

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

Институт химии и инженерной экологии
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)
04.03.01 «Химия»
(код и наименование направления подготовки, специальности)
«Медицинская и фармацевтическая химия»
(наименование(профиль)/специализации)

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему: Структурно-ориентированный молекулярный дизайн
высокоаффинного ингибитора EGFR-киназы, содержащего 4-
аминопиримидиновый скаффолд

Студент	В.В. Дуданова	
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Руководитель	Е.В. Варакина	
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Консультанты	Е.Ю. Аношина	
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)

Допустить к защите

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко _____
(ученая степень, звание, И.О. Фамилия) (личная подпись)

« »

Тольятти 2018 г.

АННОТАЦИЯ

Представленная работа демонстрирует результаты комплексного исследования по структурно-ориентированному молекулярному дизайну высокоаффинного ингибитора EGFR-киназы, содержащего 4-аминопиримидиновый скаффолд.

ABSTRACT

The title of the graduation work is “Structurally-oriented molecular design of high-affinity EGFR kinase inhibitor, containing 4-aminopyrimidine scaffold”.

The aim of the work is to develop a synthetic approach for the preparation of 4-aminopyrimidine scaffold and to obtain a number of new compounds. The object of the work is a complex study of structurally-oriented molecular design of high-affinity EGFR kinase inhibitor, containing 4-aminopyrimidine scaffold.

The graduation work consists of an introduction, two chapters, a conclusion, list of 156 references, all of which are foreign sources. The text of the work contains 1 scheme of chemical reactions.

The first part of the work provides detailed information on approved and experimental preparations of kinase inhibitors.

The second part gives a detailed description of the structure of the new synthesized compounds using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. On the design of inhibitors and their biological activity.

The third part represents the methods synthesis of inhibitors and their physical and chemical properties.

According to the results of the work done, it can be concluded that synthesized compounds are more than forty times greater than gefitinib in cytotoxicity.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1.ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1. Утвержденные и экспериментальные препараты ингибиторов киназы.9	
1.1.1 <i>BCR-ABL</i> Киназы.....	9
1.1.2 <i>SRC</i> Киназы	11
1.1.3 <i>Рецептор эпидермального фактора роста киназы</i>	12
1.1.4 <i>Подсемейство киназ рецептора CSF1 / PDGF</i>	15
1.1.5 <i>Фибробласт-рецепторные киназы</i>	18
1.1.6 <i>Гепатоцитарный рецептор фактора роста (HGFR или MET)</i> ...	19
1.1.7 <i>Анапластическая лимфатическая киназа</i>	19
1.1.8 <i>IGF1R и IR</i>	21
1.1.9 <i>Киназа рецептора тропомиозина</i>	22
1.1.10 <i>Трансформирование рецептора фактора роста-β</i>	24
1.1.11 <i>Janus</i> киназы.....	24
1.1.12 <i>Bruton Tyrosine</i> Киназы.....	25
1.1.13 <i>Фокальная адгезия киназы</i>	26
1.1.14 <i>Spleen Tyrosine</i> киназы	26
1.1.15 <i>PI3K-киназные пути</i>	27
1.1.16 <i>Protein Kinase C</i>	34
1.1.17 <i>Choline Kinase-α</i>	35
1.1.18 <i>PIM</i>	36
1.1.19 <i>Пути киназной активации митогена</i>	37
1.1.20 <i>p38 MAPK</i>	40
1.1.21 <i>MNK</i>	41
1.1.22 <i>Циклин-зависимые киназы</i>	42
1.1.23 <i>ДНК киназные пути ответа</i>	43
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	46
2.1 Конструирование ингибиторов EGFR и молекулярный докинг..	46
2.2 Синтез ингибиторов.....	49
2.3 Биологические испытания	52
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	55

3.1	Реагенты и оборудование	55
3.2	Получение исходных соединений	56
3.3	Синтез ингибиторов.....	59
3.4	Биологические испытания	67
	ВЫВОДЫ	69
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	70

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ALCL	крупноклеточная анапластическая лимфома
ALL	острый лимфоцитарный лейкоз
AML	острая миелогенная лейкемия
BCR	рецептор В-клеточного антигена
CLL	хроническая лимфоцитарная лейкемия
CML	хроническая миелогенная лейкемия
CSF1	колониестимулирующий фактор-1
DLBCL	большая диффузная В-клеточная лимфома
FKBP12	FK506-связывающий белок-12
GIST	желудочно-кишечная стромальная опухоль
IGF1	инсулиноподобный фактор роста 1
IPF	идиопатический легочный фиброз
HGFR	рецептор фактора роста гепатоцитов
IR	рецептор инсулина
MTC	медулярный рак щитовидной железы
MTKI	ингибитор многонаправленной киназы
NHL	неходжкинская лимфома
NSCLC	немелкоклеточный рак легкого
PDGF	тромбоцитарный фактор роста
PH	гомология плекстрина
PIM	провирусная вставка в мыши
PI3K	киназа, связанная с PI3K
PIP3	фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
RCC	карцинома почек
RET	во время трансфекции
RNAPII	РНК-полимераза II
VEGF _s	сосудистые эндотелиальные факторы роста

ВВЕДЕНИЕ

Дерегулирование активности протеинкиназ стало одним из базовых механизмом, с помощью которого опухолевые клетки избегают нормальных физиологических ограничений, связанных с пролиферацией и выживаемостью. Несмотря на то, что на сегодняшний день большинство ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) получило одобрение FDA и для их дальнейшей разработки прилагаются значительные усилия ведущими исследовательскими центрами, лекарственная резистентность стала основным барьером для дальнейшего успеха клинического использования таргетных препаратов, направленных на EGFR-киназу.

На данный момент одним из перспективных подходов к разработке подобного рода таргетных соединений является мишень-ориентированный дизайн, базирующийся на понимании пространственного строения белковой молекулы, возможных аминокислотных мутациях активного сайта и конформационной динамики.

Представленная работа демонстрирует результаты комплексного исследования по структурно-ориентированному молекулярному дизайну высокоаффинного ингибитора EGFR-киназы, содержащего 4-аминопиримидиновый скаффолд.

Цель работы: структурно-ориентированный молекулярный дизайн высокоаффинного ингибитора EGFR-киназы, содержащего 4-аминопиримидиновый скаффолд.

Задачи работы:

- С применением мишень-ориентированного молекулярного дизайна разработать новые цитотоксические агенты, содержащие 4-аминопиримидиновый скаффолд.
- Методами высокопроизводительного молекулярного докинга установить ключевые взаимодействия белок-лиганд, обуславливающие их высокую активность.

- Разработать синтетическую стратегию синтеза комбинаторной библиотеки производных 4-аминопиримидина.
- Получить данные по цитотоксичности синтезированных соединений.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

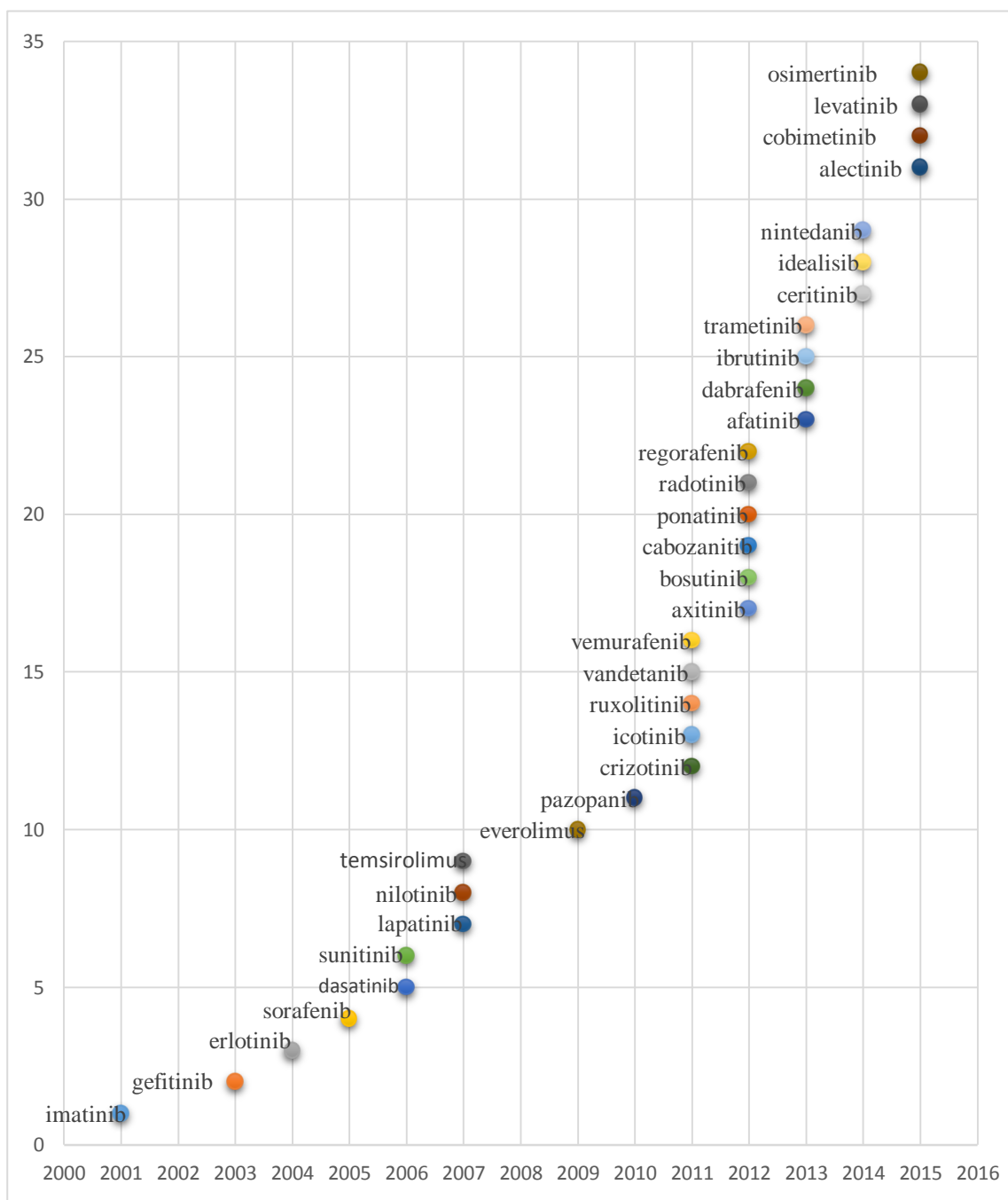
Ингибиторы киназ являются одним из наиболее важных классов развития лекарств в нескольких терапевтических показаниях, еще недавно все ингибиторы киназ, одобренные для клинического применения были противораковыми препаратами, исключение составил fasudil ROCK ингибитор [1]. Он был одобрен для лечения сердечно-сосудистых заболеваний в Японии [2], но в целом эти агенты могут иметь применение в онкологии [3]. Ситуация изменилась с одобрением в США в 2012 году ингибитора JAK - tofacitinib для лечения ревматоидного артрита [4]. В то время ожидалось, что с первым одобрением ингибитора киназы вне онкологии фармацевтические компании ускорят развитие ингибиторов киназ в диапазоне различных терапевтических показаний. Но после одобрения tofacitinib вне онкологии было только одно дополнительное утверждение: nintedanib, мультитаргетный ингибитор киназы (МТКИ), при идиопатическом легочном фиброзе (IPF) [5].

Согласно анализу новой противоопухолевой терапии, которая вошла в клинику во период 1990-2006 г., ингибирование киназы было наиболее распространенным способом действия экспериментальных агентов, тогда как ранее было наиболее распространено вмешательство в репликацию ДНК [6].

1.1. Утвержденные и экспериментальные препараты ингибиторов киназы

1.1.1 BCR-ABL Киназы

В CML по филадельфийской хромосоме генерируется онкоген BCR-ABL, это результат взаимной транслокации, сопоставляемый вирусу



мышинного лейкоза с абелсоном гена онкогенового гомолога 1 (ABL) с геном кластеров точки останова (BCR) [7]. Его одобрение, как первого ингибитора киназы ABL imatinib было успешно использовано при контроле прогрессирования от хронической фазы CML до кризиса.

Рисунок 1: История ингибиторов киназы в онкологии.

В настоящее время одобрено второе поколение ингибиторов ABL:

dasatinib и nilotinib, они эффективны против большинства устойчивых к imatinib мутантов BCR-ABL (Рис.4) [8]. Ни первые ни вторые не являются селективными и ингибируют ряд других киназ, в особенности PDGFR и SCFR. Некоторые из них были использованы для лечения стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (GIST), в которых участвуют PDGFR и SCFR [9].

Bosutinib ингибитор третьего поколения. Он активен, как и ингибиторы второго поколения, к большинству мутантов BCR-ABL, устойчивым к imatinib. Он более селективен, дополнительными мишенями являются SRC-киназы [10]. Другой ингибитор третьего поколения, ponatinib, является МТКИ, это одобренный ингибитор ABL, который обладает активностью против устойчивой к imatinib T315I в позиции гейткипера BCR-ABL мутантной киназы (рис.4) [11].

В настоящее время 6 ингибиторов ABL используются для лечения CML и еще два находятся на разных стадиях клинического развития: flumatinib (структурно связан с imatinib) и ABL 001, аллостерический ингибитор нацеленный на миристоилсвязывающий сайт в SH1-каталитической киназе.

1.1.2 SRC Киназы

Ингибиторы ABL-киназы одобренные в CML: dasatinib, nilotinib, bosutinib, и ponatinib ингибируют близкородственные киназы SRC. Они являются цитозольными Тир-киназами, которые обладают большим количеством функций в клеточной передаче сигнала, во многих твердых опухолях, в особенности в метастатических раковых, активированные формы выражены аберрантно [12]. Эти открытия привели к оценке в продвинутых твердых опухолях (NSCLC и лимфомах) двойных агентов, таких как ABL и SRC, а также saracatinib и AZD 0424[13]. Saracatinib сейчас используют как ингибитор семейства SRC FYN киназ при болезни Альцгеймера, участвует в патогенезе. Большинство SRC-селективных экспериментальных киназных ингибиторов, известных как соединение KX 01, которое является

ингибитором киназы типа III, то есть пептидомиметиком SRC киназных субстратов (рис.5).

В настоящее время успех ингибиторов SRC киназы в клинических испытаниях ограничен, предполагается необходимость в изменении испытаний для таких агентов с точки зрения проектирования комбинаторных схем с ингибиторами SRC и развития биомаркеров [14]. Недавние исследования показали, что высокоселективная киназа SRC ингибитора обладает значительными преимуществами в сравнении с двойными ABL / SRC ингибиторами, так как по крайней мере в некоторых раковых образованиях происходит супрессорная сигнализация через ABL [15]. Недавно зарегистрированные ингибиторы могут решить эту проблему, а также связанную с ABL ингибированием кардиотоксичность, поскольку они высокоселективны для SRC по сравнению с ABL [16].

1.1.3 Рецептор эпидермального фактора роста киназы

Семейство EGFR Тир-киназы состоит из четырех трансмембранных рецепторов HER1-4, сигнализации через них важны для выживания клеток и многих их функций. Они в основном были изучены для рака молочной железы и NSCLC, приводимые в действие HER2 и HER1. Как следствие, активирование мутаций в EGFR (например, делеции 19 in-frame и точечных мутаций L858R) служат как биомаркеры для выбора пациента и как обоснование использования ингибиторов EGFR [17]. Из утвержденных ингибиторов EGFR, таких как gefitinib, так и erlotinib (рис.6B) являются специфичными для HER1, многие из них его сверхэкспрессируют и используются в NSCLC [18].

Ингибиторы EGFR Тир-киназы относятся к pan-HER-целевым соединениям, включая одобренный lapatinib (рис. 6D), он ингибирует HER1 и HER2, используется при лечении рака молочной железы [19]. Icotinib также является ингибитором HER1 и HER2. HER2 участвует в гетеродимеризации с связанными с лигандом партнерами по EGFR, не имеет лиганд-связывающего внеклеточного домена. Выживаемость клеток зависит

от HER1 и HER2 ингибиторов блокирующих каталитическую активность, сигнализация влияет на пролиферацию клеток. Клинические исследования ran-HER ингибиторов были приостановлены из-за признаков непереносимой токсичности [20].

Как приобретенная, так и врожденная лекарственная устойчивость играют важную роль в частоте ответов на препараты ингибитора EGFR Тиркиназы. Как показали исследования, устойчивость к gefitinib и erlotinib через вторичную мутацию T790M остается чувствительным к типу VI второго поколения ингибиторов [21]. Это наблюдение, что такие ингибиторы могут с меньшей вероятностью индуцировать резистентность к лекарственным средствам киназных мутантов, может быть связано с тем, что ковалентные ингибиторы все еще могут блокировать мутант киназы [22]. Два таких агента, которые могут преодолеть мутацию T790M, afatinib (рис.6F) и osimertinib (рис.6G), были недавно одобрены в метастатических NSCLC. Afatinib является ингибитором ran-HER киназы, блокирующий каталитическую активность HER1-4 [22,23]. Osimertinib является селективным для T790M-мутантного HER1, а также L858R в экзоне-19 делеции мутантных форм HER1. Запас osimertinib имеет пониженную токсичность в сравнении ингибиторами EGFR используемыми в NSCLC [24,25].

