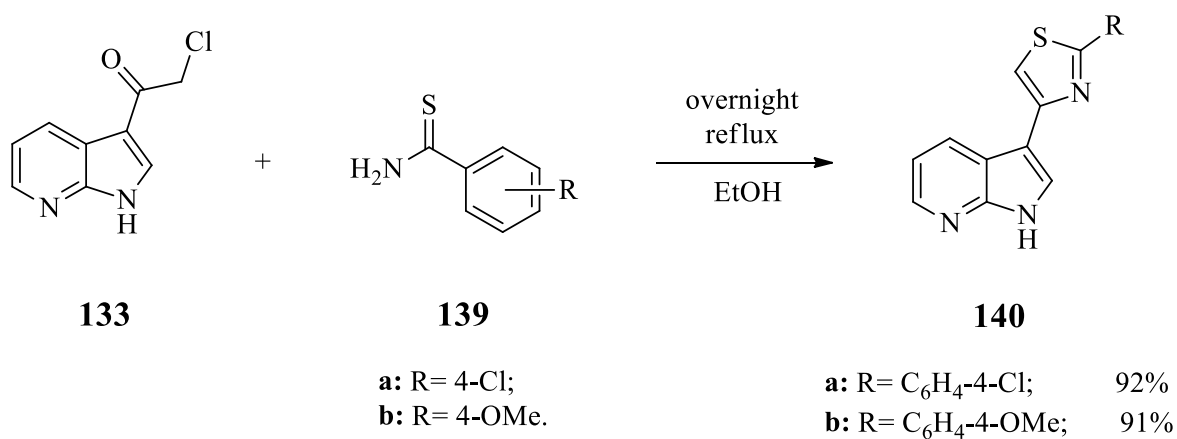


Рисунок 15 – Спектр ^1H ЯМР соединения **137a**

Следующим шагом был синтез тиамидов (вторая структурная подгруппа) для выявления необходимости аминного линкера для связывания. Синтез представлен на схеме 24 и является варибельным за счет разного источника серы. В первом случае на замещенные амиды (**138**) действуют реагентом Лавессона [85] при нагревании до 80 °С, во втором P_2S_5 [86] при комнатной температуре. В обоих случаях получаются тиамиды (**139**) с высокими выходами 80 и 85% соответственно.



Целевые триазолы (**140**) были получены аналогичным способом по реакции Ганча, который уже был описан ранее, с получением соединений с отличными выходами в 91-92% (схема 25).



Все соединения охарактеризованы при помощи метода ^1H ЯМР спектроскопии. Общий спектр второй структурной подгруппы представлен ниже (рисунок 16) на примере соединения **140a**.

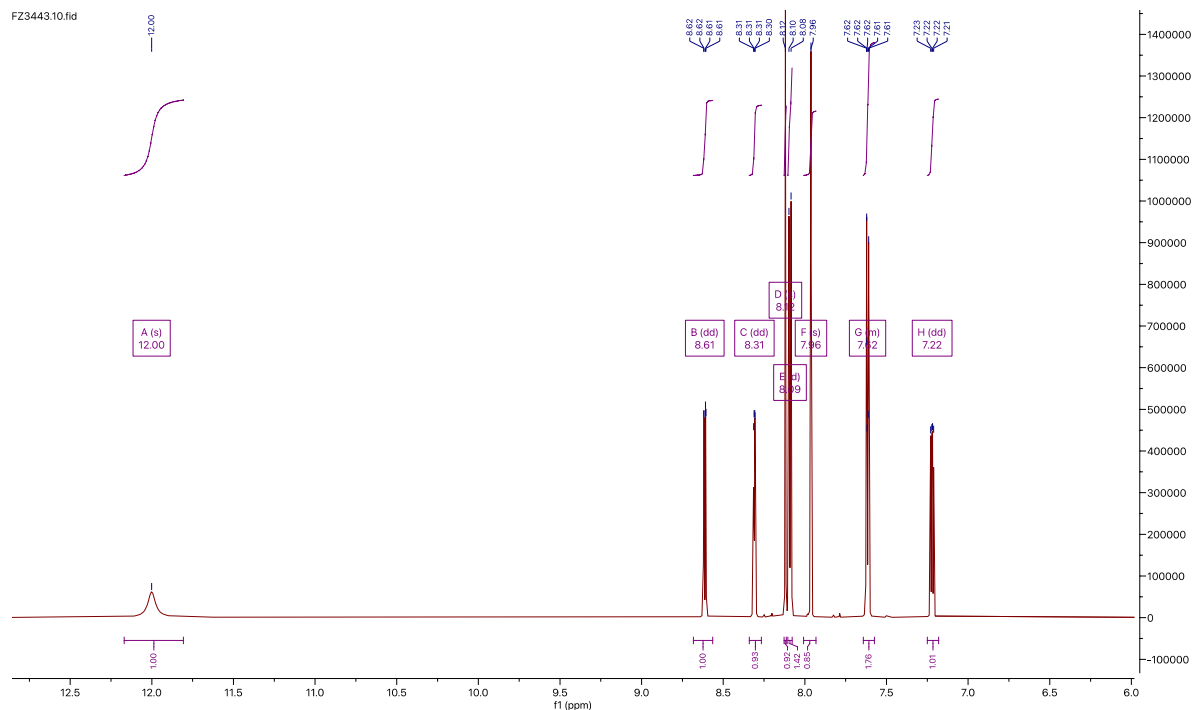
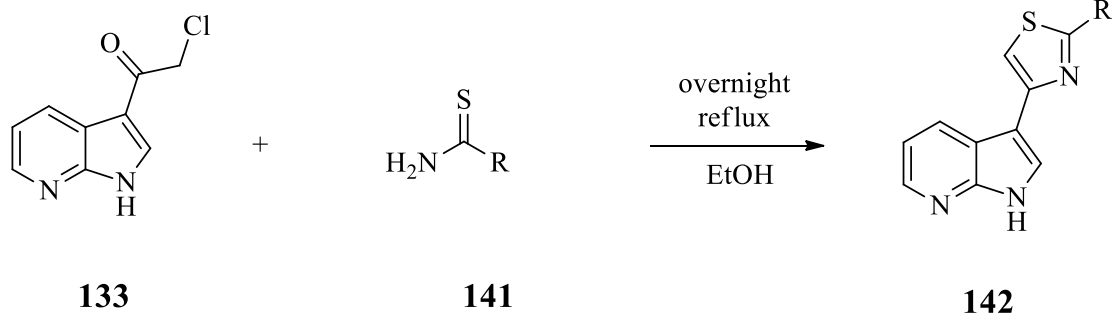


Рисунок 16 – Спектр ^1H ЯМР соединения **140a**

Тиазолы (**142**), полученные из исходных *N* и *N'*-замещенных тиомочевин (**141**) были синтезированы по методике, использовавшейся для первых двух структурных подгрупп. Можно заметить сильно отличающийся диапазон выходов в 37-97%, что можно объяснить немного большим разнообразием выбранных соединений нежели для случаев, описанных ранее.



a: R= NH ₂ ;	a: R= NH ₂ ;	97%
b: R= azepane;	b: R= azepane;	73%
c: R= pyrrolidin;	c: R= pyrrolidin;	79%
d: R= morpholine;	d: R= morpholine;	79%
e: R= <i>N</i> -benzylpiperazin;	e: R= <i>N</i> -benzylpiperazin;	67%
f: R= <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)piperazin.	f: R= <i>N</i> -(<i>p</i> -tolyl)piperazin.	37%

Аналогично структуры подтверждались ¹H ЯМР. В данном случае представлено два спектра для одной структурной подгруппы из-за сильных различий природы заместителей. Так на рисунке ниже (рисунок 17) показан спектр способный охарактеризовать соединения **142a-d**.