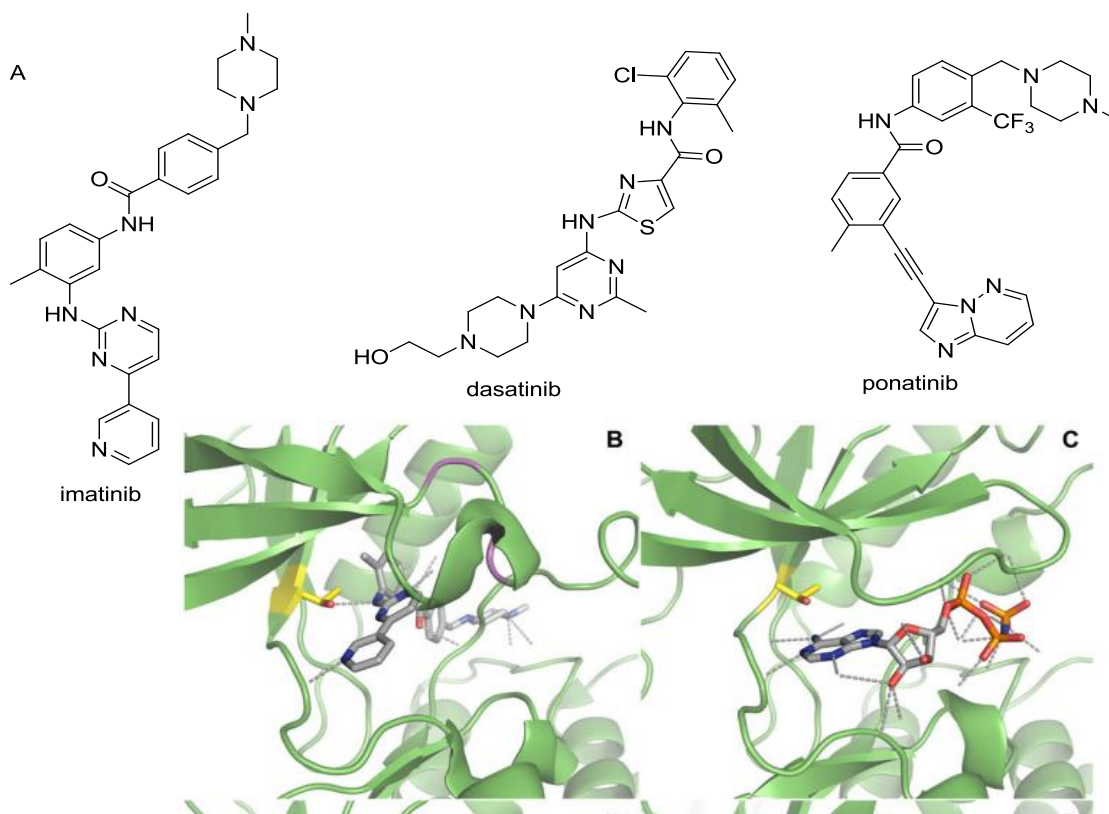


Рисунок 2: (А) Химические структуры imatinib, dasatinib, и ингибитора ABL третьего поколения (ponatinib). (В) Режим связывания ABL киназы (зеленый), иматиниба (серый), взаимодействие Н-связей (пунктирные линии) с остатком гейткипера T315 (желтый; сайты вторичной мутации Y253 и E255 в контуре, обогащенном Gly, указаны в фиолетовом цвете) [26]. (С) Связывание АТФ не включает в себя остаток T351, следовательно, каталитическая активность мутанта T315I [27] (D) Второе поколение препараты, такие как dasatinib типа I, не эффективны против мутантной киназы T315I, поскольку они также дают полярные связи с T315 [28]. (Е) ponatinib также ингибирует мутант T315I, уклоняется от измененного привратника (Ile) посредством размещения этинильной связи между его фронтом и back-pocket-binding parts [29]. Построено с помощью PDB 1IEP, 2SRC, 2GQG и 3IK3

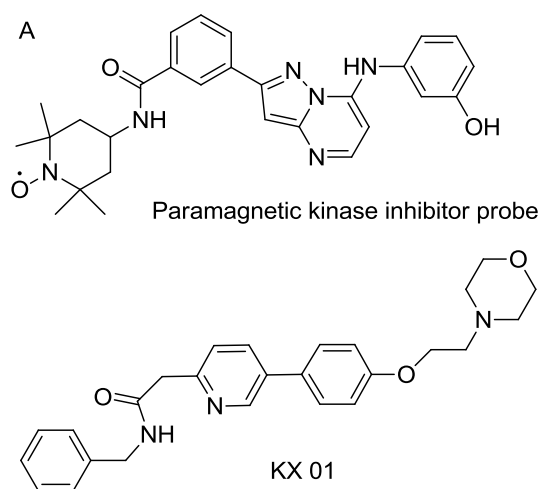
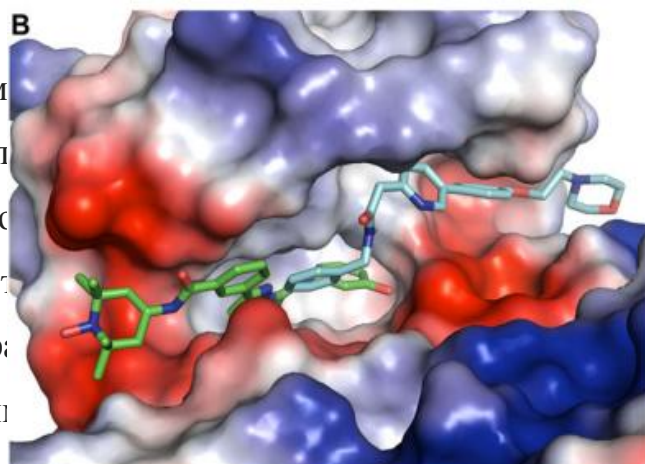


Рисунок 3: АТФ независимый ингибитор киназы субстратного пептида. Структура (запись PDB 3KXZ) этого ингибитора SRC-семейства LCK (поверхностный потенциал). Расширенная субстратная пептидная цепь будет связываться, очевидно, прокси



Четыре ингибитора типа VI в настоящее время находятся на поздней

стадии клинического развития, в том числе dasomatinib и neratinib (pan-HER и T790M HER1), а также ASP 8273 и rociletinib (T790M селективный по HER1).

1.1.4 Подсемейство киназ рецептора CSF1 / PDGF

Стимулирующий фактор-1 (CSF1) / тромбоцитарный фактор роста (PDGF) подсемейства Туг-киназ содержит ряд киназ имеющих отношение к раку: VEGFR / FLT, CSF1R, SCFR, PDGFR. VEGF действуют на три Туг-рецептора VEGFR1-3, тогда как PDGF на рецепторы PDGFR α и PDGFR β содержащие аналогичные домены Туг-киназы. И VEGFR, и PDGFR активируют клеточные пролиферации и сигнальные пути выживания, такие как PI3K-АКТ и RAF-МАР-МЕК-ERK. Эти рецепторы связаны с ангиогенезом опухолей, метастазами и прогрессией [30, 31].

Все одобренные в настоящее время препараты, ингибирующие CSF1 / PDGF Туг-киназы являются МТКІ [32].

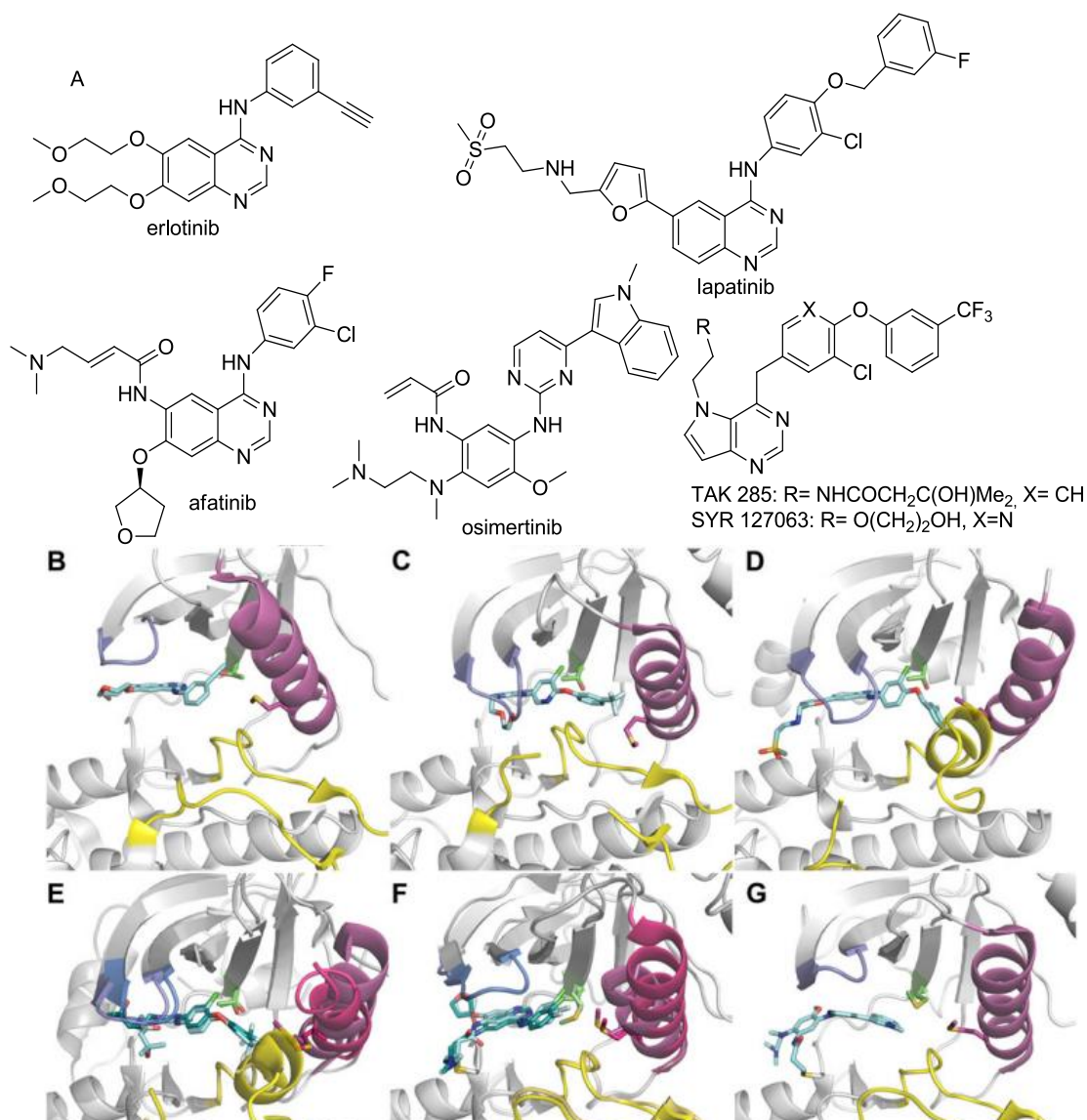


Рисунок 4: Ингибирование Тир-киназ EGFR. (А) Структуры ингибиторов киназы. (В) Erlotinib (голубой) HER1- селективный ингибитор связывающийся (серый, G-петля синяя) с белком в активной форме, А-контуром (желтый) и внутренним положением α С-спирали (пурпурный), остатками гейткипера T790 (зеленый). (С) Селективное соединение SYR 127063 связывается с HER2 в активной конформации этого белка. (D) Двойные ингибиторы HER1 и HER2, такие как lapatinib (E) TAK 285 является единственным ингибитором EGFR, для которого кристаллические комплексы с HER1 (лигандом и цветные белковые элементы в светлой окраске) и HER2 (темная окраска) были построены [33, 34]. (F) Активные ингибиторы второго типа VI против T790M-мутантных киназных форм (G) Osimertinib ингибитор типа VI, который избирательно связывается с T790M-мутантной EGFR-киназой. Построено из записей 3PP0, PDB 1M17, 3RCD, 4G5J, 1XKK, 3POZ, 4G5P.

Эти препараты по-разному используются в лечении опухолей: RCC (sunitinib, axitinib, pazopanib), GIST (sunitinib), панкреатические, метастатические, нейроэндокринные опухоли, продвинутое саркома мягких тканей (pazopanib), поздний этап медуллярного рака щитовидной железы (MTC, vandetanib) и прогрессирующий, радиойод-рефрактерный дифференцированный рак щитовидной железы (lenvatinib). Nintedanib - еще один одобренный МТКІ с активностью против киназ CSF1 / PDGF. Он получил утверждение в лечении IPF. Его активность связана со способностью nintedanib эффективно ингибировать FGFR Тир-киназы, поскольку aberrantные FGFR вносят вклад в патогенез IPF [35]. Nintedanib теперь также используется для лечения передового метастатического NSCLC в сочетании с доцетакселом. Теперь разрабатываются многочисленные дополнительные ингибиторы VEGFR, с различной избирательностью. Например, fruquitinib и cediranib являются селективными pan-VEGFR / PDGFR ингибиторами.

Хоть и имеются многочисленные свидетельства что в доклинических

испытаниях ингибиторы ангиогенеза могут подавлять развитие опухоли, последние данные показывают, что генетическое и фармакологическое подавление VEGFR может изменить развитие опухоли, увеличивая инвазию и метастазы [36, 37]. В клинических исследованиях реакция на VEGFR ингибиторы часто ограничена, а прогрессирование заболевания частично связано с выбросом опухоли в результате ингибирования VEGFR [38].

Тесно связанная с VEGFR Тир-киназами FLT3, обычно сверхэкспрессируется в лейкозы В-линии (острый миелолейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, ALL, AML), в подмножествах Т-клеток ALL и CML. Кроме того, FLT3 активирует мутации присутствующие примерно у одной трети пациентов с AML [39]. В настоящее время разрабатываются ингибиторы Т3 с активностью против FLT3, например, midostaurin, AKN 028 и PLX 7486. Quizartinib является селективным ингибитором FLT3 типа II [40], который тестируется в лечении ALL [41]. Ингибитор ТК типа I, crenolanib обладает высокой селективностью для SCFR, FLT3, PDGFR-киназ и мутантный домен-связывающий киназу резистентной формы [42]. Этот вывод поддерживает новое понятие о том, что ингибиторы II типа более селективны, чем ингибиторы типа I [43].

Среди CSF1 / PDGF Тир-киназ является SCFR. Онкогенная сигнализация от мутантного KIT особенно распространена в GIST84. Стандартная терапия для неоперабельного или метастатического GISTs - это первый imatinib, второй линии sunitinib и третий уровень regorafenib [44]. Все три эти агента являются МТКИ, которые были первоначально разработаны для альтернативных показаний. Более селективные ингибиторы SCFR также разрабатываются, например, crenolanib и PLX 9486. Активационная мутация D816V KIT происходит у > 90% пациентов с системным мастоцитозом, imatinib неэффективен в этом показании, а dasatinib напротив эффективен [45].

CSF1R-рецептор клеточной поверхности для макрофагов CSF1 и интерлейкина-34. Этот рецептор играет роль регулятора ткани, а также

связанных с опухолью макрофагов [46]. Активация CSF1R способствует прогрессированию опухоли подавляя противоопухолевый иммунный ответ, а также промотирование ангиогенеза и метастазов, они могут быть особенно полезны во многих показаниях к раку. В настоящее время разрабатываются селективные ингибиторы CSF1R, например, pexidartinib и ARRY 382.

1.1.5 Фибробласт-рецепторные киназы

Четыре изоформы (FGFR1-4) семейства рецепторов Тир-киназы структурно и функционально связанные с семейством HER и различными FGF-лигандами. Сигнализации FGFR участвуют в патогенезе нескольких видов рака, а aberrаций FGFR являются частыми (7,1% рака), особенно при уротелиальных, грудных, эндометриальных и рака легких. Ингибиторы FGFR могут быть полезны в преодолении устойчивости к ингибиторам HER, если в качестве альтернативной сигнализации FGFR-путь, это важный механизм эвакуации в случае подавления HER сигнализации. И наоборот, они способны потенцировать HER торможение [47].

В настоящее время разрабатываются более селективные ингибиторы киназы FGFR. AZD 4547, infi-gratinib и erdafitinib (рис.8А) являются мощными и селективными ингибиторами pan-FGFR, на данный момент они проходят испытания II фазы в ряде видов рака. Еще семь ингибиторов киназы FGFR на I фазе испытаний. Два из них необратимые ингибиторы PRN 1371, TAS 120 (рис.8Е) и (FGF 401) изоформа-селективный FGFR4 ингибитор.

Мутация гейткипера является одним из видов приобретенной резистентности. Мутация V561M в FGFR1 придает высокую устойчивость, например, к lucitanib (рис.8С), но не к dovitinib (рис.8D). Интересно, что AZD 4547 сохраняет сродство к мутанту V561M FGFR1, применяя режим связывания, в котором гибкая диметоксифенетильная группа находится в контакте с привратником дикого типа V561, способная сгибаться от более крупного привратника M561 в мутантной киназе [48].

1.1.6 Гепатоцитарный рецептор фактора роста (HGFR или MET)

Кинетика MET Тир-киназ является рецептором для фактора роста гепатоцитов, у которого ниже по клеточной поверхности важные сигнальные пути с точки зрения подвижности, для инвазивного роста, распространения и защиты от апоптоза. Все эти процессы важны в эмбриональном развитии и тканевом морфогенезе, но они часто становятся реактивированными при раке, особенно при метастазировании опухолей. Учредительная активация MET является особенностью многих видов рака [49], включая карциномы NSCLC с резистентностью к ингибиторам EGFR [50].

Первый одобренный ингибитор MET Тир-киназы cabozantinib, применяется для лечения пациентов с прогрессивным метастатическим МТС, МТКИ с MET и VEGFR2 в качестве основных мишеней [51]. Ряд функционально отличающихся (рис. 9) избирательных ингибиторов МТКИ MET сейчас под клинической оценкой, включая NSCLC, резистентных к EGFR ингибиторам [52]. Наиболее передовыми из них являются tivantinib, высокоселективный ингибитор MET. Tepotinib относится ко второму поколению ингибиторов активных к мутантным формам MET.

1.1.7 Анапластическая лимфатическая киназа

ALK представляет собой рецепторную Тир-киназу в IR-семействе, ее модификация присутствует у небольшой части пациентов с NSCLC, но специфическая нацеленность на лечение с помощью ALK ингибиторов очень велика [53]. Crizotinib первый одобренный ингибитор ALK в NSCLC, МТКИ первоначально был разработан как ингибитор MET, а теперь успешно применяется как терапия первой или второй линии в ALK-положительном NSCLC. Также происходят перегруппировки ALK в > 50% анапластических крупных клеточных лимфомах (ALCLs) и crizotinib, имеет клиническую активность в передовом химиорезистентном ALCL_S [54].

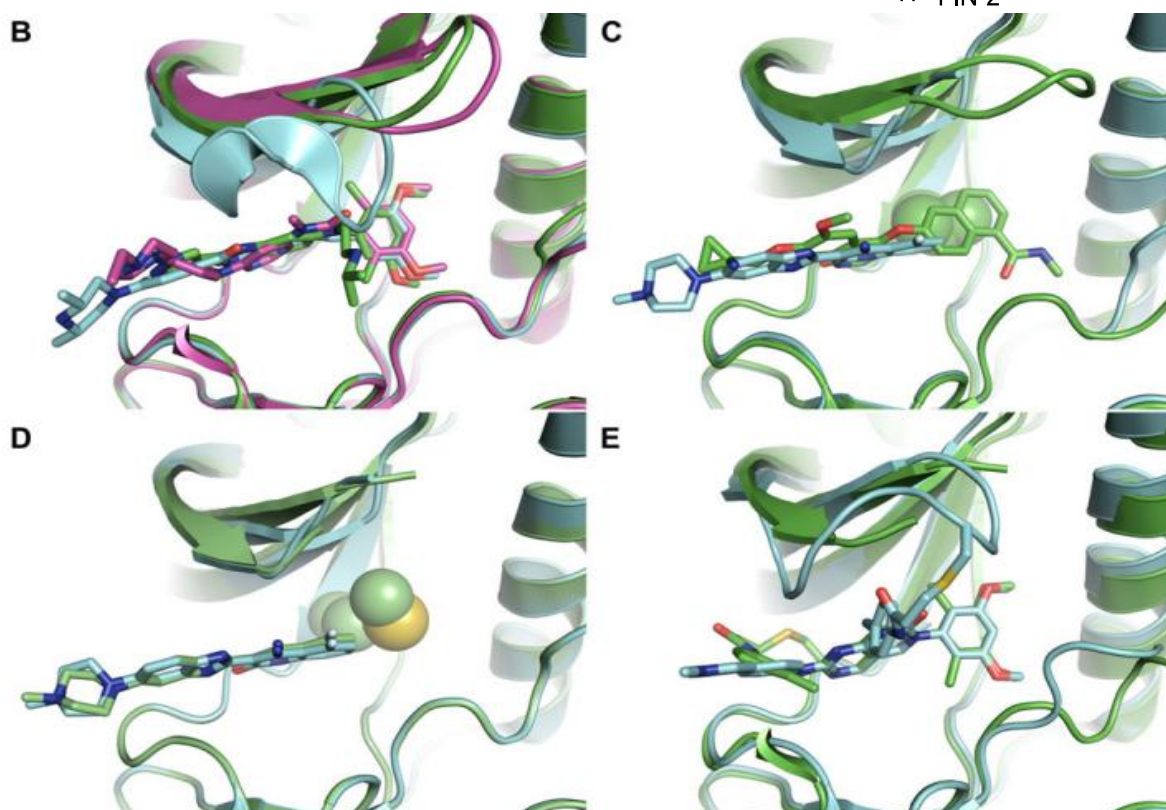
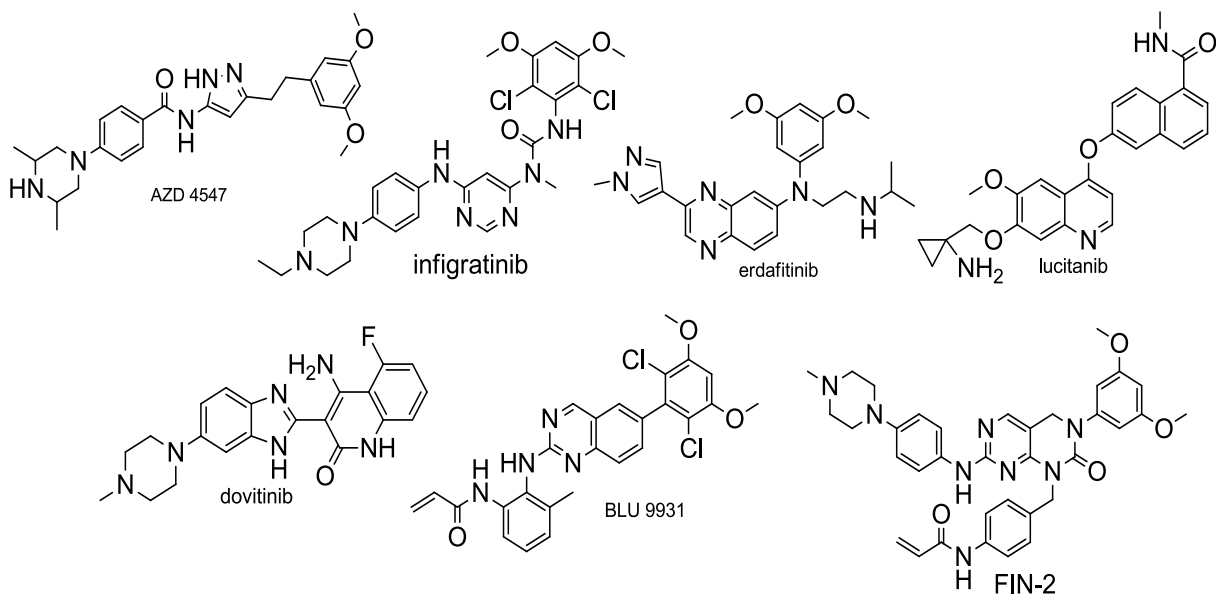
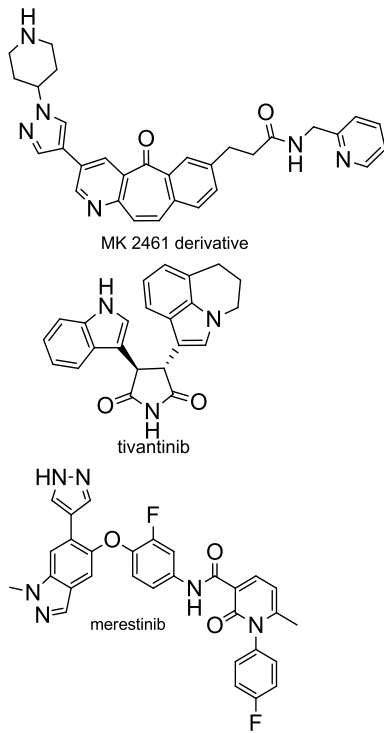


Рисунок 5: Режимы связывания ингибиторов FGFR. (А) Химические структуры ингибиторов. (В) Три наиболее продвинутых селективных ингибитора FGFR: AZD 4547 (голубой), infigratinib (пурпурный) и erdafitinib (зеленый) все содержат 3,5-диметоксифенильные группы, которые дают взаимодействия с киназой. (С) Lucatinib (зеленый) и dovitinib (голубой) являются МТКИ, которые также ингибируют киназы FGFR с высокой эффективностью. Lucatinib связывается с остатком гейткипера V561 (сферы), тогда как dovitinib нет. (D) По этой причине dovitinib ингибирует и дикий тип (голубой), и V561M-мутированный (зеленых), тогда как lucatinib неактивен против V561M FGFR [55]. (E) BLU 9931 (зеленый) представляет собой селективную изоформу ингибитора FGFR4 типа VI232.

Приобретенная резистентность - это основная причина того, что

пациенты с ALK-положительным NSCLC в конечном итоге рецидивирует на crizotinib. Один из основных драйверов для разработки второго поколения ингибиторов ALK был направлен на преодоление резистентности к crizotinib [56]. Ceritinib является мощным ингибитором ALK, он преодолевает распространенную вторичную мутацию к crizotinib (гейткипер L1196M),

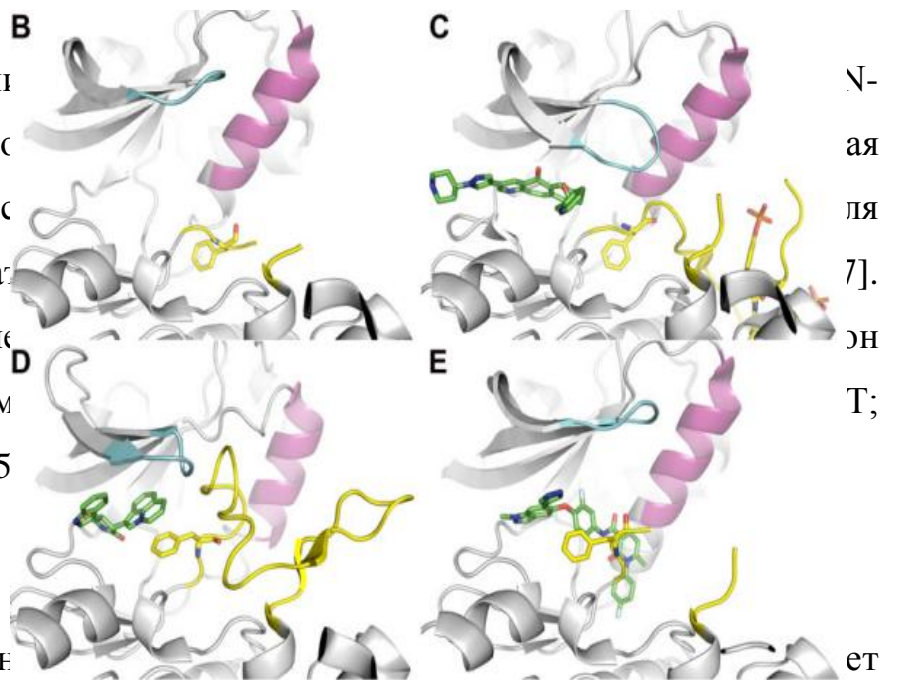


также как и alectinib селективный ингибитор ALK.

Рисунок 6: Химическая структура и взаимодействие с ферментом в концевой доле ароматической фосфо-ключевые каталитическое распознавания субстрата. MET-ингибитор позднего поколения является селективным ингибитором типа II (E) [56].

1.1.8 IGF1R и IR

Путь передачи информации включает такие аспекты как пролиферацию, дифференциацию и рост нормальных



N-ая для [7]. он T;

ет

клеток. Однако его рецептор, IGF1R, а также лиганды и переходные белки высоко выражены во многих злокачественных новообразованиях.

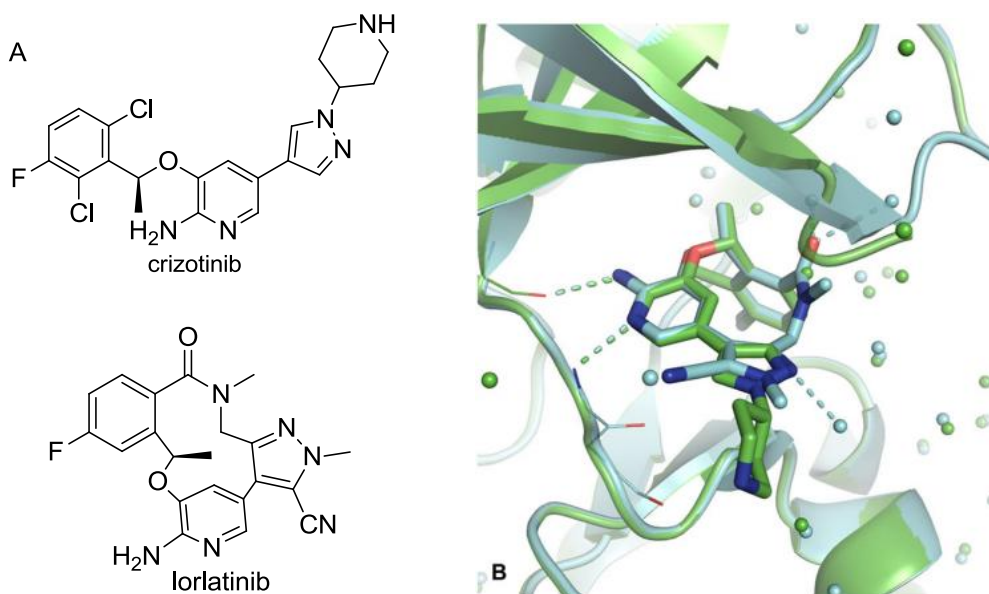


Рисунок 7: Ингибиторы ALK. (А) Химические структуры crizotinib и lorlatinib, макроциклического производного с высокой липофильной эффективностью и биодоступностью ЦНС. (В) Crizotinib (зеленый) и lorlatinib демонстрируют очень сходное ALK-связывание (кристаллографические молекулы воды, обозначенные как сферы, Н-связи как ломаные линии) [59,60]

Путь IGF1 также связан с канцерогенезом и риском образования рака. IGF1R активирует RASRAF-МАРК и PI3K-АКТ-mTOR, из которых оба связаны с пролиферацией и выживаемостью раковых клеток. По этим причинам ингибиторы IGF1R были разработаны для NSCLC [61]. Первое поколение ингибиторов IGF1R гуманизированные моноклональные антитела, которые блокируют связывание лиганда с IGF1R. Хотя ранние результаты были перспективными, более поздние исследования с использованием комбинаций с химиотерапией или ингибиторами EGFR в NSCLC были не удовлетворяющими [62,63].

1.1.9 Киназа рецептора тропомиозина

TRK был идентифицирован как продукт онкогена, возникающий в

результате мутаций гена NTRK и его перегруппировки. Его три изоформы дикого типа выражены преимущественно в нейронах, однако, их активация с помощью нейротрофинов играет важную роль в развитии, обслуживании и функционировании клеток. TRK также регулируют процессы в ненейрональных клетках. Активация через TPK путей выживания клеток способствует опухолегенезу и устойчивости к цитотоксической химиотерапии во многих раковых опухолях [64]. TPK относятся к одному и тому же подсемейству IR-тир-киназы как ALK и ROS. Entrectinib pan -TRK-ингибитор с дополнительным мощным ALK и ингибирующей активностью ROS, сейчас он проходит испытания II фазы при колоректальной карциноме и NSCLC [65]. LOXO, селективный pan-TRK ингибитор [62]. Entrectinib и LOXO структурно связаны, первый содержит индазол, последний - пиразоло[1,5-а]пиримидиновое ядро, оба содержат мета-дифторфенильный заместитель.

К семейству TYRO3, AXL и MERTK (TAM) рецепторам тир-киназ относится AXL ингибиторам, и хотя он не является сильным онкогенным драйвером, он чрезмерно выражен во многих опухолях, а избыточная экспрессия коррелирует плохими результатами. Отклоняющаяся сигнализация TAM при раке предполагает, что AXL могут давать противоопухолевый иммунитет, выживаемость клеток, а также повышение хемочувствительности и подавления метастазов [66]. Довольно сложно решить, какие соединения для разработки следует обозначать как ингибиторы AXL, поскольку такие агенты как cabozantinib, bosutinib, crizotinib и sunitinib, являются мощными ингибиторами AXL [67], а наиболее мощный ингибитор AXL (sub-nM IC50) gilteritinib, он также сильно ингибирует FLT3 и ALK [68].

При проведении трансфекции (RET) ретранслируется рецепторная тир-киназа, активность которой поддерживается клеточной выживаемостью, миграцией клеток, дифференцировкой, хемотаксисом и пролиферацией. Активация мутации в ряде различных транскрипций генов, ведет к

онкогенным слияниям, связанным с RET. Это происходит при различных раковых заболеваниях, особенно в МТС и NSCLC [69]. RET тесно связан с другими рецепторными тир-киназами обладающими RET-ингибирующей активностью, особенно с VEGFR и MTKI. Эффективность MTKI, особенно также блокирующих VEGFR-активность, ограничена токсичностью [70], они предпочтительны для лечения раковых заболеваний, вызванных активацией RET. Как показали исследования направленные на открытие таких агентов [71, 72], в настоящее время под клинической оценкой не существует каких-либо RET-специфических ингибиторов киназы.

1.1.10 Трансформирование рецептора фактора роста- β

Ряд клеточных ответов, вызванных активацией TGF- β -цитокинами, через рецептор гетеро-димеризации, трех изоформ TGFR, включает пролиферацию, выживаемость, подвижность и дифференцировку. Однако в нормальных клетках он функционирует как супрессор опухоли, но сигнализация TGF- β сильно развита клетками во время развития опухоли и эпителиально-мезенхимного перехода [73]. TGFR содержат Ser / Thr киназу, трансдукция сигнала происходит через фосфорилирование клеточных белков, таких как SMAD, они активируют путь TGF- β [74]. Препараты, в основном, нацеленные на эти пути развития, они развиваются в неопластических показаниях, особенно в фиброзе [75]. В настоящее время в онкологии разрабатываются два ингибитора киназы TGFR1, galunisertib и TEW 7197.

1.1.11 Janus киназы

Это семейство включает три цитоплазматические тир-киназы JAK1-3, а также нерцепторную тир-киназу TYK2. Эти киназы передают сигналы из ряда факторов роста и цитокинов, важных для гемопоэза и иммунных функций. JAK3 имеет большое значение для передачи сигналов через рецепторы γ -цепи интерлейкина, она интересна в большей степени в качестве мишени при воспалении, JAK2 особенно интересен для онкологии. Интерес к ним проистекает из того, что многие миелопролиферативные

новообразования отображают мутацию (V617F) в JAK2 гене [76].

Ruxolitinib, JAK1 и JAK 2-селективное соединение [77], является первым ингибитором этого семейства в онкологии. Недавний обзор этого агента привел к выводу, что ruxolitinib, в настоящее время единственная одобренная терапия для миелофиброза, связана с преимуществом на выживании [78]. Тем не менее, надежда на лечебные эффекты с JAK2 ингибированием, которое наблюдается у imatinib в ХМЛ, не оправдалась.