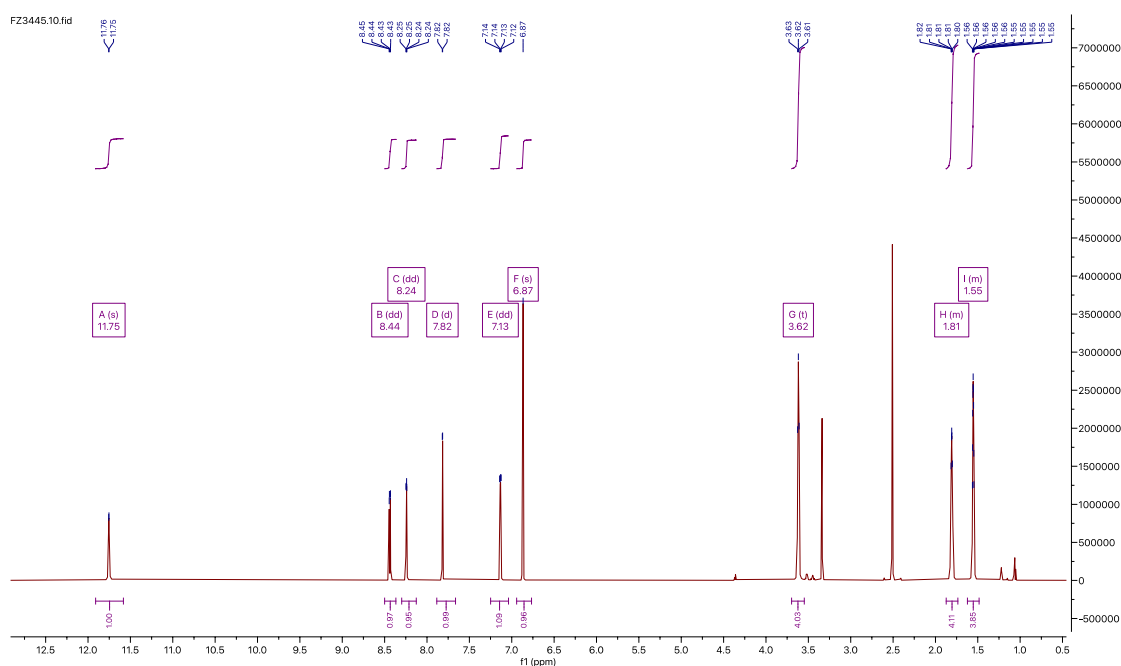


Рисунок 17 – Спектр ¹H ЯМР соединения **142b**

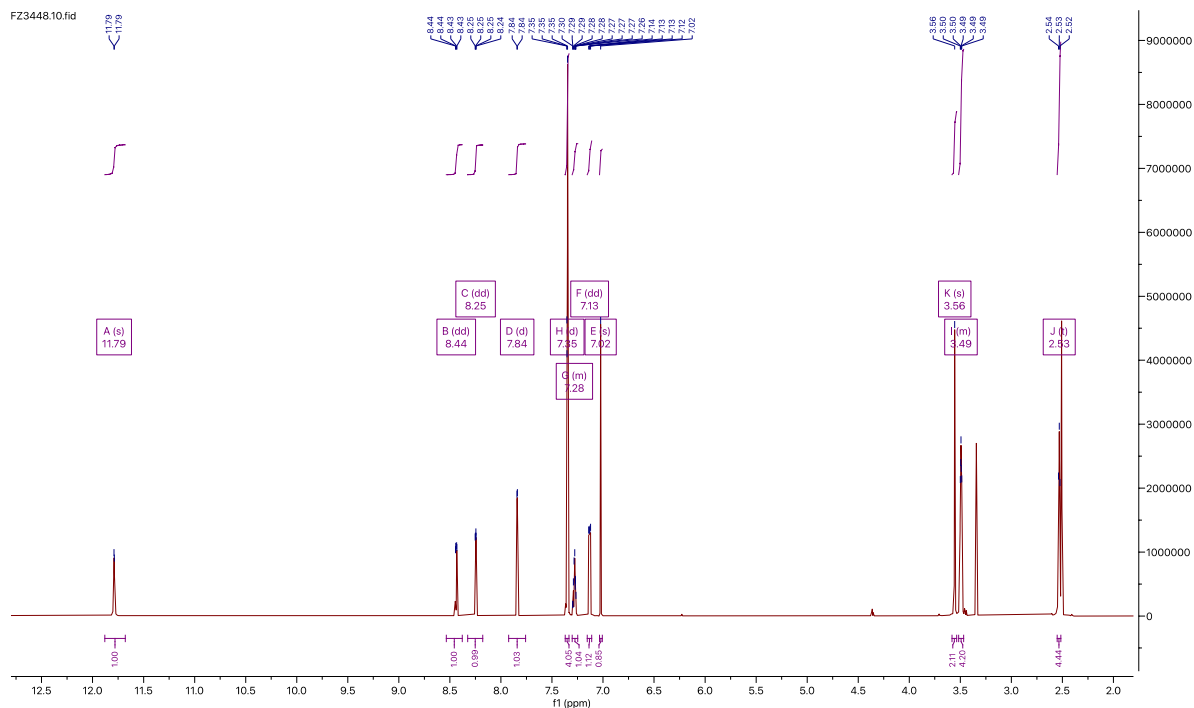


Рисунок 18 – Спектр ^1H ЯМР соединения **142e**

Особенностью второго спектра является более сложный вид области, описывающий ароматические структуры. Данный спектр, представленный ниже (рисунок 18), позволяет описать соединения **142e-f**.

2.2 Молекулярное моделирование

Первоначально для всех исследуемых соединений были рассчитаны значения ряда важных физико-химических свойств. Липофильность и площадь полярной поверхности были предсказаны с помощью модуля QikProp [87], а ΔG проникновения молекулы в клеточную мембрану — с помощью энергетической модели Prime [88, 89], представленной в ПО Schrodinger (Таблица 1)

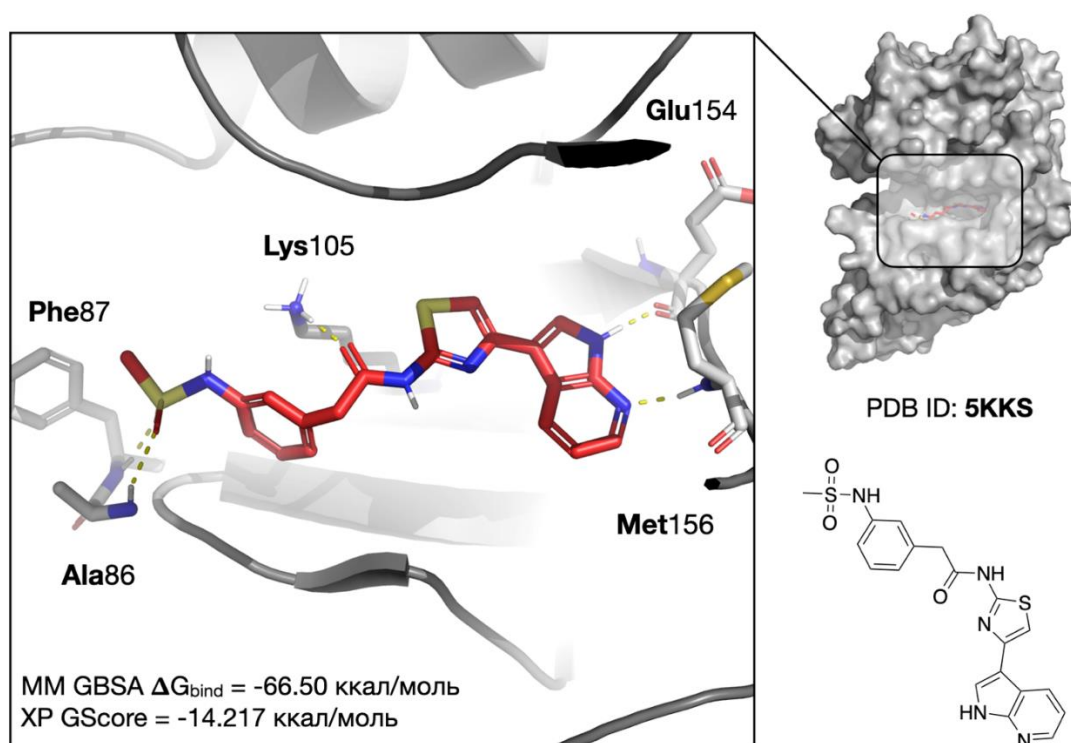
Таблица 1 – Физико-химические параметры исследуемых соединений

Номер соединения	QPLogP	MM-GBSA ΔG_{insert} ккал/моль	PSA, Å ²
142e	4.284	14.38	43.544
137d	4.241	13.96	45.429
140b	4.031	13.11	44.901
140a	4.410	12.76	35.894
137c	4.099	15.73	47.114
137a	4.083	15.67	45.331
142a	1.406	18.14	64.796
137b	4.356	14.93	47.691
142d	2.800	14.87	47.719
142b	4.007	12.54	37.598
142c	3.477	13.72	39.401
142f	5.334	14.96	43.275

Исходя из представленных данных, можно отметить, что все структуры обладают приемлемыми для перорально-биодоступных лекарств значениями физико-химических свойств. Закономерно, наименее липофильным оказалось соединение **142a**, несущее незамещенный полярный 2-аминотиазольный фрагмент, а наиболее липофильным — **142f**, содержащее объемный 4-(*пара*-толил)пиперзин-1-ильный заместитель.

Как уже отмечалось выше, мы предположили, что исследуемые соединения могут выступать в роли ингибиторов ROCK1/2. Для подтверждения этой гипотезы была проведена молекулярная стыковка в АТФ-связывающий сайт данной киназы (PDB ID: 5KKS [78]). Структура белка была загружена из PDB (*англ.* Protein Data Bank) [90] и подготовлена с помощью ПО Schrodinger так, как описано в экспериментальной части. Стыковка

выполнялась с помощью алгоритма Glide [91] в режиме повышенной точности ХР (*англ.* Extra Precision) [92]. Дополнительно мы рассчитывали значения свободной энергии связывания по методу MM-GBSA с помощью уже упоминавшейся выше модели Prime [89]. В качестве референса использовался кристаллический лиганд, содержащийся в структуре ROCK1 5KKS, способ его связывания, а также значения скоринга представлены ниже (рисунок 19).



Желтый пунктир – водородные связи

Рисунок 19 – Структура и способ связывания нативного лиганда

Азаиндольный скаффолд образует ключевые для связывания водородные связи с остатками Met156 и Glu54, тиазолацетамидный мотив занимает центральную область сайта, демонстрируя взаимодействие с аминогруппой Lys105, а сульфаниламид простирается в область растворителя, где дополнительно связывается с амидными протонами Ala и Phe за номерами 86 и 87, соответственно.

Значения скоринга для исследуемых соединений представлены в таблице ниже (Таблица 2)

Таблица 2 – Значения скоринга исследуемых соединений и нативного лиганда

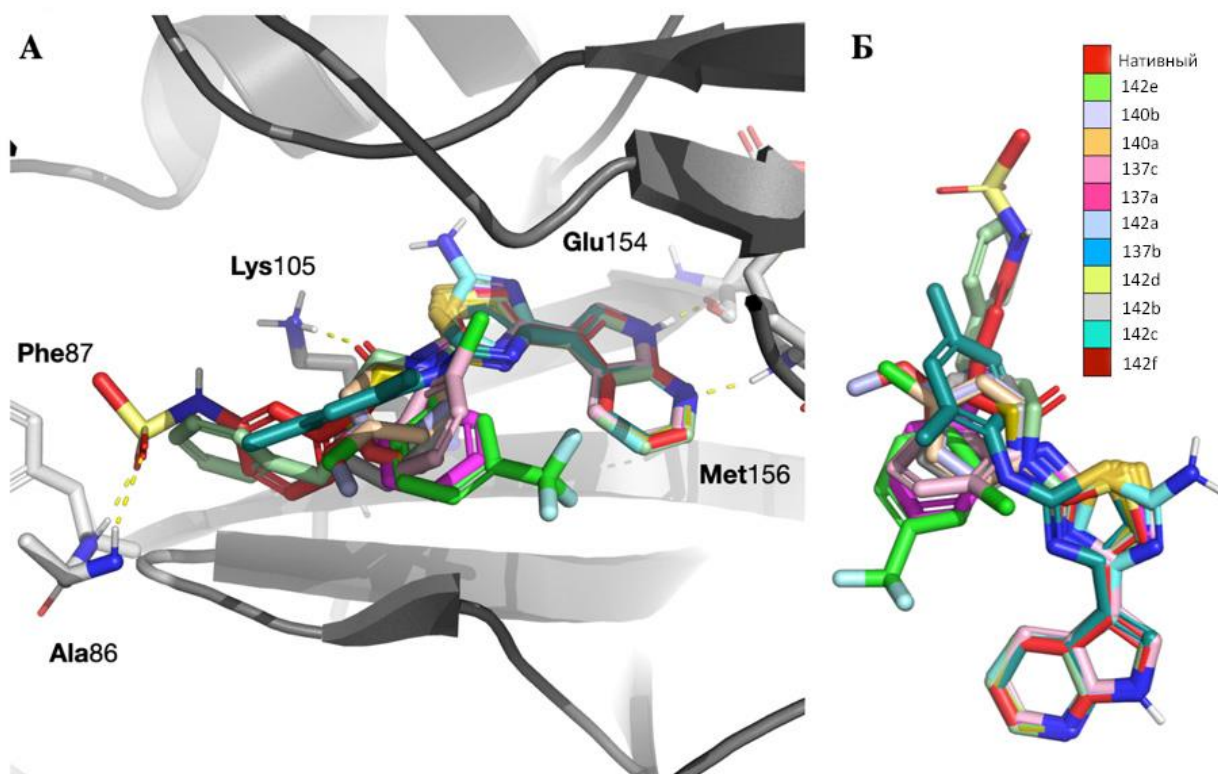
Номер соединения	XP GScore. ккал/моль	ММ-GBSA ΔG_{bind} . ккал/моль
Нативный лиганд	-14.217	-66.50
142e	-13.133	-54.91
137d	-12.237	-42.92
140b	-11.912	-44.99
140a	-11.878	-46.64
137c	-11.715	-40.46
137a	-11.095	-48.06
142a	-10.680	-45.75
137b	-10.294	-39.21
142d	-10.052	-46.15
142b	-9.662	-49.33
142c	-9.280	-42.76
142f	-8.565	-48.26

Если опираться только на сухие значения скоринговых функций Glide и Prime, то конечно стоит отметить, что ни одно из соединений библиотеки не смогло продемонстрировать скоринг лучше кристаллического референсного лиганда.

Обращаясь к спрогнозированным позам связывания, в первую очередь хочется обратить внимание на консервативность расположения азаиндольного мотива – у всех исследуемых соединений этот скаффолд располагается в дальней области сайта, где, подобно референсу, реализуется киназный паттерн водородных связей с остатками шарнира. Расположение и геометрия

тиазольного ядра также совпадает у всех лигандов, за исключением незамещенного 142a (показан голубым на рисунке ниже), который претерпевает вращение.

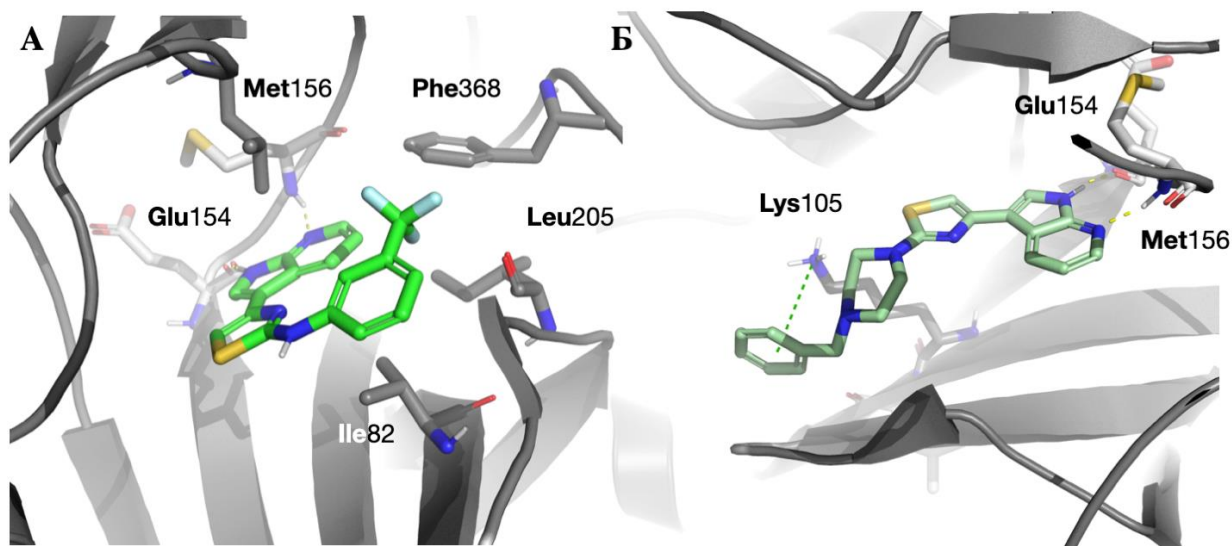
Отчасти низкие значения скоринга можно объяснить тем, что ни одному из соединений не удастся образовать взаимодействий с остатками Lys105, Ala86 и Phe87. Восстановление этих связей может стать одним из возможных направлений для дальнейшей SAR-оптимизации (рисунок 20).



А — Способы связывания исследуемых соединений; Б — наложение структур исследуемых соединений и кристаллического лиганда в связывающих конформациях; желтый пунктир — водородные связи

Рисунок 20 – Предсказанные позы связывания исследуемых соединений в активном сайте ROCK1

Абсолютный лидер по значениям скоринговых функций Glide XP и Prime – соединение **142e** – полностью реализует свой потенциал по оккупации сайта: помимо образования ключевых взаимодействий, бензильному заместителю удастся образовать π -катионное взаимодействие с остатком Lys.