Ряд других соединений, таких как rascritinib, momelotinib сейчас проходят клинические испытания миелопролиферативных новообразований [79]. Пока не ясно, как эти агенты будут дифференцированы от ruxolitinib [78].

1.1.12 Bruton Tyrosine Киназы

ВТК представляет собой не рецепторную киназу в сигнальном каскаде В-клеточного антигена (BCR), он опосредует миграцию и выживание В-клеток, а так же их активации и пролиферацию. В В-клеточных неходжкинских лимфомах (NHL), активация BCR через ВТК поддерживает клеточную выживаемость и пролиферацию, отдавая ВТК соответствующую фармакологическую мишень в НХЛ. Это особенно привлекательно с точки зрения специфичности, поскольку фенотип ВТК теряет функции, как это происходит в человеческом теле X-связанная агаммаглобулинемия, ограничена В-клетками [80].

Первые селективные ингибиторы типа ВТК были е так давно зарегистрированы, ibrutinib, получил одобрение при лечении лимфомы мантийных клеток. Поскольку эти соединения обладают высокоэлектрофильными функциями, вероятно, что они являются ингибиторами типа VI, они реагируют ковалентно с тиолом C481, а неспаренный остаток Cys в АТФ-связывающем сайте ВТК (соответствующий к C773 в HER киназах), по-видимому, не был реализован во время их открытия. Ibrutinib также был репозиционирован в злокачественных В-клеточных опухолях [81].

Кроме ibrutinib (пиразоло[3,4-d]пиримидина) имеется еще пять ВТК ингибиторов (таблица S13). Из них два структурно связаны с ibrutinib. Acalabrutinib является производным имидазо[1,5-a]пиразина с реакционноспособной, бут-2-енойной функцией, а GS 4059 представляет собой производное с аналогичным ibrutinib - акрилоильным электрофилом.

1.1.13 Фокальная адгезия киназы

FAK1 представляет собой цитоплазматическую нерецепторную тиркиназу, которая передает подвижность клеток, выживание и пролиферацию от присоединенного к интегринам внеклеточного матричного прикрепления и рецептора фактора роста. Так как плохие клинические показания и метастатическая склонность многих видов рака коррелированы с усиленной экспрессией и активностью FAK1, он является многообещающей мишенью для лечения рака [82].

В прошлом были проведены клинические исследования ряда ингибиторов FAK1 [83], но в настоящее время только три остаются активными. GSK 2256098 и VS 4718 являются селективными ингибиторами FAK1, тогда как defactinib является двойным ингибитором FAK1 и FAK2. Считается, что такая двойная избирательность выгодна из-за функционального перекрытия двух родственных киназ [84]. Все соединения являются АТФ-конкурентными (предположительно типа-I), также сообщалось об аллостерических ингибиторах FAK1 [85], хотя для них еще нет клинической оценки.

1.1.14 Spleen Tyrosine киназы

SYK представляет собой цитоплазматическую нерецепторную тиркиназу, экспрессируемую преимущественно в гемопоэтических клетках. Фосфорилирование на основе тирозина цитоплазматического иммунорецептора приводит к набору SYK, который распространяет сигнализацию путем активации последующих путей, включая PI3K, MAPK и ВТК [86]. Он особенно интересен для подавления последствий хронических

и острых воспалений [86]. SYK вместе с BTK участвуют в дисрегуляции сигналов BCR при гематологических опухолях, таких как DLBCL и CLL [87].

Ингибиторы SYK оценивали клинически для лечения иммунных расстройств, но было обнаружено, что они проявляют дозозависимую токсичность, вероятно, из-за отсутствия должной [88]. Изначально был испытан fostamatinib (метилен фосфатного перорального пролекарства, плохо растворимого соединения, дианилинопиримидина), на фазе III при ревматоидном артрите, а также были испытаны в лимфоме В- и Т-клеток, но он не прогрессировал [89]. Вторичные SYK ингибиторы с улучшенным профилем избирательности были разработаны и вошли в клинику, наиболее продвинутым из них является энтосплетиниб, сильно SYK-селективный оральный ингибитор, дизамещенный имидазо[1,2-а]пиразин.

1.1.15 PI3K-киназные пути

Путь PI3K регулирует синтез белка, пролиферацию клеток и их рост. Его активация связана с антиапоптотической сигнализацией и с злокачественными трансформациями [90]. Усиление или мутация многих рецепторных тир-киназ, может привести к прорывной сигнализации через путь PI3K-AKT-mTOR-eIF4E в раковых клетках. Четыре киназы в этом пути, AKT, его активирующей киназы PDK1, mTOR, и сам PI3K (изоформы I-PI3K класса-I), являются желанной мишенью для создания онкологических препаратов.

Ингибиторы mTOR первого поколения являются производными макролида рапамицина (сиролимус), натуральный продукт из гриба, принадлежащего к острову Пасхи (Рапа Нуи). Исследования, основанные на том, что сиролимус ингибирует пролиферацию Т-клеток, привели к открытию mTOR (механистической или млекопитающей мишени рапамицина) генов и развитие сиролимуса в качестве таргетного препарата. Хотя противораковые свойства рапамицина были известны в течение долгого времени, сиролимус был впервые разработан как иммунодепрессант. Однако его аналог рапалог, темсиролимус, был одобрен для использования **28**

продвинутых RCC. Объективные ответы пациентов с раком почек были обнаружены уже на первой фазе исследования [91] и демонстрации того, что потеря опухоли VHL сенсibiliзирует раковые клетки почек к ингибиторам mTOR, впоследствии включенным биомаркерное развитие темсиролимуса в RCC [92]. Другой рапалог, everolimus, был утвержден позднее.

mTOR участвует в двух многопротеиновых комплексах, mTORC2 / RICTOR и mTORC1 / RAPTOR. Рапалы, блокирующие активность mTOR в комплексе с рецептором FK506-связывающим белком (FKBP12) ингибируют mTORC1 [93]. Также рапалог everolimus может действовать как ингибитор MET, поскольку он как и mTOR, для полной активности требует связывания FKBP12 [94]. Из-за наличия mTORC1-зависимые контуры обратной связи через субстрат фосфорилирования mTOR рибосомаль белок S6 киназы β -1, приводит к повышению активности RAS и PI3K, его ингибирование приведет к активации путей АКТ- и MAPK- [95]. Причина тому, селективные mTOR ингибиторы АТФ-антагониста, они блокируют два комплекса mTOR, сейчас они проходят клинические испытания. Соединения, принадлежащие этому классу включают CC 223 vistusertib и sapanisertib.

mTOR и PI3K схожи, большинство антагонистов АТФ ингибиторы mTOR также ингибировали PI3K, или они имели двойственную специфичность. Несколько соединений этого типа разрабатываются, например, с двойным пан-класс-I ингибиторы киназы PI3K и mTOR PQR 309, voxtalisib, VS 5584, LY 3023414 и gedatolisib.

Не модулирующие mTOR ингибиторы, но ингибирующие различные комбинации класса I изоформы PI3K также разрабатываются в настоящее время. Это, по-видимому, действительный подход, поскольку все четыре функционально нередуцированные изоформы могут генерировать сигнальную молекулу PIP3, которая рекрутирует АКТ на клеточную мембрану [96]. Все изоформы генетически изменяются в различных видах рака [97]. Сейчас неясно, какая селективность PI3K / mTOR ингибирования (рис.11) будет клинически оптимальной. Более предпочтительная цель II

PI3K зависит от клеточного контекста [98]. Широкая избирательность ограничивает терапевтический запас mTOR / PI3K ингибитора, собственно поэтому он и является основным драйвером для поиска селективных ингибиторов PI3K и из-за важной роли этих путей в нормальных клетках. Сейчас несколько ингибиторов PI3K пан-класса I, подвергаются испытаниям: buparlisip, copanlisip, pictilisib, ZSTK 474 и SF 1126, последний из которых является сосудистым таргетным лекарством.

То, что PI3K δ экспрессируется только в гематопоэтических клетках, обосновывает их использование в различных видах рака [99], эта концепция привела к первому утверждению селективного ингибитора PI3K δ , в качестве монотерапии небольшой лимфоцитарной и фолликулярной лимфомы idelalisib. Другое соединение, duvelisib, имеет аналогичную селективность, он находится на поздней стадии развития. HMPL 689, AMG 319, CDZ 173 и INCB 050465 соединения с более или менее выраженной селективностью PI3K δ . PI3K δ (и PI3K γ) важно для иммунной толерантности к раку и ингибиторам PI3K δ опосредованной T-клетками, поэтому они могут найти терапевтическое применение во многих видах рака [100].

Кроме PI3K δ -селективных ингибиторов, большое количество экспериментальных препаратов исследуются с диапазоном профилей селективности изоформы PI3K. Интерес к PI3K α -селективным агентам главным образом обусловлены тем, что кодирующий эту изоформу ген часто мутируется при определенных видах рака (например, HER2- и KRAS-driven опухоли) [101]. Наиболее передовыми селективными PI3K α соединениями являются: alpelisib, talelisib, AZD и MLN 1117. Поскольку он регулирует гемостаз глюкозы, это контролируют с помощью ингибиторов PI3K α в клинических условиях. Зависимость на PI3K β наблюдается в некоторых опухолях с дефицитом PTEN, а первый PI3K β - селективный агент, GSK 2636771 сейчас тестируется. AZ188186 и KA 2237 другие клинические PI3K β -селективные соединения.

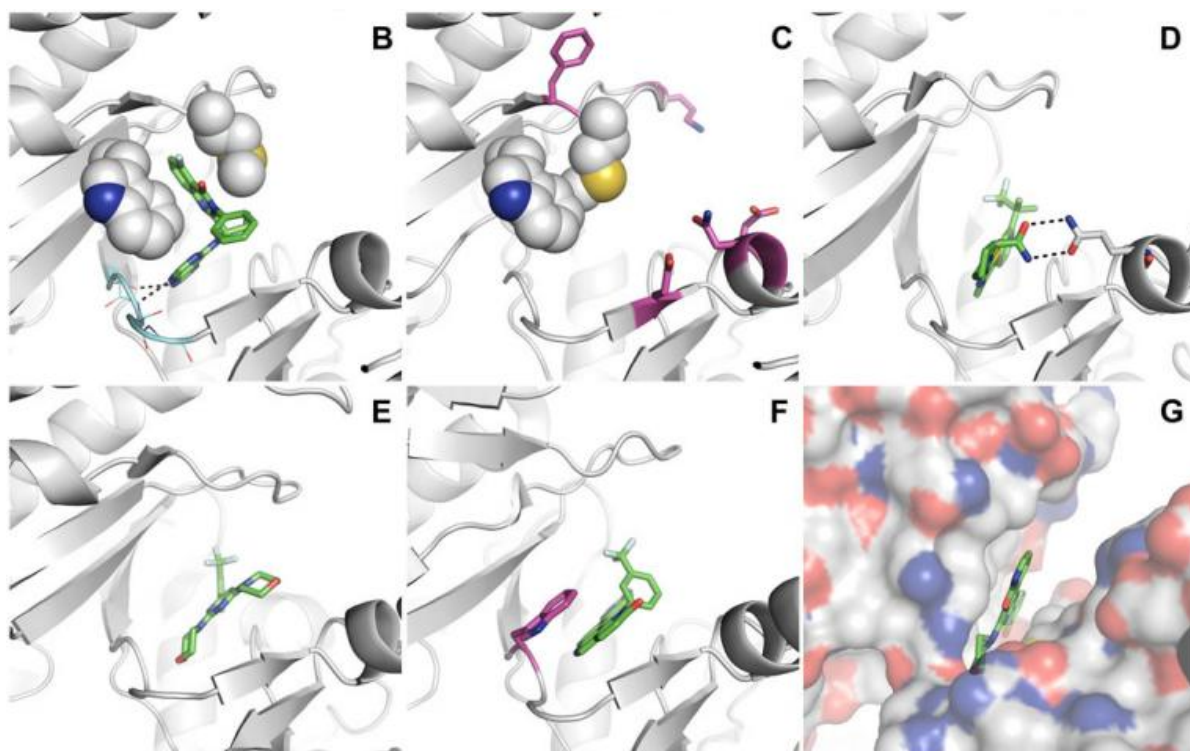
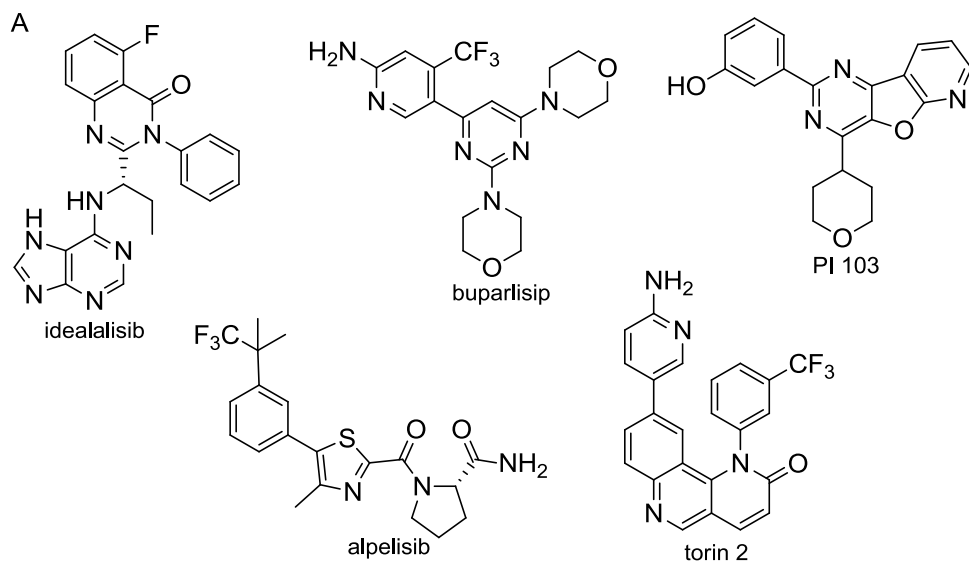


Рисунок 8: Селективность ингибиторов PI3K и mTOR. (A) Структуры ингибиторов. (B) idelalisib (зеленый) связывается с PI3Kδ через H-связывание (пунктирные линии) с амидными связями шарнирной области (голубой). Его селективность происходит преимущественно из индуцированной субструктуры хиразолинона между боковыми цепями M752 и W760 (сферы). (C) Апо-структура PI3Kδ239 показывает, что остатки, которые отличаются между четырьмя изоформами PI3K (пурпурный), довольно далеки от лиганда в комплексе PI3Kδ-idelalisib (и других лигандов)

в других комплексах) и что слот между остатками M752 и W760 закрыты. Хотя остатки, соответствующие M752 и W760, сохраняются во всех четырех изоформах PI3K, связывание с индуцированной привязкой, наблюдаемое с помощью идалилазиба, по-видимому, является селективной особенностью PI3K δ -селективных соединений. (D) PI3K α -селективный alpelisib тесно взаимодействует (ломанные линии) с боковой цепью Q859, один из немногих остатков вокруг АТФ-связывающего кармана, которые не сохраняются во всех PI3Ks. (E) Пан-PI3K-селективный buparlisip [241] связывается с PI3K γ в аналогичном режиме, так как альпелизиб связывается с PI3K δ , но любые функции, придающие селективность, отсутствуют. (F) торин 2242 связывается с mTOR без каких-либо обычных шарнирных областей H-связей. Его избирательность в значительной степени объясняется взаимодействием нафтиридиновой субструктуры с индолом W2239 в шарнире, который не сохраняется в PI3Ks [243]. (G) Двойной ингибитор mTOR- и pan-PI3K PI 103244 взаимодействует с mTOR через полярные взаимодействия, связанные с морфолином и фенольной ОН-группой. Подобные взаимодействия возможны и с другими изоформами PI3K. Кроме того, PI 103 принимает почти полностью плоскую конформацию, которая может быть размещена в mTOR и сайтах связывания PI3K АТФ, независимо от ширины связующих карманов. Построено из PDB записи 4XE0, 2WXR, 4JPS, 3SD5, 4JSX и 4JT6 [110,111]

Первоначально считалось что ингибиторы PI3K могут иметь противоопухолевую эффективность при монотерапии, но с накопленным до сих пор клиническим опытом с более чем 20 различными ингибиторами PI3K / mTOR, все чаще становится ясно, что это не так. Как и большинство ингибиторов киназы, PI3K ингибиторы в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами работают лучше [102].

АКТ (PKB) Ser / Thr-киназа, которая действует ниже по потоку от PI3K и активируется путем набора в клеточную мембрану взаимодействий с PIP3 через его плекстрин (PH). После активации АКТ опосредуют последующие

ответы путем фосфорилирования из нескольких белков. Липидная фосфатаза, инактивирующаяся в опухолях человека PTEN, отрицательно регулирует АКТ путем дефосфорилирования PIP3, тогда как во многих опухолях АКТ усиливается или сверхэкспрессируется [103].

Еще недавно, наиболее продвинутым клинически ингибитором АКТ был алкилфосфолипид перифозин. Не являющийся прямым ингибитором киназы, он препятствует локализации АКТ мембраны [104]. Клинические испытания перифозина фазы II, в качестве единичного агента в разных типах опухолей не дают объективных ответов. Хотя многообещающая активность у пациентов с RCC, с неудачной предшествующей терапией ингибитором тиркиназы [105], perifosine, дальше не развивались. Несколько ингибиторов АКТ I типа, включающих: LY 2780301, ipatasertib (рис.12А, С), AZD 5363 и afuresertib, теперь находятся в фазе II клинических исследований и несколько большее количество соединений находится на ранних стадиях исследований, включая аллостерический (тип III) АКТ ингибитор МК 2206. Оно связывается с сайтом АКТ, образованным только в наличие домена PH, а связывание ингибитора способствует образованию неактивной киназы [106]. МК 2206 аналогичен соединению VIII [107]. Экспериментальные ARQ 092 и BAY 1125976 также являются аллостерическими АКТ ингибиторами. Структура последнего соединения еще не раскрыта, но соединение, которое охватывает ARQ 092, структурно связано с соединением VIII и МК 2206 [108].

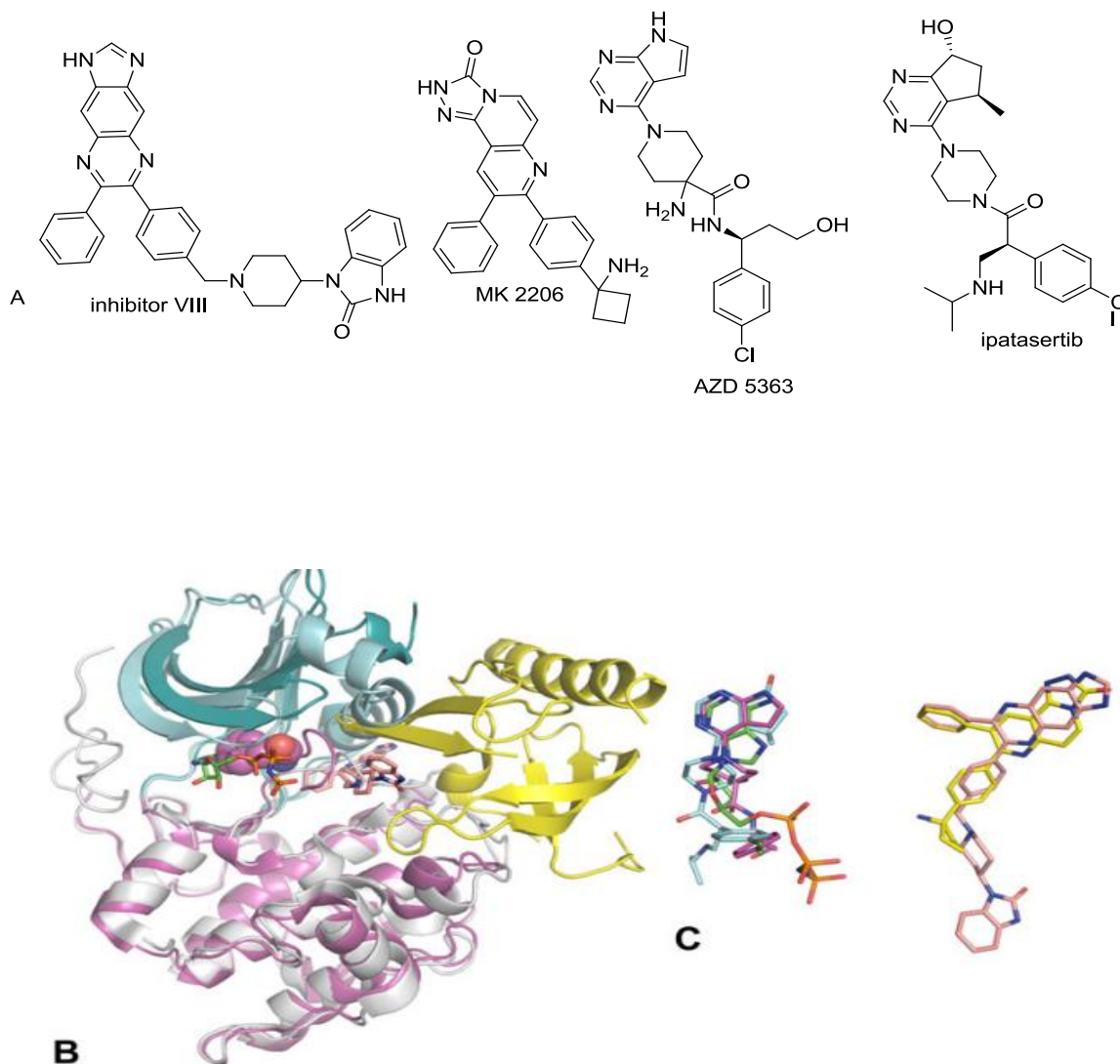


Рисунок 9: Ингибиторы АКТ типа I и типа III. (A) AZD 5363 и ipatasertib являются ингибиторами типа I, тогда как ингибитор VIII157 и МК 2206 являются ингибиторами типа III. (B) Соединение VIII связывается с АКТ (N-лопасть темно-голубой, С-лопасть пурпурный, домен РН желтый) в неактивной конформации по сравнению с активным состоянием, представленным сложным комплексом между АМР-РNP (зеленый) и АКТ1 (светло-голубой, светло-серый). Соединение VIII связывается на участке, прилегающем к сайту связывания АТФ, состоящему из частей N- и С-долей, а также РН домена. Связывание индуцирует или стабилизирует конформацию неактивных киназ с неупорядоченной αС-спиралью, измененными N- и С-лопастями и конформацией А-контура, которая проектирует боковую цепь F293 мотив DFG в сайте связывания АТФ

(Боковая цепь Phe как сферы). (С) AZD 5363 (пурпурный) и ipatasertib (голубой) связывают с активными АКТ-конформациями в комплексе с АКТ занимают то же пространство, что и АТР (АМР-РНР; зеленый). МК 2206, связывается очень похожим на АКТ образом как соединение VIII. Построено из записей PDB 3O96, 4EKK, 4EKL и 4GV1 [109].

PDK1 играет важную роль в пути PI3K-АКТ. Он активирует АКТ, а также некоторое количество других родственных киназ AGC, таким образом контролируя несколько сигнальных путей, важных для пролиферации, апоптоза и ангиогенеза. PDK1, как в PI3K, из за активации рецептора конститутивного фактора роста и мутаций PTEN, повышается более чем в половине всех опухолей. Ожидаемые трансгенные мыши, выражающие низкие уровни PDK1, защищены от опухолевого генеза, который обычно является результатом потери PTEN [112]. Первый ингибитор PDK1, AR 12, введен в клинические испытания. Оно было сконструировано из selesoхиb после изучения его противоопухолевых свойств и ингибирования PDK. [112].

1.1.16 Protein Kinase C

Сверхэкспрессия PКС связана с несколькими видами рака, при этом изоформа PКСβ вовлечена в индуцированное VEGF развитие опухоли и ангиогенеза, а также при апоптозе, регулирующем путь PI3K-АКТ. Макроциклический бис-индолилмалеимид-энзастаурин избирательно ингибирует PКСβ в низких концентрациях, а также ингибирует другие изоферменты PКС при более высоких концентрациях [113]. Противоопухолевая активность энзастаурина в первую очередь объясняется торможением АКТ и его нисходящими целями, но его точный механизм действия не до конца изучен [114]. Оба PКС и АКТ активируются PDK, а несколько изоферментов PКС могут непосредственно фосфорилировать АКТ на S473, что существенно для АКТ. Недавно было сообщено о том, что клиническое исследование фазы-III энзастаурина в монотерапии в DLBCL не продемонстрировало статистически значимого увеличения по сравнению с плацебо, в отсутствие болезней выживаемость у пациентов с высоким риском

рецидива после химиотерапии на основе ритуксимаба [115], и по-видимому, развитие этого соединения было прекращено.

Энзастаурин - это не первое производное стеуроспорина, которое подвергается клиническому развитию, поскольку, например, UCN-01 (7-гидроксистауроспорин) и мидостаурина, которые также ингибируют РКС, но были разработаны как МТКИ (основными целями являются СНК1 и PDK1 для UCN-01, FLT3 и другие подсемейные киназы рецептора CSF-1 / PDGF для мидостаурина) [116]. Другие ставроспорин производные развиваются в неонкологических показаниях [117]. Единственный ингибитор РКС, который остается под клиническим исследованием, как представляется, LXS 196, пероральное соединение, структура и свойства которого еще не раскрыты.

1.1.17 Choline Kinase- α

СК представляет собой липид-киназу, которая фосфорилирует свободный холин, чтобы получить фосфохолин, что дает возможность образования фосфатидилхолина, основного фосфолипида в мембранах клеток млекопитающих, через путь Кеннеди. Многие опухоли проявляют измененный липидный обмен во время развития и химиотерапии СК повышается во многих опухолях и ассоциируется с различными злокачественными фенотипами [118]. Кроме того, СК недавно был зарегистрирован как андроген рецептор-шаперон и потенциально ценная лекарственная мишень при раке предстательной железы [119,120]. TCD 717 является первым ингибитором СК, который недавно вступил в клинические испытания в солидных опухолях. Он ингибирует СК в силу конкуренции с субстратом холина; его структура не была раскрыта, но относится к гемихолинию-3 ((2S, 2S) -2,2дифенил-4,4-diylbis (2-гидрокси-4,4-диметилморфолин-4-ил), ингибитор повторного поглощения холина [121].

Казеинкиназа II представляет собой конститутивно активную гетеротетромерную Ser / Thr киназу, которая поддерживает многие сотовые сигнальные пути. Хотя функция СК II, по-видимому, не изменяется при раке клеток путем мутации, тем не менее, сверхэкспрессируется во многих

различных формах рака [122]. Опухолевые клетки часто демонстрируют неонкогенную зависимость от СК II [123], и было показано, что абляция СК II через антисмысловые олигонуклеотиды имеет глубокие антипролиферативные и проапоптотические эффекты в модели ксенотрансплантата грызунов [124]. Сообщалось о числе маломолекулярных ингибиторов СК II с противоопухолевой активностью, и первое такое соединение, silmitasertib, СК II-селективное АТФ-конкурентное соединение бензо[с][2,6]нафтиридин-8-карбоновой кислоты (таблица S29) [125].

MELK представляет собой киназу семейства АМРК с несколькими клеточными функциями, связанными с выживанием и чрезмерной экспрессией во многих опухолях. Эти функции особенно важны в раковых стволовых клетках, то есть недифференцированных раковых клетках. Первый клинический MELK ингибитор OTS 167, дизамещенное (нафтиридин-3-ил)этаноловое соединени [126].

1.1.18 PIM

Провирусная инсерция в SER / Thr-киназном семействе мышинных (PIM) лимфомы (PIM1-3) выраженной преимущественно в гемопоэтических клетках и сигналах ниже по потоку от ABL, JAK2 и FLT3. PIM киназы способствуют регуляции клеточного цикла, апоптоза, пролиферации и миграции клеток. Все три изоформы имеют онкогенный потенциал и аберрантно выражены в различных опухолях [127]. Хотя выпадение любой из трех киназ PIM приводит к мягким фенотипам, недостаточной сигнализации PIM1 связанной с сердечной функцией. Эти наблюдения повлияли на изъятие первого в своем классе клинического ингибитора PIM SGI 1776 из-за кардиотоксичности [128]. Несмотря на это наблюдение, оказалось, что оба ингибитора PIM в настоящее время проходят клинические испытания, то есть INCB 053914 и PIM 447 являются пан-селективными ингибиторами PIM. PIM киназы несколько необычны, поскольку они признают АТФ, а также большинство ингибиторов, таким образом, это не связано с типичными H-кодирующими взаимодействиями между киназным

шарниром области лиганда из-за присутствия двух остатков Pro в шарнире PIM, что придает нетипичную конформацию этой области [129].

1.1.19 Пути киназной активации митогена

Путь RAS-RAF-MEK-ERK MAPK является одним из основных сигнальных путей, которые раковые клетки используют для пролиферации и выживаемости. Активация MAPK путем активации мутаций в NRAS или BRAF особенно распространена в меланоме [130]. Ниже мы обсудим клинические RAF и ингибиторы MEK, к которым недавно присоединились первые ингибиторы ERK.

В настоящее время существует два ингибитора киназы RAF, одобренных для лечения неоперабельной или метастатической меланомы с мутацией BRAF V600E, vemurafenib и dabrafenib. Оба соединения демонстрируют селективность для BRAF V600E по сравнению с другими киназами и в меньшей степени над изоформами RAF киназы дикого типа [131, 132]. С этими соединениями ингибирование MAPK специфично для опухолевых клеток с мутантным BRAF, и это, вероятно, связано с их селективностью. У большинства пациентов с меланомой, получавших значительную опухоль vemurafenib или dabrafenib наблюдались регрессия и выживаемость без прогрессирования, что положительно сказывается с ранее доступными методами лечения метастатической меланомы [130].

Ни один из агентов не показан для лечения пациентов с меланомой BRAF дикого типа из-за потенциального риска развития опухоли, и оба были одобрены одновременно с обнаружением мутаций BRAF V600E. Это противопоказание связано с парадоксальной активацией пути MAPK ингибиторами RAF в клетках с BRAF дикого типа. MAPK активация пути происходит в результате RAS-зависимого фосфорилирования MEK гомо- и гетеродимеризованных RAF-изоформ. В мутантных клетках меланомы BRAF, в которых активация MEK управляется BRAF, ингибирование RAF эффективно из-за увеличения сродства BRAF V600E к АТФ и отсутствия активации CRAF. Парадоксальная активация пути MAPK в клетках **30**

нормальной BRAF, где сигнализация RAS происходит преимущественно через CRAF, считается, что возникает из-за связывания ингибиторов RAF типа I с изоформами RAF дикого типа, что приводит к потере автоингибирования таким образом, который не зависит от ингибирования киназы, улучшает RAF димеризация, локализация мембраны и, в конечном счете, активация MEK, зависящая от RAS [133, 134]. Тот же феномен, то есть парадоксальная активация пути MAPK в здоровых кератиноцитах, вероятно, ответственна за значительную кожную токсичность, наблюдаемую с ингибиторами RAF [1355].

Несмотря на одобрение vemurafenib и dabrafenib, целый ряд дополнительных RAF ингибиторов киназы в настоящее время разрабатываются в продвинутой меланоме и других твердых опухолях [136]. Первым ингибитором RAF, изученным в меланоме, был sorafenib, тип МТКИ типа II с активностью ran-RAF. Это соединение, которое также обладает активностью против нескольких подсемейств киназных рецепторов CSF1 / PDGF разрабатывалось - и теперь утверждено в расширенном RCC в момент, когда мутация BRAF V600E, которая присутствует в более половины всех злокачественных меланомах, была впервые обнаружена [137]. Несмотря на несколько клинических испытаний sorafenib в меланоме, было невозможно продемонстрировать значительную пользу для пациентов. Предположительно, это объясняется тем, что при максимально допустимой дозе, определяемой токсичностью, исходящей из ингибирования киназ, отличных от RAF, было недостаточное ингибирование MAPK-пути [130].

Первым утверждением ингибитора MEK был trametinib при лечении пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой с мутацией BRAF V600E или BRAF V600K как обнаруженный одобренным FDA тестом. Это предполагает другой метод лечения при этом заболевании, хотя пока не ясно, какие лучше варианты лечения с ингибиторами RAF и MEK. Тем не менее, приобретенная устойчивость к ингибиторам RAF происходит часто и через множественные генетические механизмы, которые предполагают, что

одновременное ингибирование MEK и мутантной RAF киназы могут быть лучшей стратегией с точки зрения общей эффективности, предотвращения приобретенной MEK устойчивости и модуляция токсичности, исходящей от парадоксальной активации MAPK-пути с монотерапией ингибитором RAF [138]. Исходя из этого, недавно был одобрен cobimetinib для лечения мутанта BRAF в сочетании с vemurafenib.

Селективность trametinib и cobimetinib, а также других ингибиторов MEK [139], включая rafametinib, selumetinib, pimasertib, PD-0325901, binimetinib, RG 7304 и TAK 733, вероятно нацелена на неконсервативный аллостерический сайт в MEK1 и MEK2 (рис.13).

Хотя лечение передовой меланомы с ингибиторами RAF и MEK показывало что вначале наблюдается эффективность, в конечном счете, вырабатывалась устойчивость к обоим типам ингибиторов. Основные механизмы приобретенного сопротивления, являются реактивация пути MAPK, а также компенсационная сигнализация через параллельный путь PI3K [130]. Последнее наблюдение привело к началу клинических испытаний в меланоме и других твердых опухолях, где ингибиторы RAF / MEK и PI3K используются в комбинации [140].

Прямой таргетинг ERK1 / 2 для блокировки сигнализации через RAS-RAF-MEK- ERK-путь отстает от стратегий ингибирования восходящего потока, но может быть полезен [141]. Таким образом, было продемонстрировано, что двойное фармакологическое ингибирование MEK и ERK может быть синергичным, препятствуя возникновению сопротивления и преодолению приобретенной резистентности к ингибиторам MEK [142]. В настоящее время существует три ингибитора ERK1 / 2 под клинической оценкой, самым передовым из которых является ulixertinib. Оба ulixertinib и GDC 0994 содержат N-((1S)-2-гидрокси-1-фенилэтил)формамидную субструктуру, химическая структура CC 90003 не раскрыта.

1.1.20p38 MAPK

Несколько разных сигнальных путей MAPK используются клетками для ответа на внеклеточные стимулы. Помимо ранее описанного RAS-RAF-МЕК-ERK, еще одним важным способом MAPK является путь p38 MAPK, который опосредует стресс-ответы и ответы на цитокины, хемокины, гормоны и фактор роста. Четыре изоформы p38 Ser / Thr киназы p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 δ (MAPK13) и p38 γ (MAPK12) могут быть активированы в ряде способов, включающих как посттрансляционную модификацию, так и протеиновые взаимодействия, тем самым интегрируя множество разных сигналов. В свою очередь, p38-киназы имеют множество нисходящих целей и могут активировать различные транскрипционные программы в пространственном и временном управлении [143].