А — Способ связывания соединения **137d**; Б — способ связывания соединения **142e**;
 желтый пунктир — водородные связи, зеленый — π -катионные взаимодействия

Рисунок 21 – Способы связывания соединений-лидеров **142e** и **137d**

Еще одна структура, ранжирующаяся в верхних строчках рейтинга – **137d** – за счет наличия *m*-трифторметил-замещенного фенила крайне выгодно связывается в локальном гидрофобном кармане, выстланном Ile82, Leu205 и Phe368 (рисунок 21).

2.3 Биологические испытания

Анализ общей цитотоксичности исследуемых нами соединений был проведен, используя колориметрический МТТ анализ. Данный тест основан на метаболической активности клеточных линий и предполагает использование внутриклеточных процессов для более точной оценки библиотеки соединений. В результате обработки лунок МТТ-реагентом естественные ферменты – оксидоредуктазы восстанавливают бесцветное соединение до нерастворимого формазана, имеющего фиолетовое окрашивание. Дальнейшая оценка проводится на колориметре и дает достаточно точное представление о количестве живых клеток. МТТ-тест точнее анализов с использованием

рекомбинантных белков, поскольку включает дополнительный процесс проникновения в клетку исследуемого соединения.

В своем исследовании вы использовали линию иммортализованных клеток HEK293, данная клеточная линия является одной из стандартных при такого рода тестах. Основной целью было первично оценить общую цитотоксичность, проявляющуюся за счет неселективного связывания малой молекулы с мишенями внутри клетки. Мы ожидали увидеть картину, показывающее слабое влияние на жизнеспособность клеток. На рисунке ниже представлены кривые доза-эффект для всех исследуемых соединений (рисунок 22).

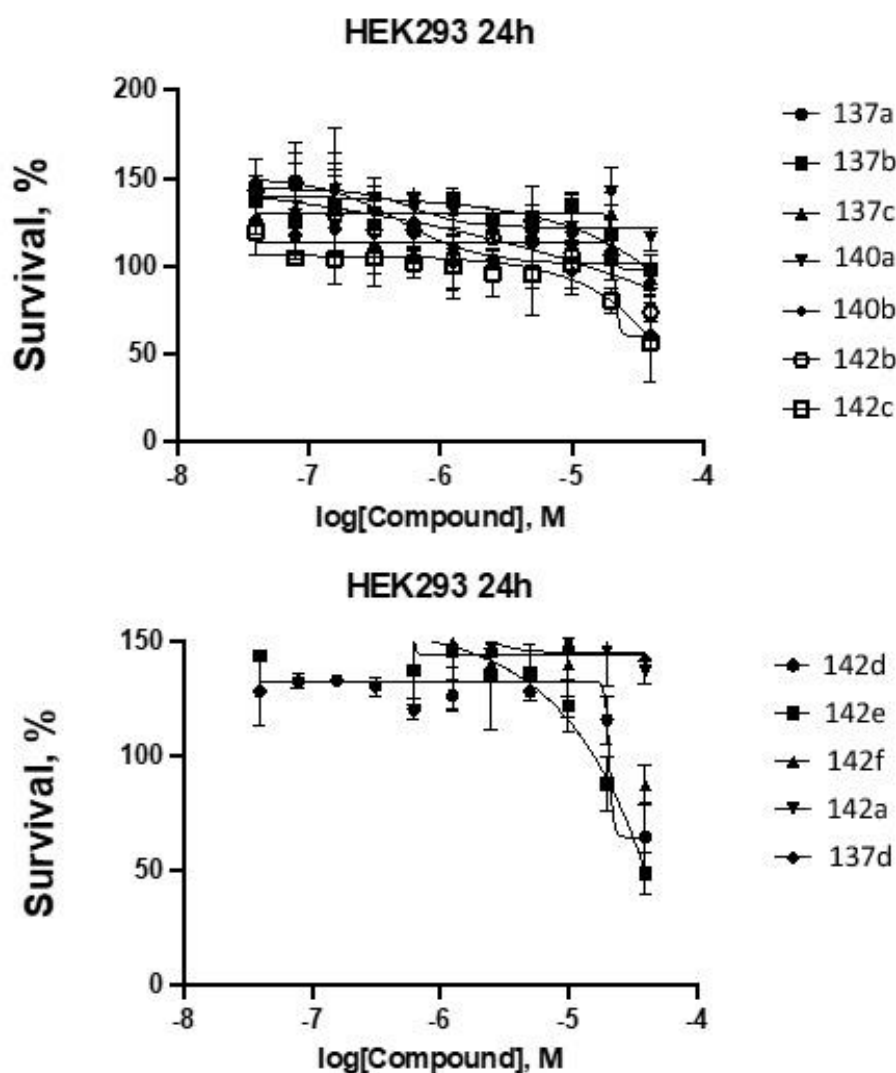


Рисунок 22 – Кривые доза-эффект исследуемых соединений

На рисунке представлена раститровка соединений в пределах от 50 нМоль до 50 μ Моль. Наглядно видно, что большая часть соединений имеет сходный характер цитотоксичности. Так повышенный цитотоксический эффект наблюдается при концентрации, превышающей 12.8 μ Моль. Повышенный токсический эффект имеют соединения **142b-f** (третья структурная подгруппа), при этом соединение **142a** наоборот не проявляет такого эффекта даже при концентрации в 50 μ Моль. Аналогично ему действует и соединение **137d** (первая структурная подгруппа), также не оказывая сильного эффекта на клетки НЕК293.

Оценка жизнеспособности НЕК293 являлась важным этапом для дальнейшей работы в направлении разработки потенциальных ингибиторов ROCK1/2, поскольку позволяет отсеивать соединения, вероятно показавшие бы отрицательный результат. Для наглядной демонстрации оказывают ли полученные соединения должный эффект на фермент ROCK1/2 требуется провести анализ жизнеспособности клеточной линии iPS (*англ.* induced Pluripotent Stem Cells) или аналогичных ей линий, выживаемость которых прямо зависит от ингибиторов ROCK1/2. Данные по упомянутому эксперименту не представлены в данной ВКР по причине активной работы Центра медицинской химии Тольяттинского госуниверситета в этом направлении.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Протекание реакций отслеживали с помощью ТСХ на пластинах с силикагелем фирм «Sorbfil» и «Synthware». Исследуемые вещества на пластинах проявляли путем облучения УФ-излучением, помещением в насыщенную йодную камеру и концентрированный раствор KMnO_4 .

Чистоту полученных соединений проверяли при помощи ВЭЖХ на хроматографе «Agilent 1220 Infinity» со встроенным спектрофотометрическим детектором. Колонка Agilent ZOBRAХ NH_2 , (4.6 x 150 мм) элюент $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ 80:20, скорость потока элюента 1 мл/мин. Обработка данных хроматографии проводилась в лицензированном ПО OpenLab.

Температуры плавления определялись при помощи нагревательного столика Voetius.

Все растворители и реагенты приобретались из коммерческих источников и использовались без предварительной очистки.

3.2 Синтез исходных соединений

3.2.1 Синтез α -галоген-1-(7-азаиндолил-3)-ацетата

Синтез 2-хлор-1-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)-этанона (133)

В токе аргона 7-азаиндол (5.90 г, 50 ммоль) растворяли в 250 мл CS_2 . При охлаждении вносили AlCl_3 (50 г, 375 ммоль). При перемешивании и нагревании до 50 °С по каплям добавляли хлорацетилхлорид (5 мл, 63 ммоль), предварительно разбавленный 25 мл CS_2 . Смесь перемешивали при 50 °С 2 ч., затем смесь охлаждали и маслоподобный продукт порционно обрабатывали холодной водой. Осадок фильтровали, промывали водой и сушили на воздухе. Выход: 7.4 г, 76%, бежевый порошок, R_f : 0.46 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл.: 219-220 °С; ^1H ЯМР, δ , м. д. (J, Гц); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{\text{уд}}=1.817$ мин, 94%.

3.2.2 Синтез арилтиомочевин

Типовая методика синтеза

В свежеприготовленный раствор роданида аммония (19 г, 250 ммоль) в 180 мл ацетона, в течении 5 минут по каплям добавляли бензоилхлорид (31 г, 220 ммоль). Смесь кипятили в течении 30 минут и после охлаждения до комнатной температуры покапельно вносили соответствующий анилин (170 ммоль). Смесь кипятили еще 20 минут и после, при интенсивном перемешивании, смесь выливали на лед. Полученный осадок фильтровали, промывали смесью EtOH:H₂O 1:1, перекристаллизовывали из спирта и после просушивания вводили в следующую реакцию.

Навеску продукта (50 ммоль), полученного на прошлой стадии, одной порцией вносили в разогретый до 74-85 °С раствор 5% NaOH. Смесь выдерживали 12-25 минут и после выливали на лед. Смесь подкисляли конц. HCl до pH=3, далее подщелачивали 25% раствором аммиака до pH=8. Осадок фильтровали, промывали водой и сушили на воздухе.