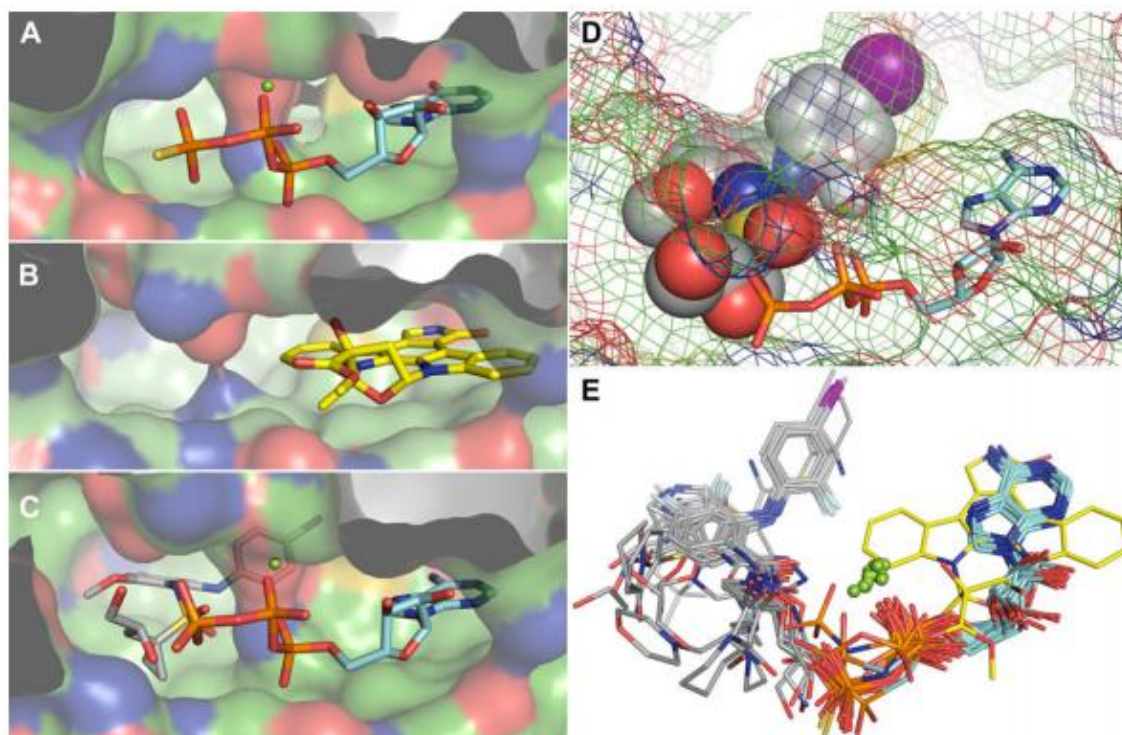


Рисунок 10: Структурная основа ингибирования МЕК. МЕК1 и МЕК2 являются относительно уникальными, поскольку эти киназы содержат аллостерически-связывающий сайт, смежный с, но не перекрывающий, с карманом связывания АТФ. Этот экзозит (А), а также в комплексах с ингибиторами типа I (например, K252a, В) [144]. Было обнаружено

количество неконкурентных ингибиторов MEK АТР, которые занимают этот экзозит, тем самым искажая каталитический сайт и инактивацию фермента (например, рафаметиниб (серый), наложенный с АТФ (голубой), С) [145]. 2-фтор-4-йод-анилиновая система rafametinib обладает высокой комплементарностью формы с липофильным задним карманом экзозит (D) и фактически присутствует в большинстве известных ингибиторов MEK типа III, включая семь из восьми текущих клинических MEK (E). Белковые структуры показаны как зеленые поверхности или сетки; АТФ и родственные нуклеозиды показаны как голубые палочки (Mg^{2+} в виде зеленых сфер), аллостерические ингибиторы как серые палочки, а K252a - желтые палочки. Построено из записей PDB 1S9J, 2P55, 3DV3, 3DY7, 3E8N, 3EQB, 3EQC, 3EQD, 3EQF, 3EQG, 3EQH, 3EQI, 3MBL, 3ORN, 3OS3, 3PP1, 3SLS, 3V01, 3V04, 4AN2, 4AN3, 4AN9, 4ANB и 1S9I.

p38 MAPK преследуют в основном как лекарственную мишень при хронических воспалительных заболеваниях, особенно p38 α , который переактивируется в воспаленных тканях. Множество различных ингибиторов P38 MAPK развиваются при таких нарушениях, как ревматоидный артрит, атеросклероз и астма [146, 147]. Однако p38 MAPK также играет важную роль в ответах раковых клеток на онкогенные стрессы, радиацию, химиотерапию и измененную экспрессию p38 MAPK наблюдаемую в опухолях, где они способствуют ее развитию [148]. В настоящее время два структурно связанных p38 ингибитора MAPK находятся под клиническим исследованием в показаниях к онкологии: galimetinib и rexmetinib.

1.1.21 MNK

Ser / Thr киназы MNK1 и MNK2 активируются посредством активации митогена и стресса MAP, они фосфорилируют эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E). Генетические исследования показывают, что в то время как активность MNK требуется для опосредованного eIF4E онкогенной трансформации клеток, такая активность непригодна для нормального развития [149]. До недавнего времени было известно очень

мало ингибиторов MNK, но селективный тип I / II и тип VI MNK ингибиторов уже зарегистрированы [150]. Первый ингибитор MNK достигнет клинических испытаний фазы I это BAY 1143269.

1.1.22 Циклин-зависимые киназы

CDK содержат большую группу Ser / Thr-киназ, участвующих преимущественно в контроле клеточного цикла и регуляции транскрипции. Подбор и продвижение через клеточный цикл жестко регулируется, а межфазные CDK контролируют первую фазу (G1; CDK4, CDK6, CDK1, CDK2) путем активации E2F-чувствительных генов, необходимых для входа в фазу синтеза ДНК (S-фаза), а также вторую фазу (G2; CDK1, CDK2) активируя генную программу FoxM1, необходимую для митоза. Аналогичным образом, различные фазы транскрипции на основе РНК-полимеразы II (RNAPII) регулируются CDK. Так, последовательное фосфорилирование С-концевого домена RNAPII происходит: CDK7 и CDK8 в инициации транскрипции, и CDK9 в удлинении РНК. Кроме того, активность CDK (по крайней мере, CDK11) для обработки РНК (сращивание) [151]. Однако, наше понимание CDK-биологии по-прежнему неполное из-за обширного функционального перекрытия и избыточности между многими парами CDK-циклина.

Поскольку рак характеризуется неконтролируемым делением клеток, вмешательство в CDK как ключевые регуляторы клеточного цикла кажется привлекательными в качестве терапевтической стратегии. Однако сложность биологии CDK-циклина сбивает интерпретируемую генетическую целевую проверку CDK. Так возникает неопределенность в отношении того, какая функция CDK должна быть заблокирована для достижения эффективности и специфической противоопухолевой активности в терапевтической обстановке, и это уже давно связано с развитием ингибиторов CDK. Большое количество ингибиторов CDK было испытано клинически в прошлом - в основном с неутешительными результатами [152].

Тем не менее, первый ингибитор CDK, palbociclib, теперь получил

одобрение FDA и используется в комбинации с letrozole (нестероидным ингибитором ароматазы) в ER-положительном, HER2- отрицательном метастатическом раке молочной железы. Palbociclib - высокочувствительный CDK4 / 6-селективный агент, доклинический исследования с этим и несколькими другими CDK4 / 6-селективными соединениями показывают противораковую активность в диапазоне моделей, причем эта активность зависит от наличия функциональной ретинобластомы белка (pRb, субстрат фосфорилирования CDK4 / 6) и приводят к остановке цитостатического G1. Быстро обратимая нейтропения является основной дозозависимой токсичностью palbociclib [152].

Другие ингибиторы CDK, которые остаются под клиническим развитием, включают еще два CDK4 / 6- селективные агенты: ribociclib, abemaciclib, а также количество pan-CDK-селективных соединений: dinaciclib, AT 7519, milciclib, toniciclib и CYC 065. Кроме того, МТК1, которые могут быть классифицированными как ингибиторы CDK, являются TG 02 и RGB 286638.

Ингибитор киназы, который, вероятно, имеет более длительную клиническую историю развития, чем любой другой – alvocidib (флавопиридол). Это соединение показало заметную эффективность в CLL, и эта активность была приписана сильному ингибированию CDK9 alvocidib. CLL - и многие другие виды рака - известны избирательно, чтобы зависеть от эффективного синтеза РНК для поддержки антиапоптотической сигнализации, которая, в свою очередь, требует активности CDK9 [153]. Alvocidib в настоящее время вновь введен в клиническое развитие, вероятно, из-за сильного ингибирования CDK9. Первый селективный ингибитор CDK9, BAY 1143572, также вступил в клинические испытания. Это соединение содержит необычную солубилизирующую сульфоксимин субструктуру [154].

1.1.23 ДНК киназные пути ответа

Семейство киназ, родственных PI3K (PIKK), включают ATM, ATR

DNA-ПК, hSMG1, mTOR (обсуждается выше в отношении ингибиторов пути PI3K) и TRRAP, все белки, которые содержат C-терминальный киназный домен, тесно связанный с липид-киназой PI3K, который функционирует как Ser / Thr киназа, тогда как CHK1 и CHK2 являются Ser / Thr-киназами семейства САМК (подсемейство NIM1). Несколько PIKK, включая ATM, ATR и DNA-ПК, а также CHK-киназы, вовлечены в пути репликации ДНК и пути контрольной точки повреждения.

Ответ на повреждение ДНК помогает клеткам поддерживать геномную стабильность, двумя основными маршрутами сигнализации являются путь ATM-CHK2, который контролирует восстановление двухцепочечной ДНК, и путь ATR-CHK1, который в основном реагирует на одноцепочечную ДНК. ДНК-ПК, с другой стороны, играет роль в восстановлении ДНК путем негомологического концевое соединения. Поскольку эффективное восстановление ДНК позволяет раковым клеткам переносить не только онкогенный репликационный стресс, но и экзогенный генотоксический от радио- и химиотерапии, путь ответа ДНК может представлять собой перспективную мишень для лечения рака. По меньшей мере, ингибиторы ATR и CHK1 считаются потенциально полезным для монотерапии некоторых видов рака, например, пациентов с p53 и других ответов на повреждение ДНК, тогда как ATM, ATR, CHKs и DNA-ПК ингибиторы все потенциально ценны как радио- и химио-сенситизирующие агенты [155].

Хотя клиническая оценка ряда ингибиторов CHK была оценена в прошлом [156], в настоящее время только активные ингибиторы CHK1 prexasertib и GDC 0575 продолжают активно развиваться. Первыми селективными ингибиторами ATR вошедшими в клинику являются VX 970, VX 803 и AZD 6738. Кроме того, ингибитор ATM AZD 0156 и ДНК-ПК ингибиторы VX 984 и M 3814 находятся на ранних клинических испытаниях. Наконец, первый в своем классе ингибитор WEE1 AZD 1775 является другой киназой связанной с контролем контрольной точки клеточного цикла после повреждения ДНК.

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Конструирование ингибиторов EGFR и молекулярный докинг

Анализ литературных данных и ранние исследования нашей лаборатории показали широкие перспективы использования пиримидинового скаффолда для разработки высокоаффинных ингибиторов протеинкиназ. В частности, в данном разделе будет рассмотрен структурно-ориентированный подход для конструирования ингибиторов внутриклеточного домена рецептора эпидермального фактора роста базирующихся с одной стороны на структуре самой биомишени, а с другой на перспективном 4-аминопиримидиновом скаффолде.

На рисунке 11 представлена схема конструирования лигандов. Как видно из представленной схемы молекула целевых ингибиторов содержит 4-аминопиримидиновый скаффолд с целью обеспечения базовой фармакологической активности (ингибирование киназ), центр позволяющий снизить липофильность, тиазольный линкер, а также донор-акцепторный фрагмент по отношению к образованию межмолекулярных водородных связей.

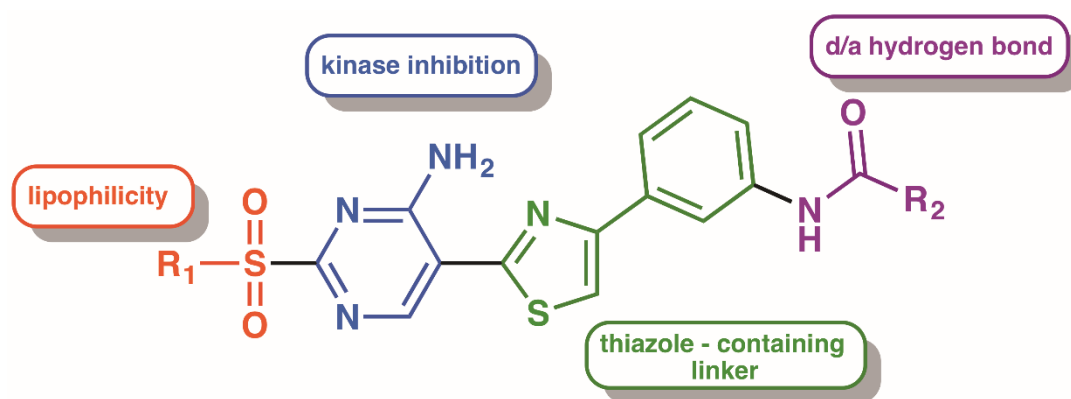
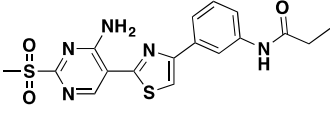
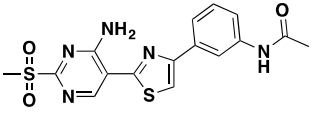
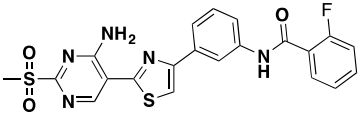
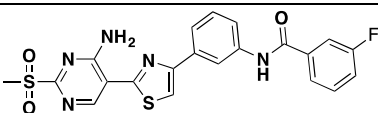
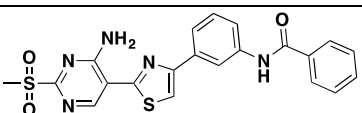


Рисунок 11 – Конструирование лиганда

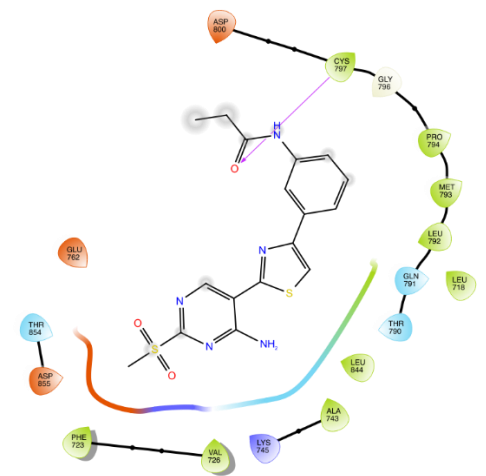
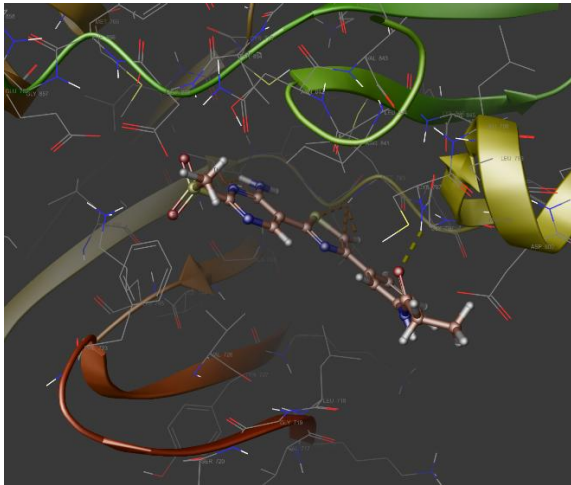
На основании данной схемы была сгенерирована виртуальная комбинаторная библиотека и осуществлен молекулярный докинг в активный сайт связывания EGFR (программный пакет Schrodinger Suite 2017-1) с использованием оценочной функции Glide Score.

В таблице 1 представлены результаты молекулярного докинга для соединений-хитов:

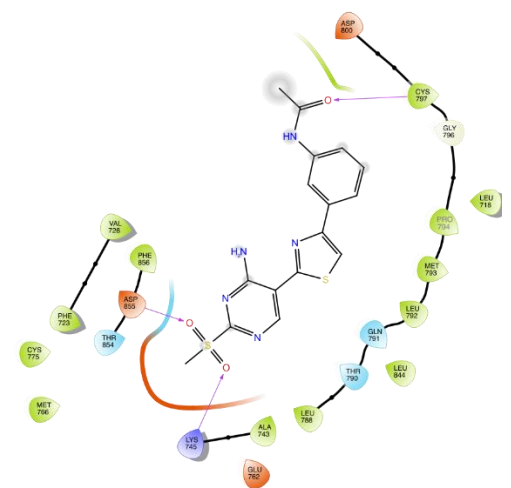
Соединение	Glide Score	MMGBSA dG Bind ккал/моль
 SV-164	-7.654	-51.232
 SV-163	-7.019	-48.023
 SV-159	-5.975	-63.761
 BJE35	-5.868	-61.442
 SV-158	-5.684	-59.981

На рисунке 12 представлена графическая визуализация связывания рецептор-лиганд для соединений-хитов.