Синтез 1-(o-толил)-тиомочевины (136a)

Выход: 8 г, 96%, серый порошок.

Синтез 1-(2,4-диметилфенил)-тиомочевины (136b)

Выход: 7.7 г, 85%, серый порошок.

Синтез 1-(2-хлорфенил)-тиомочевины (136c)

Выход: 8.3 г, 89%, белый порошок.

Синтез 1-(3-трифторметилфенил)-тиомочевины (136d)

Выход: 9.3 г, 84%, белый порошок.

3.2.3 Синтез тиомочевин с *N* и *N,N'*-замещенными насыщенными гетероциклами

Типовая методика синтеза

Синтез азепан-1-карботиамида (141b)

Выход: 256 мг, 81%, желтый порошок.

Синтез пирролидин-1-карботиамида (141c)

Выход: 182 мг, 70%, белые кристаллы.

Синтез морфолин-4-карботиамида (141d)

Выход: 231 мг, 79%, белый порошок.

Синтез 4-бензилпиперазин-1-карботиамида (141e)

Выход: 200 мг, 85%, светло-желтый порошок.

*Синтез 4-*n*-толилпиперазин-1-карботиамида (141f)*

Выход: 191 мг, 81%, желтый порошок.

3.2.4 Синтез арилтиоамидов

Типовая методика синтеза с использованием реагента Лавессона

Соответствующий амид (5 ммоль) растворяли в 90 мл толуола и нагревали до 80 °С. В раствор вносили навеску реагента Лавессона (1.01 г, 2.5 ммоль) и смесь перемешивали в течении 5 ч. при 80 °С. Затем раствор экстрагировали EtOAc (3x50 мл). Собранные органические слои подкисляли конц. HCl до pH=6 и снова экстрагировали EtOAc (3x50 мл). Экстракт сушили над прокаленным Na₂SO₄ и упаривали растворитель под вакуумом с получением продукта в виде порошка.

Типовая методика синтеза с использованием P₂S₅

Соответствующий амид (5 ммоль) растворяли в 15 мл диэтилового эфира и охлаждали до 0 °С. К раствору небольшими порциями добавляли P₂S₅ (1,25 ммоль), смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течении ночи. После реакцию смесь фильтровали и сушили на воздухе.

*Синтез *n*-хлорбензилтиоамида (139a)*

Выход: 684 мг, 80%, желтый порошок.

*Синтез *n*-метоксибензилтиоамида (139b)*

Выход: 710 мг, 85%, светло-зеленый порошок.

3.3 Синтез целевых соединений

3.3.1 Синтез тиазолов

Типовая методика синтеза

Навески α -хлор-1-(7-азаиндолил-3)-ацетата (250 мг, 1.285 ммоль) и соответствующего тиамида (1.285 ммоль) растворяли в 30 мл этилового спирта. Смесь кипятили в течении ночи и после в горячий раствор добавляли 20 мл насыщ. раствора NaHCO_3 и 100 мл холодной воды. Полученный осадок фильтровали и сушили на воздухе.

Синтез 4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазол-2-амина (142a)

Выход: 270 мг, 97%, бежевый порошок, R_f : 0.11 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 223-225 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO-d_6): δ 12.31 (с, 1H), 9.06 (с, 2H), 8.41 – 8.27 (м, 2H), 8.20 (с, 1H), 7.25 (дд, $J = 7.8, 4.8$ Гц, 1H), 7.10 (с, 1H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{\text{уд}} = 1.211$ мин, 98%.

Синтез N-(o-толил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазол-2-амина (137a)

Выход: 359 мг, 91%, светло-оранжевый порошок, R_f : 0.30 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 194-196 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO-d_6): δ 11.80 (с, 1H), 9.28 (с, 1H), 8.43 (дд, $J = 8.0, 1.6$ Гц, 1H), 8.26 (дд, $J = 4.6, 1.6$ Гц, 1H), 8.04 – 8.00 (м, 1H), 7.84 (д, $J = 2.6$ Гц, 1H), 7.29 – 7.22 (м, 2H), 7.15 (дд, $J = 7.9, 4.6$ Гц, 1H), 7.08 – 6.97 (м, 2H), 2.31 (с, 3H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{\text{уд}} = 1.328$ мин, 99%.

Синтез N-(2,4-диметилфенил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазол-2-амина (137b)

Выход: 367 мг, 89%, кремовый порошок, R_f : 0.34 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 220-222 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO-d_6): δ 11.79 (с, 1H), 9.21 (с, 1H), 8.43 (дд, $J = 7.9, 1.6$ Гц, 1H), 8.26 (дд, $J = 4.6, 1.6$ Гц, 1H), 7.81 (д, $J = 2.5$ Гц, 1H), 7.77 (д, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.15 (дд, $J = 7.9, 4.6$ Гц, 1H), 7.08 – 7.03 (м, 2H), 6.97 (с, 1H), 2.27 (д, $J = 7.1$ Гц, 6H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{\text{уд}} = 1.290$ мин, 99%.

Синтез N-(2-хлорфенил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазол-2-амина (137c)

Выход: 353 мг, 84%, светло-желтый порошок, R_f : 0.47 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 209-210 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): δ 11.85 (с, 1H), 9.65 (с, 1H), 8.51 (дд, $J = 8.3, 1.6$ Гц, 1H), 8.43 (дд, $J = 7.9, 1.6$ Гц, 1H), 8.27 (дд, $J = 4.6, 1.6$ Гц, 1H), 7.90 (д, $J = 2.6$ Гц, 1H), 7.50 (дд, $J = 8.0, 1.5$ Гц, 1H), 7.41 (дд, $J = 8.5, 7.3, 1.5$ Гц, 1H), 7.25 – 7.10 (м, 2H), 7.10 – 7.05 (м, 1H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{уд}$ =2.304 мин, 99%.

Синтез N-(3-трифторметилфенил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазол-2-амина (137d)

Выход: 370 мг, 93%, коричневый порошок, R_f : 0.24 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 235-236 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): δ 11.82 (с, 1H), 10.56 (с, 1H), 8.51 (д, $J = 2.6$ Гц, 1H), 8.43 (дд, $J = 7.9, 1.6$ Гц, 1H), 8.21 (дд, $J = 4.7, 1.5$ Гц, 1H), 7.85 (дд, $J = 2.7, 1.5$ Гц, 1H), 7.66 (д, $J = 8.3$ Гц, 1H), 7.49 (т, $J = 7.9$ Гц, 1H), 7.26 – 7.16 (м, 1H), 7.10 (с, 1H), 7.07 (дд, $J = 7.9, 4.6$ Гц, 1H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{уд}$ =2.419 мин, 97%.

Синтез 2-(4-хлорфенил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазола (140a)

Выход: 370 мг, 92%, бежевый порошок, R_f : 0.48 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 257-258 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): δ 12.00 (с, 1H), 8.61 (дд, $J = 7.9, 1.6$ Гц, 1H), 8.31 (дд, $J = 4.6, 1.6$ Гц, 1H), 8.12 (с, 1H), 8.09 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.96 (с, 1H), 7.64 – 7.57 (м, 2H), 7.22 (дд, $J = 7.9, 4.6$ Гц, 1H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{уд}$ =2.313 мин, 94%.

Синтез 2-(4-метоксифенил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазола (140b)

Выход: 360 мг, 91%, светло-желтый порошок, R_f : 0.65 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 258-260 °С; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): δ 11.96 (с, 1H), 8.61 (дд, $J = 7.9, 1.6$ Гц, 1H), 8.30 (дд, $J = 4.6, 1.6$ Гц, 1H), 8.09 (д, $J = 2.6$ Гц, 1H), 8.01 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.83 (с, 1H), 7.21 (дд, $J = 7.9, 4.6$ Гц, 1H), 7.10 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 3.85 (с, 3H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{уд}$ =2.314 мин, 97%.

Синтез 2-(азепан-1-ил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазола (142b)

Выход: 281 мг, 73%, кремовый порошок, R_f: 0.74 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 197-199 °С; ¹H ЯМР (700 МГц, DMSO-d₆): δ 11.75 (с, 1H), 8.44 (дд, J = 7.9, 1.6 Гц, 1H), 8.24 (дд, J = 4.7, 1.6 Гц, 1H), 7.82 (д, J = 2.5 Гц, 1H), 7.13 (дд, J = 7.9, 4.6 Гц, 1H), 6.87 (с, 1H), 3.62 (т, J = 5.9 Гц, 4H), 1.87 – 1.74 (м, 4H), 1.62 – 1.49 (м, 4H); ВЭЖХ: 300 нм, t_{уд}=1.984 мин, 99%.

Синтез 2-(пирролидин-1-ил)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазола (142c)

Выход: 274 мг, 79%, светло-желтый порошок, R_f: 0.55 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 196-198 °С; ¹H ЯМР (700 МГц, DMSO-d₆): δ 11.76 (с, 1H), 8.47 (дд, J = 7.9, 1.6 Гц, 1H), 8.25 (дд, J = 4.6, 1.6 Гц, 1H), 7.82 (д, J = 2.2 Гц, 1H), 7.13 (дд, J = 7.9, 4.6 Гц, 1H), 6.89 (с, 1H), 3.52 – 3.42 (м, 4H), 2.07 – 1.95 (м, 4H); ВЭЖХ: 300 нм, t_{уд}=1.978 мин, 100%.

Синтез 4-(4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазол-2-ил)морфолина (142d)

Выход: 291 мг, 79%, кремовый порошок, R_f: 0.56 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 256-258 °С; ¹H ЯМР (700 МГц, DMSO-d₆): δ 11.80 (с, 1H), 8.45 (дд, J = 8.0, 1.6 Гц, 1H), 8.25 (дд, J = 4.6, 1.6 Гц, 1H), 7.86 (д, J = 2.6 Гц, 1H), 7.14 (дд, J = 7.9, 4.6 Гц, 1H), 7.07 (с, 1H), 3.81 – 3.71 (м, 4H), 3.51 – 3.42 (м, 4H); ВЭЖХ: 300 нм, t_{уд}=2.396 мин, 100%.

Синтез 2-(4-бензилпиперазин)-4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)тиазола (142e)

Выход: 324 мг, 67%, оранжевые кристаллы, R_f: 0.64 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 212-214 °С; ¹H ЯМР (700 МГц, DMSO-d₆): δ 11.79 (с, 1H), 8.44 (дд, J = 8.0, 1.6 Гц, 1H), 8.25 (дд, J = 4.6, 1.6 Гц, 1H), 7.84 (д, J = 2.6 Гц, 1H), 7.35 (д, J = 4.8 Гц, 4H), 7.30 – 7.25 (м, 1H), 7.13 (дд, J = 7.9, 4.6 Гц, 1H), 7.02 (с, 1H), 3.56 (с, 2H), 3.52 – 3.47 (м, 4H), 2.53 (т, J = 5.1 Гц, 4H); ВЭЖХ: 300 нм, t_{уд}=1.921 мин, 97%.

Синтез 4-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-3-ил)-2-(-4-(n-толил)пиперазин-1-ил)тиазола (142f)

Выход: 176 мг, 37%, оранжевые кристаллы, R_f : 0.78 (PhMe:MeOH 10:2), т.пл: 259-260 °C; ^1H ЯМР (700 МГц, DMSO- d_6): δ 11.81 (д, $J = 2.7$ Гц, 1H), 8.48 (дд, $J = 8.0, 1.6$ Гц, 1H), 8.26 (дд, $J = 4.6, 1.6$ Гц, 1H), 7.87 (д, $J = 2.6$ Гц, 1H), 7.23 – 7.13 (м, 3H), 7.10 – 7.06 (м, 2H), 7.00 (т.д, $J = 7.4, 1.2$ Гц, 1H), 3.72 – 3.59 (м, 4H), 3.02 (т, $J = 5.0$ Гц, 4H), 2.32 (с, 3H); ВЭЖХ: 300 нм, $t_{\text{уд}}=2.107$ мин, 94%.

3.4 Компьютерное моделирование

Все расчеты в рамках выполненной выпускной квалификационной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2022-4 на рабочей станции на рабочей станции, снабженной 64 ядерным процессором AMD Ерус 7513 (тактовая частота 2.6 ГГц) и двумя графическими картами NVIDIA GA102GL (RTX A5000), под управлением ОС Ubuntu 22.04.

3.4.1 Подготовка белков

Кристаллическая структура ROCK1 (PDB ID: 5KKS [78]) была загружена из Protein Data Bank [90]. Подготовка белков проводилась с помощью модуля Protein Preparation Workflow [93]. Были добавлены отсутствующие атомы в боковых цепях, уточнены некоторые порядки связей, предсказаны состояния протонирования для гетероатомов с помощью алгоритма Epik [94] $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$, а также были добавлены атомы водорода. Комплекс был подвергнут этапу минимизации, все молекулы воды удалены.

3.4.2 Подготовка лигандов

Структуры исследуемых соединений были созданы с использованием модуля 2D-Sketcher, подготовлены с помощью LigPrep [93], хиральность определялась на основании 3D-представления, состояния протонирования гетероатомов определялись с помощью алгоритма Epik [94] $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$.

Значения физико-химических свойств были рассчитаны с помощью QikProp [87] и Prime [88, 89].

3.4.3 Молекулярный докинг и расчет свободной энергии связывания MM-GBSA

Грид-боксы были рассчитаны с помощью модуля Receptor Grid Generation. Область стыковки определялась как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с центром масс нативного лиганда. Параметры масштабирования радиусов Ван-дер-Ваальса и отсечки значений частичных зарядов были установлены по умолчанию и не изменялись. Дополнительно были указаны остатки, с которыми нативный лиганд образовывал водородные связи. Всем тиольным или гидроксильным группам аминокислот сайта было позволено вращение.

Структуры всех исследуемых соединений, а также кристаллического лиганда были подвергнуты гибкой стыковке с помощью модуля Ligand Docking в режиме точности Glide XP [92]. Дополнительно с помощью модуля Prime [95] на основе полученных поз был проведен расчет свободной энергии связывания методом MM-GBSA, все параметры устанавливались по умолчанию и не изменялись.

3.5 Биологические испытания

3.5.1 Культивирование клеточной линии

Клеточная линия HEK293 была получена из ATCC [96]. Клетки HEK293 поддерживали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 mM). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂ при 37 °C. Субконфлюэнтный монослой в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере (PBS) и трижды

промывали полной питательной средой DMEM. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

3.5.2 МТТ-тест

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток определяли с помощью колориметрического теста МТТ. Подготовка клеток к МТТ включала в себя процесс трипсинизации и подсчета клеток. Все исследуемые клетки разбавляли питательной средой до 5×10^3 клеток/лунку в прозрачном 96-луночном планшете (Eppendorf). Через 24 ч. клетки обрабатывали исследуемыми соединениями по отдельности в различных концентрациях и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Далее клетки обрабатывали 40 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение 4 часов при тех же условиях. Затем содержимое лунок удаляли и добавляли DMSO (150 μМ) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность каждой лунки определяли при 560 нм на планшетном ридере Promega. Полученные данные обрабатывались в приложении GraphPad Prism для анализа и визуализации результатов в виде графиков.

Заключение

По результатам данной работы можно сделать следующие выводы:

1. Был проведен поиск мишени и оценка способа связывания библиотеки исследуемых соединений в ее АТФ сайт. Выявлен консервативный способ связывания общего скаффолда и сохранение ключевых взаимодействий с аминокислотами в шарнирной области сайта. Соединение **142e** сохранило дополнительное ключевое взаимодействие с Lys105, а соединение **137d** образовало новые в гидрофобной области. Дополнительно были рассчитаны физико-химические свойства, по итогу которых все соединения соответствуют перорально биодоступным препаратам.

2. Успешно синтезирована библиотека соединений для ее оценки на клеточных моделях *in vitro*.

3. Провели биологические испытания полученных ранее соединений. Клеточная модель показала низкий цитотоксический эффект всех молекул, что позволяет использовать всю библиотеку для дальнейшей их оценки путем анализа жизнеспособности клеточной линии iPS. Было выявлено соответствие гипотезе о возможном использовании ингибиторов ROCK1/2 в качестве дополнительного инструмента при культивировании клеточных линий стволовых клеток.

Список используемой литературы

1. World health organization. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/factsheets/detail/cancer> (дата обращения: 28.07.2023)
2. Ferlay J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview // International journal of cancer. – 2021. – V. 149. – №. 4. – P. 778-789.
3. Siegel R. L. et al. Colorectal cancer statistics, 2017 // CA: a cancer journal for clinicians. – 2017. – V. 67. – №. 3. – P. 177-193.
4. Ferlay J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // International journal of cancer. – 2019. – V. 144. – №. 8. – P. 1941-1953.
5. Ferlay J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // International journal of cancer. – 2015. – V. 136. – №. 5. – P. 359-386.
6. Gorlick R., Bertino J. R. Clinical pharmacology and resistance to dihydrofolate reductase inhibitors // Antifolate drugs in cancer therapy. – Totowa, NJ : Humana Press, 1999. – P. 37-57.
7. Вахрушева, Т. И. Онкология : учебное пособие / Т. И. Вахрушева. — Красноярск : КрасГАУ, 2018. — 330 с.
8. Fadeyi O. O. et al. Novel fluorinated acridone derivatives. Part 1: Synthesis and evaluation as potential anticancer agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2008. – V. 18. – №. 14. – P. 4172-4176.
9. Yang D. et al. Copper-catalyzed domino synthesis of nitrogen heterocycle-fused benzoimidazole and 1, 2, 4-benzothiadiazine 1, 1-dioxide derivatives // ACS Combinatorial Science. – 2015. – V. 17. – №. 2. – P. 113-119.
10. U. S. Food and Drug Administration. URL: <https://www.fda.gov/> (Дата обращения: 28.07.2023)
11. Herden M., Waller C. F. Alectinib // Small Molecules in Oncology. – 2018. – P. 247-256.