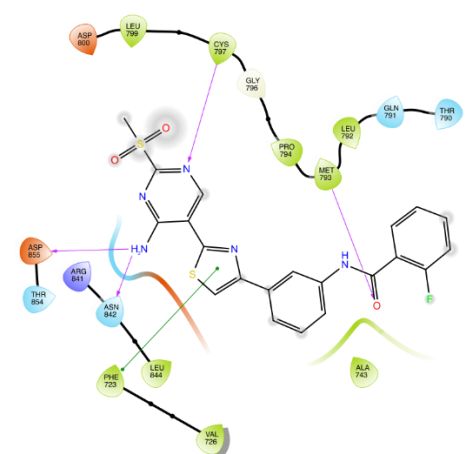
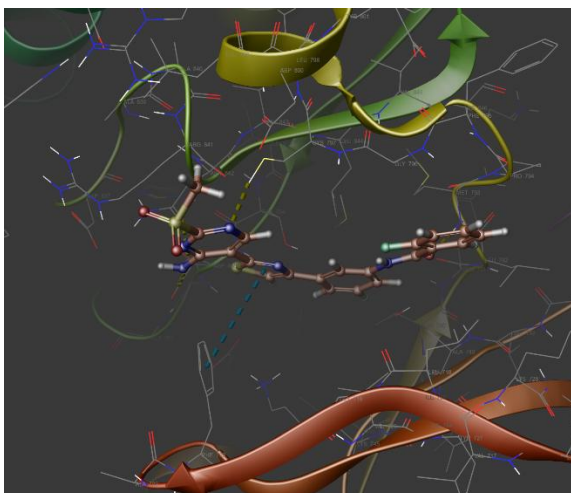
Комплекс SV 164-EGFR



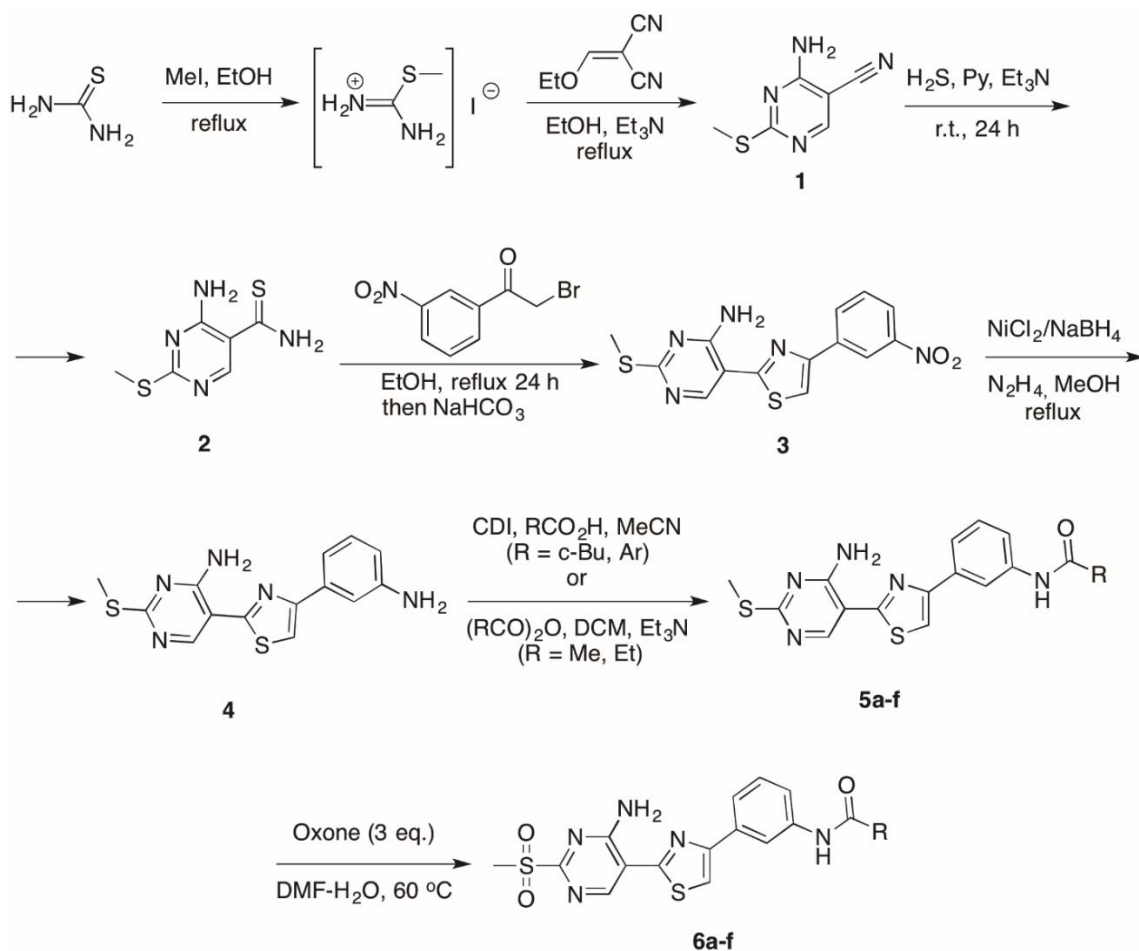
Комплекс SV 163-EGFR



Комплекс SV 159-EGFR



пиримидинсодержащего тиоамида, сборка тиазольного цикла по Ганчу и стадия окисления сульфида до сульфона.



a R = Me; b R = Et; c R = c-Bu; d R = Ph; e R = 2-FC₆H₄; f R = 3-FC₆H₄

Схема 1: стратегия синтеза целевых соединений.

На первой стадии получали 4-амино-5-цианопиримидин **1** в ходе двухкомпонентной циклизации *S*-метилизотиурониевой соли и этоксивинилиденмалондинитрила в присутствии триэтиламина при кипячении в этиловом спирте. Полученный нитрил **1** удалось перевести в тиоамид **2** при действии системы H₂S/Et₃N в пиридине. Сборку тиазола **3** производили в ходе реакции Ганча с применением *m*-нитрофенацилбромид.

Анализ литературных данных показал, что восстановление MeS-производных пиримидина системой Ni_R/N₂H₄ зачастую приводит к продуктам десульфуризации. Дабы избежать данного побочного процесса, для селективного восстановления нитрогруппы в тиазоле **3**, мы использовали вместо никеля Ренея борид никеля получаемый *in situ* в системе NiCl₂/NaBH₄.

Учитывая наличие двух аминогрупп в молекуле соединения **4**, возник вопрос в региоселективности реакции ацилирования. Учитывая тот факт, что аминогруппа пиримидинового цикла должна быть в должной мере деактивирована, за счет π -электронодефицитности гетероцикла, мы предположили, что в стандартных условиях реакции ацилирования анилинов, данная аминогруппа не будет затронута. Данное предположение удалось подтвердить экспериментально, при получении соединений **5a** и **5b** в ходе ацилирования амина **4** под действием уксусного и пропионового ангидридов в дихлорметане в присутствии триэтиламина при $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. В случае производных **5c-f**, для их получения использовалась активированная CDI карбоновая кислота в безводном ацетонитриле.

Одной из ключевых стадий получения описываемых целевых соединений является стадия окисления, которая в случае наличия в субстрате большого количества гетероатомов становится не тривиальной задачей. Стандартная система типа $\text{H}_2\text{O}_2/\text{AcOH}$ не привела к желаемым сульфонам **6**. В ходе оптимизации процесса окисления сульфидов были найдены оптимальные условия, заключающиеся в непродолжительном нагревании при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ раствора соединения **5** в DMF с тремя эквивалентами оксона.

Строение всех синтезированных соединений подтверждено с помощью спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{19}F .

На рисунке 13 представлен ЯМР ^1H спектр соединения **6a**.

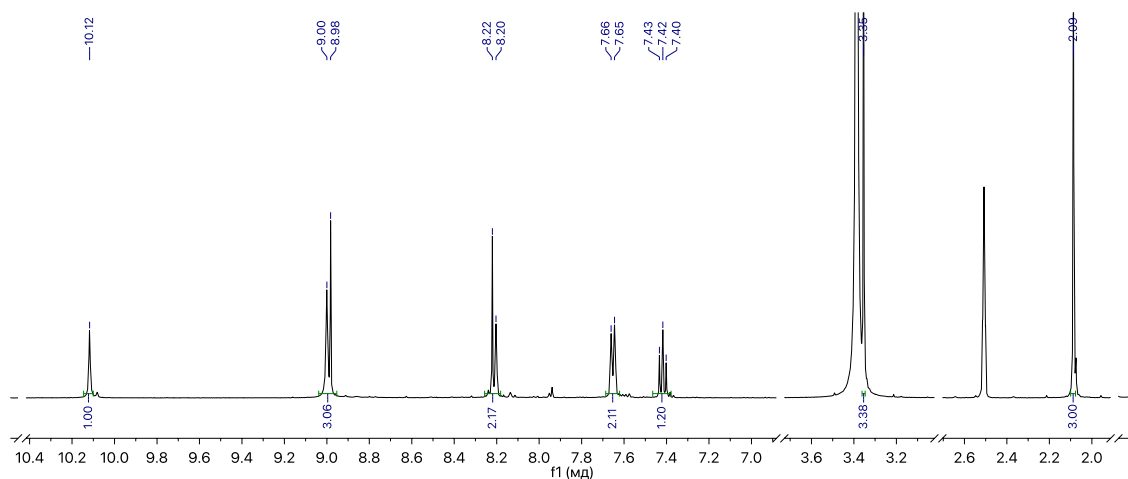


Рисунок 13: ЯМР ^1H спектр соединения **6a**.

Как видно из представленных данных в спектре наблюдаются характеристические сигналы для протонов Me_2SO -группы в области 3.3-3.4 м.д., сигналы протонов 1,3-дизамещенной арильной системы в области 7.3-7.7 миллионных долей и др.

Аналогичная характеристическая спектральная картина, полностью подвергающая строение полученных соединений, наблюдается и в спектрах ЯМР ^{13}C (рисунок 14).

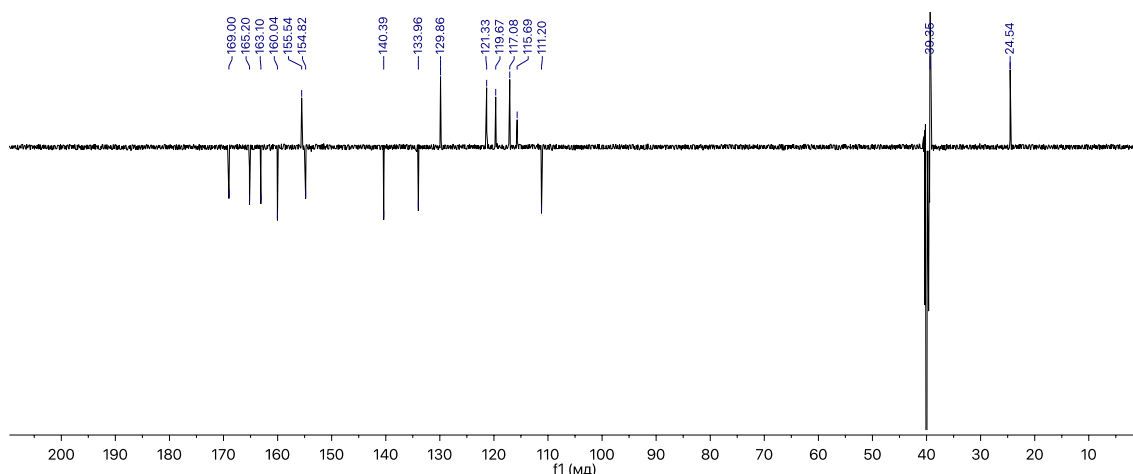


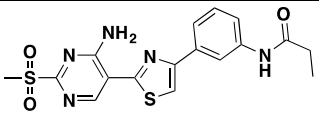
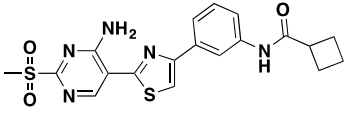
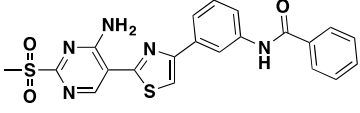
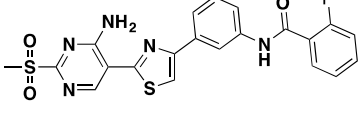
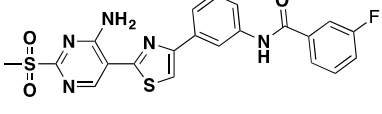
Рисунок 14: ЯМР ^{13}C спектр соединения **6a**.

2.3 Биологические испытания

Для оценки эффективности разработанных ингибиторов EGFR было осуществлено исследование цитотоксичности на клеточной линии эпидермоидной карциномы A431, обильно экспрессирующих EGFR дикого типа. Оценка цитотоксичности производилась с применением МТТ-теста. В таблице 2 представлены результаты цитотоксичности в виде значений EC_{50} (эффективная концентрация, при которой 50% клеток на момент исследования погибают).

Таблица 2: результаты цитотоксичности в виде значений EC_{50}

Соединение	EC_{50} (μM)
<p>6a</p>	2.73±0.33

 <p>6b</p>	4.32±0.44
 <p>6c</p>	1.25±0.25
 <p>6d</p>	0.76±0.08
 <p>6e</p>	1.05±0.15
 <p>6f</p>	0.79±0.11

Как видно из представленных данных все синтезированные соединения проявляют высокие значения цитотоксичности, превосходящие аналогичные для gefitiniba более чем в 40 раз (для соединений **6f** и **6d**).

Для оценки прямого воздействия синтезированных соединений на EGFR в исследуемых клетках проводили иммуноферментный анализ позволяющий оценить уровень экспрессии pEGFR до и после активации рецептора под действием эпидермального фактора роста. На рисунке 13 представлены данные ИФА. Как видно из представленных данных, уровень экспрессии pEGFR под действием исследуемых соединения снижается, относительно контроля, однако уступает аналогичным значениям при действии gefitiniba. Что может свидетельствовать о существование альтернативных механизмов цитотоксического действия исследуемых соединений.

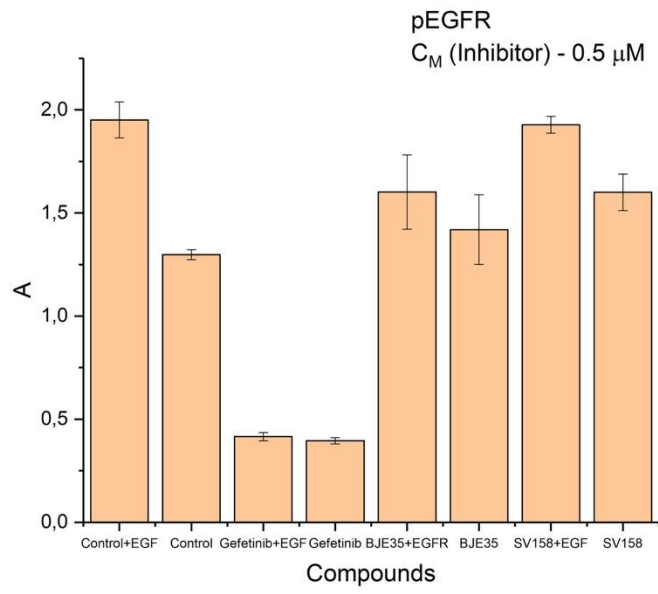


Рисунок 13: данные ИФА.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Реагенты и оборудование

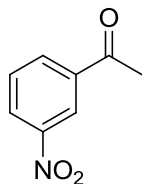
Контроль за ходом реакции и чистоту полученных соединений оценивали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent 1220 м» с спектрофотометрическим детектором. Колонка ZORBAX C-18, элюент: MeCN:H₂O в соотношении 8:2; скорость потока элюента 1 мл/мин. Обработка данных на выходе проводилась с применением программы OpenLab фирмы Agilent.

Данные ЯМР спектроскопии получены при комнатной температуре в дейтерированном диметилсульфоксиде (DMCO-*d*₆) на спектрометре Bruker 600 AvanceTM с рабочей частотой 600.22 и 150.93 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно. Сигналы химических сдвигов ядер ¹H и ¹³C приведены в миллионных долях относительно сигнала TMS. Для спектров ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C остаточный сигнал DMCO- *d*₆ был использован в качестве опорного (2.50 м.д. и 35.9 м.д. соответственно). Спектры ЯМР ¹H регистрировались со спектральной шириной 7.1 кГц, точкой данных 64 К, цифровым разрешением 0.22 Гц, задержкой релаксации 1.0 с и 30° шириной импульса 2.8 мкс, в то время как ¹³C – с шириной спектра 39.06 кГц, точкой данных 64 К, задержкой релаксации 2.0 с и 30 ° шириной импульса 5.6 мкс. HMQC спектры были собраны в 128×1024 матрице с одним переходом за *t*₁ приращение и обработаны как 1024×1024 матрица, значение одного гетероядерного взаимодействия было установлено на уровне 145 Гц. HMBSC спектры были собраны в 128×4096 матрице с одним переходом за *t*₁ приращение и обработаны как 2048×1024 матрица, значение дальних взаимодействий было установлено на уровне 10 Гц.

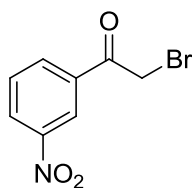
Реагенты производства Merck, Acros Organics и Sigma– Aldrich использовали без дополнительной очистки.

3.2 Получение исходных соединений

3-Нитроацетофенон



К 75 мл H_2SO_4 концентрированной при температуре -5 — -10 °С прикапывали при перемешивании 29.2 мл ацетофенона (30 г; 0.25 моль). Затем реакционную смесь охлаждали до -10 °С и также при перемешивании добавляли нитрующую смесь (30 мл концентрированной H_2SO_4 и 24 мл концентрированной HNO_3 (0.325 моль; $d^{25} = 1.376$) по каплям, придерживаясь указанной температуры. После выливали реакционную массу в 1 л воды со льдом и отфильтровывали выпавший осадок многократно промывая холодной водой. Для очистки растворяли полученный осадок в 100 мл EtOH и выливали в 1 л воды со льдом. Получали порошок бледно-желтого цвета. Выход составил 65%; Т. пл. = 70 – 72 °С; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 96%.