12. Shao W. et al. Potent anticancer activity of a pan-deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) as a single agent in in vitro and in vivo tumor models // *Cancer Research*. – 2008. – V. 68. – №. 9_Supplement. – P. 735-735.
13. Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges // *Cancer letters*. – 2009. – V. 280. – №. 2. – P. 233-241.
14. Scott L. J. Lenvatinib: first global approval // *Drugs*. – 2015. – V. 75. – P. 553-560.
15. Brownsey D. K. et al. Rapid synthesis of pomalidomide-conjugates for the development of protein degrader libraries // *Chemical Science*. – 2021. – V. 12. – №. 12. – P. 4519-4525.
16. Elkinson S., McCormack P. L. Pomalidomide: first global approval // *Drugs*. – 2013. – V. 73. – №. 6. – P. 595-604.
17. Rios-Tamayo R. et al. Pomalidomide in the treatment of multiple myeloma: design, development and place in therapy // *Drug design, development and therapy*. – 2017. – P. 2399-2408.
18. Kumar D. et al. An expeditious synthesis and anticancer activity of novel 4-(3'-indolyl) oxazoles // *European journal of medicinal chemistry*. – 2010. – V. 45. – №. 3. – P. 1244-1249.
19. Naik S. R., Harindran J., Varde A. B. Pimprinine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity // *Journal of biotechnology*. – 2001. – V. 88. – №. 1. – P. 1-10.
20. Zhang M. Z. et al. First discovery of pimprinine derivatives and analogs as novel potential herbicidal, insecticidal and nematocidal agents // *Tetrahedron*. – 2021. – V. 79. – P. 131835.
21. Zhou D. et al. Studies toward the discovery of the next generation of antidepressants. Part 6: Dual 5-HT_{1A} receptor and serotonin transporter affinity within a class of arylpiperazinyl-cyclohexyl indole derivatives // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2008. – V. 16. – №. 14. – P. 6707-6723.

22. Ahuja P., Siddiqui N. Anticonvulsant evaluation of clubbed indole-1, 2, 4-triazine derivatives: A synthetic approach // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – V. 80. – P. 509-522.

23. Zhang M. Z. et al. Synthesis and antifungal activity of 3-(1, 3, 4-oxadiazol-5-yl)-indoles and 3-(1, 3, 4-oxadiazol-5-yl) methyl-indoles // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2013. – V. 63. – P. 22-32.

24. Liu B. et al. Discovery of pimprinine alkaloids as novel agents against a plant virus // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2019. – V. 67. – №. 7. – P. 1795-1806.

25. Ma J. et al. Design, synthesis, biological evaluation and preliminary mechanism study of novel benzothiazole derivatives bearing indole-based moiety as potent antitumor agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – V. 96. – P. 173-186.

26. Chen G. et al. Synthesis and biological evaluation of novel oxindole-based RTK inhibitors as anti-cancer agents // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2014. – V. 22. – №. 24. – P. 6953-6960.

27. El-Sharief A. M. S. et al. Design, synthesis, molecular docking and biological activity evaluation of some novel indole derivatives as potent anticancer active agents and apoptosis inducers // *Bioorganic chemistry*. – 2019. – V. 85. – P. 399-412.

28. Kumar D. et al. Synthesis and biological evaluation of indolyl chalcones as antitumor agents // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2010. – V. 20. – №. 13. – P. 3916-3919.

29. Dweedar H. E. et al. Analogue-based design, synthesis and biological evaluation of 3-substituted-(methylenedrazono) indolin-2-ones as anticancer agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – V. 78. – P. 275-280.

30. Yang S. W. et al. Synthesis and biological evaluation of analogues of cryptolepine, an alkaloid isolated from the Suriname rainforest // *Journal of natural products*. – 1999. – V. 62. – №. 7. – P. 976-983.

31. Jeanty M. et al. Synthesis of 4-and 6-Azaindoles via the Fischer Reaction // *Organic Letters*. – 2009. – V. 11. – №. 22. – P. 5142-5145.
32. Mérour J. Y. et al. The azaindole framework in the design of kinase inhibitors // *Molecules*. – 2014. – V. 19. – №. 12. – P. 19935-19979.
33. Curtis N. R. et al. Synthesis and SAR of 2-and 3-substituted 7-azaindoles as potential dopamine D4 ligands // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 1999. – V. 9. – №. 4. – P. 585-588.
34. Zhang Z. et al. A General Method for the Preparation of 4-and 6-Azaindoles // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2002. – V. 67. – №. 7. – P. 2345-2347.
35. Jadhav J. et al. Facile access to 3-cyano-4-azaindoles via a modified Madelung indole synthesis // *Tetrahedron Letters*. – 2013. – V. 54. – №. 50. – P. 6858-6863.
36. Mahadevan I., Rasmussen M. Synthesis of pyrrolopyridines (azaindoles) // *Journal of heterocyclic chemistry*. – 1992. – V. 29. – №. 2. – P. 359-367.
37. Maehr H., Smallheer J. M. A new approach to 4-substituted indoles // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1981. – T. 46. – №. 8. – C. 1752-1755.
38. Fisher M. H., Matzuk A. R. A convenient synthesis of 6-azaindole // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1969. – V. 6. – №. 5. – P. 775-776.
39. Lorenz R. R. et al. A New Indole Synthesis1 // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1965. – V. 30. – №. 8. – P. 2531-2533.
40. McLaughlin M., Palucki M., Davies I. W. Efficient access to azaindoles and indoles // *Organic Letters*. – 2006. – V. 8. – №. 15. – P. 3307-3310.
41. Ye Q. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 4-azaindolyl-indolyl-maleimides as glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2009. – V. 17. – №. 13. – P. 4302-4312.
42. Pin F. et al. Synthesis and biological evaluation of 2, 3-bis (het) aryl-4-azaindole derivatives as protein kinase inhibitors // *MedChemComm*. – 2011. – V. 2. – №. 9. – P. 899-903.

43. Venkat Swamy P. et al. Amide derivatives of 4-azaindole: Design, synthesis, and EGFR targeting anticancer agents // *Synthetic Communications*. – 2020. – V. 50. – №. 1. – P. 71-84.
44. Prudent R. et al. Azaindole derivatives are inhibitors of microtubule dynamics, with anti-cancer and anti-angiogenic activities // *British journal of pharmacology*. – 2013. – V. 168. – №. 3. – P. 673-685.
45. Zhang Y. et al. Discovery of 4-azaindole inhibitors of TGF β RI as immuno-oncology agents // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – V. 9. – №. 11. – P. 1117-1122.
46. Yang C. et al. Discovery of a novel series of 7-azaindole scaffold derivatives as PI3K inhibitors with potent activity // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2017. – V. 8. – №. 8. – P. 875-880.
47. Vijayan R. S. K. et al. Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors // *Journal of medicinal chemistry*. – 2015. – V. 58. – №. 1. – P. 466-479.
48. Kenakin T. Efficacy at G-protein-coupled receptors // *Nature reviews Drug discovery*. – 2002. – V. 1. – №. 2. – P. 103-110.
49. MacLachlan T. K. et al. Binding of CDK9 to TRAF2 // *Journal of cellular biochemistry*. – 1998. – V. 71. – №. 4. – P. 467-478.
50. Pieterse L. et al. Synthesis and biological evaluation of selected 7H-pyrrolo [2, 3-d] pyrimidine derivatives as novel CDK9/CyclinT and Haspin inhibitors // *Chemico-Biological Interactions*. – 2021. – V. 349. – P. 109643.
51. Pieterse L. et al. Synthesis and biological evaluation of selected 7-azaindole derivatives as CDK9/Cyclin T and Haspin inhibitors // *Medicinal Chemistry Research*. – 2020. – V. 29. – P. 1449-1462.
52. Cui J. J. et al. Structure based drug design of crizotinib (PF-02341066), a potent and selective dual inhibitor of mesenchymal–epithelial transition factor (c-MET) kinase and anaplastic lymphoma kinase (ALK) // *Journal of medicinal chemistry*. – 2011. – V. 54. – №. 18. – P. 6342-6363.

53. Tang Q. et al. Discovery of novel 7-azaindole derivatives bearing dihydropyridazine moiety as c-Met kinase inhibitors // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 133. – P. 97-106.

54. Cai Z. W. et al. Discovery of orally active pyrrolopyridine- and aminopyridine-based Met kinase inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2008. – V. 18. – №. 11. – P. 3224-3229.

55. Rodriguez A. L. et al. Versatile indole synthesis by a 5-endo-dig cyclization mediated by potassium or cesium bases // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2000. – V. 39. – №. 14. – P. 2488-2490.

56. Mao W. et al. The important roles of RET, VEGFR2 and the RAF/MEK/ERK pathway in cancer treatment with sorafenib // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2012. – V. 33. – №. 10. – P. 1311-1318.

57. Tang J. et al. Knowledge-based design of 7-azaindoles as selective B-Raf inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2008. – V. 18. – №. 16. – P. 4610-4614.

58. Jiang W. et al. Mammalian Cdc7–Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication // *The EMBO journal*. – 1999. – V. 18. – №. 20. – P. 5703-5713.

59. Montagnoli A. et al. Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells // *Cancer research*. – 2004. – V. 64. – №. 19. – P. 7110-7116.

60. Harrington P. E. et al. The optimization of aminooxadiazoles as orally active inhibitors of Cdc7 // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2013. – V. 23. – №. 23. – P. 6396-6400.

61. Ermoli A. et al. Cell Division Cycle 7 Kinase Inhibitors: 1 H-Pyrrolo [2, 3-b] pyridines, Synthesis and Structure– Activity Relationships // *Journal of medicinal chemistry*. – 2009. – V. 52. – №. 14. – P. 4380-4390.

62. Tong Y. et al. Azaindole-based inhibitors of Cdc7 kinase: impact of the Pre-DFG residue, Val 195 // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2013. – V. 4. – №. 2. – P. 211-215.

63. Lebel L. A. et al. Dopamine uptake inhibitory activity of novel tryptamine 5-HT1 receptor ligands // *Drug Development Research*. – 1994. – V. 33. – №. 4. – P. 413-421.

64. Sagara Y. et al. Identification of novel muscarinic M3 selective antagonists with a conformationally restricted Hyp-Pro spacer // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2003. – V. 13. – №. 1. – P. 57-60.

65. Dai W. et al. Structure-based design of N-(5-phenylthiazol-2-yl) acrylamides as novel and potent glutathione S-transferase Omega 1 inhibitors // *Journal of medicinal chemistry*. – 2019. – V. 62. – №. 6. – P. 3068-3087.

66. Shaffer A. A., Wierschke S. G. Comparison of computational methods applied to oxazole, thiazole, and other heterocyclic compounds // *Journal of computational chemistry*. – 1993. – V. 14. – №. 1. – P. 75-88.

67. Cho Y. S. et al. Identification of 4-[4-(4-fluoro-phenyl)-thiazol-2-ylamino]-2, 6-dimethyl-phenol (KR-33749) as an inhibitor of 5-lipoxygenase with potent antiinflammatory activity // *Pharmacology*. – 2010. – V. 86. – №. 2. – P. 65-72.

68. Hanke T. et al. Aminothiazole-featured pirinixic acid derivatives as dual 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E2 synthase-1 inhibitors with improved potency and efficiency in vivo // *Journal of medicinal chemistry*. – 2013. – V. 56. – №. 22. – P. 9031-9044.

69. Yan G. et al. 2-Substituted-thio-N-(4-substituted-thiazol/1H-imidazol-2-yl) acetamides as BACE1 inhibitors: Synthesis, biological evaluation and docking studies // *European journal of medicinal chemistry*. – 2017. – V. 137. – P. 462-475.

70. Vukovic N. et al. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Novel 2-Aminothiazole Derivatives of 4-Hydroxy-chromene-2-one // *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*. – 2008. – V. 341. – №. 8. – P. 491-496.

71. Palkar M. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of a Novel Series of 2, 3-Diaryl-substituted-imidazo (2, 1-b)-benzothiazole Derivatives // *Archiv der Pharmazie*. – 2010. – V. 343. – №. 6. – P. 353-359.

72. Annadurai S. et al. Design and synthesis of 2-aminothiazole based antimicrobials targeting MRSA // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2012. – V. 22. – №. 24. – P. 7719-7725.

73. Greenfield A., Grosanu C. Convenient synthesis of primary sulfonamides // *Tetrahedron Letters*. – 2008. – V. 49. – №. 44. – P. 6300-6303.

74. Larsen S. D. et al. A catch-and-release strategy for the combinatorial synthesis of 4-acylamino-1, 3-thiazoles as potential CDK5 inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2003. – V. 13. – №. 20. – P. 3491-3495.

75. Bandarage U. K. et al. ROCK inhibitors 4: Structure-activity relationship studies of 7-azaindole-based rho kinase (ROCK) inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2021. – V. 33. – P. 127721.

76. Schirok H. et al. Design and Synthesis of Potent and Selective Azaindole-Based Rho Kinase (ROCK) Inhibitors // *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. – 2008. – V. 3. – №. 12. – P. 1893-1904.

77. Sessions E. H. et al. Discovery and optimization of indole and 7-azaindoles as Rho kinase (ROCK) inhibitors (part-II) // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2011. – V. 21. – №. 23. – P. 7113-7118.

78. Bandarage U. K. et al. ROCK inhibitors 3: Design, synthesis and structure-activity relationships of 7-azaindole-based Rho kinase (ROCK) inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2018. – V. 28. – №. 15. – P. 2622-2626.

79. Ishida M. et al. A ROCK inhibitor promotes graft survival during transplantation of iPS-cell-derived retinal cells // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 6. – P. 3237-3240.

80. Claassen D. A., Desler M. M., Rizzino A. ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells // *Molecular reproduction and development*. – 2009. – V. 76. – №. 8. – P. 722-732.

81. Kurosawa H. Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells // Journal of bioscience and bioengineering. – 2012. – V. 114. – №. 6. – P. 577-581.

82. Ohgushi M. et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells // Cell stem cell. – 2010. – V. 7. – №. 2. – P. 225-239.

83. Goud P. M. et al. Design, synthesis and evaluation of trisubstituted thiazoles targeting Plasmodium falciparum cysteine proteases // Medicinal Chemistry Research. – 2005. – V. 14. – P. 74-105.

84. Soni L. K., Narsinghani T., Jain R. Synthesis and antibacterial screening of some 1-Aroyl-3-aryl thiourea derivatives // International Scholarly Research Notices. – 2014. – V. 2014. – P. 1-7.

85. Vicentini C. B. et al. A new procedure for the synthesis of 4H-pyrazolo [1, 5-c][1, 3, 5] thiadiazine-4-thiones // Journal of Heterocyclic Chemistry. – 1994. – V. 31. – №. 6. – P. 1477-1480.

86. Zaorska E. et al. Evaluation of thioamides, thiolactams and thioureas as hydrogen sulfide (H₂S) donors for lowering blood pressure // Bioorganic Chemistry. – 2019. – V. 88. – P. 102941.

87. Jorgensen W. L., Duffy E. M. Prediction of drug solubility from structure // Advanced drug delivery reviews. – 2002. – V. 54. – №. 3. – P. 355-366.

88. База знаний Schrödinger, статья о Prime MM/GBSA. URL: <https://www.schrodinger.com/kb/1647/> (дата обращения: 3.12.2023)

89. Li J. et al. The VSGB 2.0 model: a next generation energy model for high resolution protein structure modeling // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2011. – V. 79. – №. 10. – P. 2794-2812.

90. Банк белковых данных (англ. Protein Data Bank, PDB). URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 9.11.2023)

91. Friesner R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy // Journal of medicinal chemistry. – 2004. – V. 47. – №. 7. – P. 1739-1749.

92. Friesner R. A. et al. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes // Journal of medicinal chemistry. – 2006. – V. 49. – №. 21. – P. 6177-6196.

93. Madhavi Sastry G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments // Journal of computer-aided molecular design. – 2013. – V. 27. – P. 221-234.

94. Shelley J. C. et al. Epik: a software program for pK a prediction and protonation state generation for drug-like molecules // Journal of computer-aided molecular design. – 2007. – V. 21. – P. 681-691.

95. Jacobson M. P. et al. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations // Journal of molecular biology. – 2002. – V. 320. – №. 3. – P. 597-608.

96. Американская коллекция типовых культур (англ. American Type Culture Collection). URL: <https://www.atcc.org/> (дата обращения: 11.03.2024)