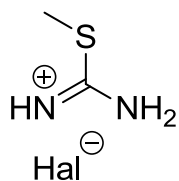


2-бром-1-(3-нитрофенил)этанон

Реакцию проводили при температуре 40 – 50 °С и перемешивании. К 3-нитроацетофенону (10 г; 0,061 моль) в 60 мл этилового спирта порционно добавляли бром 3.12 мл (9.68 г; 0.061 моль) соблюдая указанную температуру. Затем оставляли смесь перемешиваться до полного обесцвечивания. Далее выливали смесь в 700 мл воды со льдом, отфильтровывали полученный осадок и промывали ледяной водой. Получали порошок бежевого цвета с выходом 59%; Т. пл. = 60 – 62 °С; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 94,4%.

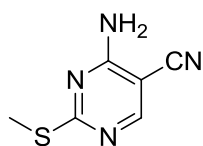
Метилйодид

К смеси метанола (0.33 моль) и красного фосфора (3.41 г; 0.11 моль) при охлаждении и перемешивании добавляли молекулярный йод (41.9 г; 0.165 моль). Затем реакционную массу кипятили в течении 2 часов и отгоняли продукт, собирая его в охлаждаемый приемник с 10 %-ым раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, затем дистиллят промыли 10 %-ым раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, органический слой сушили прокаленным CaCl_2 . Выход составил 56 %; Т. кип. = 42 °С; $n_D^{20} = 1.5304$.



Гидройодид 2-метилизотиурония

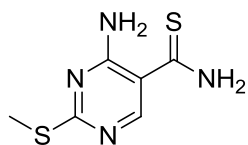
Смесь из тиомочевины (9.36г, 0.123 моль), метилйодида (0.123 моль) в 80 мл этанола кипятили в течение 12 часов. Затем испаряли растворитель. Выход составил 97%; Т. пл. = 147-149°С.



4-Амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карбонитрил (1)

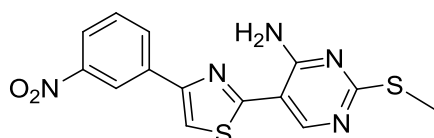
Смесь из гидройодид 2-метилизотиурония (10.9 г; 50 ммоль), 2-(этоксиметил)малонитрила (6.1 г; 50 ммоль) и 13.87 мл триэтиламина (10.1 г; 100 ммоль) кипятили в течение 12 часов. По истечении времени реакционную массу разбавили ледяной водой со льдом и отфильтровали осадок. Выход составил 79%; Т. пл. = 212-214°С; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 95.5%. ЯМР ¹H δ: 5 8.44 (с, 1H), 7.90 (д, J = 156.1 Гц, 2H), 2.45 (д, J = 1.3 Гц,

3H). ЯМР ^{13}C δ : 5 175.10, 161.85, 161.03, 116.15, 109.99, 85.75, 13.91.



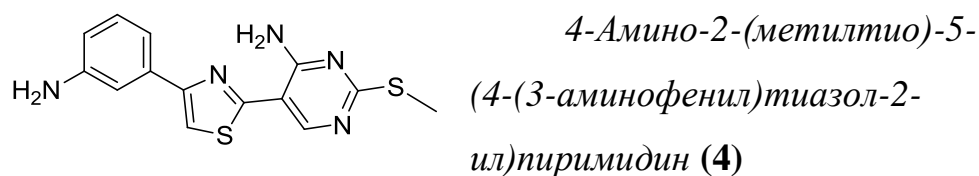
4-Амино-2-
(метилтио)пиримидин-5-
карботиоамид (2)

Через смесь 4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карбонитрила (6.64 г; 40 ммоль), 6 мл триэтиламина (4.04 г; 40 ммоль) и 40 мл пиридина пропускали сероводород, получаемый путем действия воды на сульфид фосфора до изменения окраски раствора с желтой на темно-зеленую. Смесь выдерживали при комнатной температуре 24 часа, после чего выливали в 500 мл воды со льдом, полученный осадок отфильтровывали и промывали ледяной водой. Выход составил 64%; Т. пл. = 245-247°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 99%. ЯМР ^1H δ : 5 9.76 (с, 1H), 9.50 (с, 1H), 8.23 (с, 1H), 8.02 (с, 2H), 2.45 (с, 3H). ЯМР ^{13}C δ : 5 195.79, 172.07, 160.77, 153.32, 111.86, 109.99, 13.82.



4-Амино-2-(метилтио)-5-
(4-(3-нитрофенил)тиазол-2-
ил)пиримидин (3)

Смесь из 4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карботиоамида (4.08 г; 19.1 ммоль) и 2-бром-1-(3-нитрофенил)этанона (4.68 г; 19.1 ммоль) в 200 мл этанола кипятили при перемешивании в течении 24 часов. Далее добавляли в реакционную смесь 50 мл NaHCO₃, разбавляли водой в два раза и отфильтровывали полученный осадок. Получили осадок желтого цвета с выходом 76%; Т. пл. = 291-293°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 95%.



Реакцию проводили при помощи пористого никеля, получаемого при взаимодействии на хлорид никеля в метаноле гидроборатом натрия. 4 г пористого никеля добавляли к смеси из 4-амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-нитрофенил)тиазол-2-ил)пиримидина (2.1 г; 5.4 ммоль) в метаноле 150 мл, добавляли в реакцию смесь 2.65 мл гидразингидрата (2.73 г; 54 ммоль), кипятили при перемешивании 2 часа. Далее горячую реакцию смесь отфильтровывали от пористого никеля, промывали осадок ацетоном, маточный раствор разбавляли водой в пятикратном объеме, полученный белый осадок отфильтровывали.

Выход продукта составил 80%; Т. пл. = 226-228°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹H δ: 8.63 (с, 1H), 8.58 – 8.23 (м, 2H), 7.90 (с, 1H), 7.18 (с, 1H), 7.14 – 7.06 (м, 2H), 6.60 (д, J = 7.7 Гц, 1H). ЯМР ¹³C δ: 171.66, 164.32, 158.81, 155.25, 155.08, 149.56, 134.42, 129.86, 114.63, 114.27, 112.32, 111.85, 106.09, 13.87.

3.3 Синтез ингибиторов

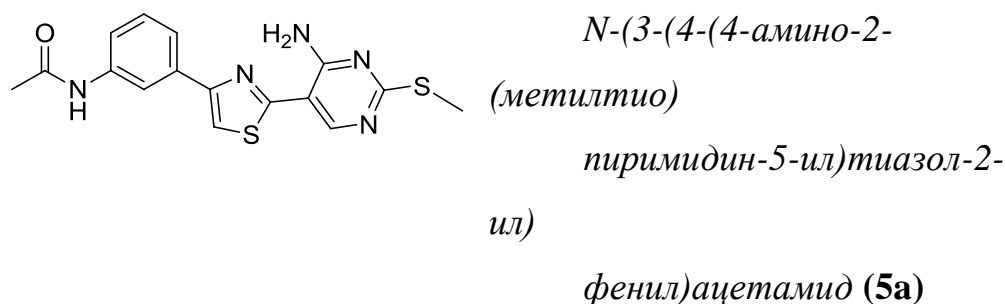
Ацилирование общая методика

Хлорангидриды карбоновых кислот. Общая методика синтеза

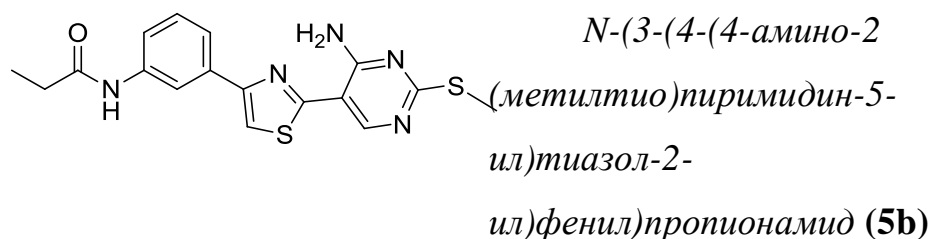
К раствору соответствующей кислоты (25 ммоль) в 40 мл дихлорметана добавляли 30 мкл ДМФА и 2.9 мл тионилхлорида (4.76 г, 40 ммоль). Кипятили в течении 3 часов с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой. По истечении времени удаляли растворитель. Вводили в следующую стадию без дополнительной очистки.

Производные N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)алкиламида. Общая методика 5a-b

При температуре -5°C к смеси из 4-амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-аминофенил)тиазол-2-ил)пиримидина (0.79 г, 2.5 ммоль) и 0.38 мл триэтиламина (0.30 г, 2.75 ммоль) в 70 мл дихлорметана прикапывали при перемешивании соответствующий хлорангидрид (2.5 ммоль), оставляли перемешиваться при пониженной температуре на час. Далее реакцию смесь оставляли при комнатной температуре на 24 часа. Затем удаляли растворитель, полученный осадок промывали по 50мл раствора хлорида натрия и гидрокарбоната натрия.



Выход продукта составил 92%; Т. пл. = $267-269^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹H δ: 10.10 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.41 (с, 2H), 8.18 (т, *J* = 2.0 Гц, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.69 – 7.55 (м, 2H), 7.40 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 2.08 (с, 3H). ЯМР ¹³C δ: 171.78, 168.95, 164.78, 158.79, 155.25, 154.29, 140.34, 134.27, 129.76, 121.22, 119.46, 117.06, 113.32, 105.99, 24.53, 13.88.

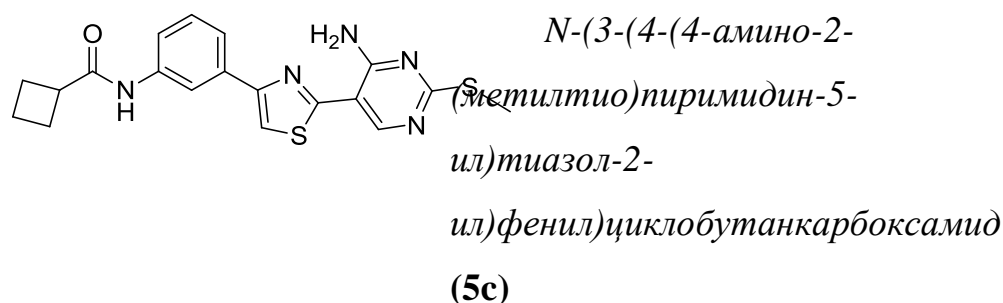


Выход продукта составил 92%; Т. пл. = $250-251^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 98%. ЯМР ¹H δ: 10.03 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.41 (с, 2H), 8.19 (с, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.63 (дд, *J* = 23.0, 8.0 Гц, 2H), 7.40 (т, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.36 (квинт., *J* = 7.5 Гц, 2H), 1.11 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H). ЯМР ¹³C δ: 172.64, 171.78, 164.77, 158.78, 155.24, 154.33, 140.40, 134.26, 129.75, 121.15, 119.48, 117.04, 113.30, 105.99, 30.05,

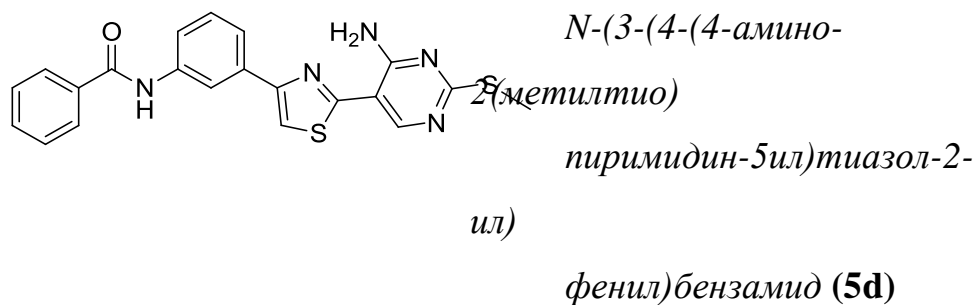
13.88, 10.12.

Производные N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)алкиламида. Общая методика 5c-f

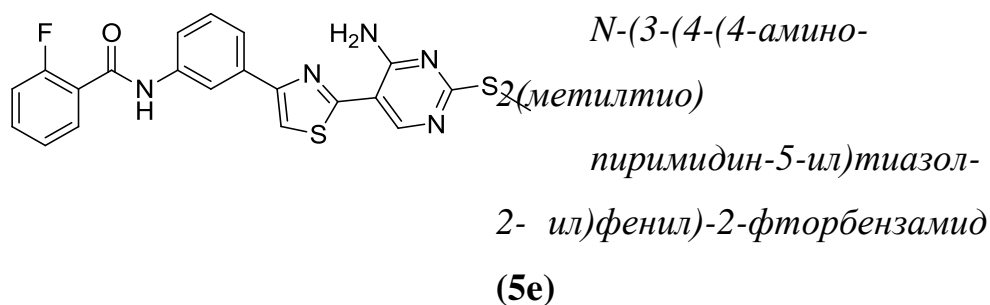
Смесь из соответствующей кислоты (10 ммоль), CDI (1.78 г; 11 ммоль) и 30 мл MeCN безводный перемешивали при комнатной температуре 2 часа. Затем добавляли 4-амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-аминофенил)тиазол-2-ил)пиримидин (3.15 г; 10 ммоль), выдерживали смесь при перемешивании 24 часа. Далее смесь обработали последовательно 50 мл EtOAc + 50 мл воды, раствором 1 мл концентрированной HCl в 50 мл воды, 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, 50 мл насыщенного раствора NaCl. Органический слой сушили Na₂SO₄ и удаляли растворитель.



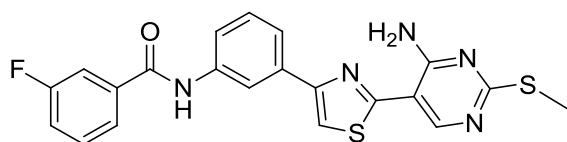
Выход продукта составил 99%; Т. пл. = 250-252°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹H δ: 9.91 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.41 (с, 2H), 8.20 (с, 1H), 8.04 (с, 1H), 7.65 (дд, *J* = 31.5, 7.9 Гц, 2H), 7.40 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 3.27 (р, *J* = 8.3 Гц, 1H), 2.32 – 2.08 (м, 4H), 2.04 – 1.74 (м, 2H). ЯМР ¹³C δ: 173.56, 171.79, 164.76, 158.78, 155.26, 154.33, 140.41, 134.25, 129.75, 121.18, 119.59, 117.14, 113.33, 105.98, 25.08, 18.20, 13.88.



Выход продукта составил 99%; Т. пл. = 226-228°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 95%. ЯМР ¹H δ: 10.51 (с, 1H), 8.65 (с, 1H), 8.44 (д, *J* = 1.9 Гц, 2H), 8.07 (с, 1H), 8.03 (дд, *J* = 8.1, 1.4 Гц, 2H), 7.89 (дд, *J* = 8.1, 2.0 Гц, 1H), 7.70 (д, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.61 (т, *J* = 7.3 Гц, 1H), 7.55 (т, *J* = 7.4 Гц, 2H), 7.46 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H). ЯМР ¹³C δ: 171.77, 166.18, 164.79, 158.76, 155.22, 154.30, 140.26, 135.32, 134.21, 132.10, 128.85, 128.21, 121.83, 120.85, 118.56, 113.35, 105.98, 13.89.



Выход продукта составил 99%; Т. пл. = 242-244°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹⁹F δ: 5 -114.59. ЯМР ¹H δ: 5 10.59 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.51 - 8.28 (м, 3H), 8.08 (с, 1H), 7.86 - 7.78 (м, 1H), 7.71 (тт, *J* = 6.2, 2.0 Гц, 2H), 7.60 (дддд, *J* = 8.8, 7.3, 5.3, 1.8 Гц, 1H), 7.47 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 7.43 - 7.30 (м, 2H). ЯМР ¹³C δ: 5 171.80, 164.84, 163.42, 160.33, 158.78, 158.35, 155.28, 154.14, 139.95, 134.37, 133.07, 130.38, 129.88, 125.39, 125.05, 122.00, 120.09, 117.78, 116.74, 116.57, 113.48, 105.98, 13.88.

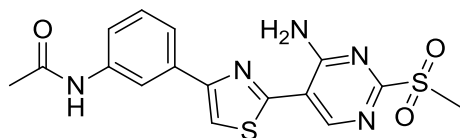


N-(3-(4-(4-амино-2-
(метилтио)
пиримидин-5-
ил)тиазол-2- ил)фенил)-3-
фторбензамид (**5f**)

Выход продукта составил 99%; Т. пл. = 252-254°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹⁹F δ: 5 -112.57. ЯМР ¹H δ: 5 10.49 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.53 - 8.30 (м, 3H), 8.08 (с, 1H), 7.86 (д, *J* = 7.7 Гц, 2H), 7.81 (дт, *J* = 9.7, 2.2 Гц, 1H), 7.72 (дт, *J* = 7.8, 1.3 Гц, 1H), 7.62 (тд, *J* = 8.0, 5.8 Гц, 1H), 7.48 (тд, *J* = 8.2, 4.3 Гц, 2H).

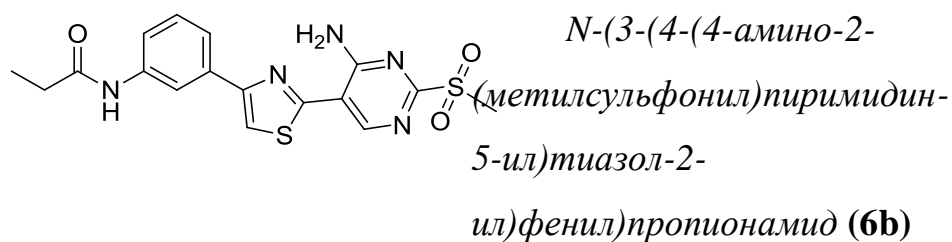
Окисление. Общая методика синтеза

Реакцию проводили при температуре 60°C и перемешивании. К смеси исходного сульфида (0,63 г; 1,5 ммоль) в 20 мл ДМФА добавляли раствор оксона (2.76 г; 4.5 ммоль) в 5 мл воды. Смесь выдерживали час при заданной температуре. Далее смесь разбавляли 100 мл ледяной воды и отфильтровывали выпавший осадок.

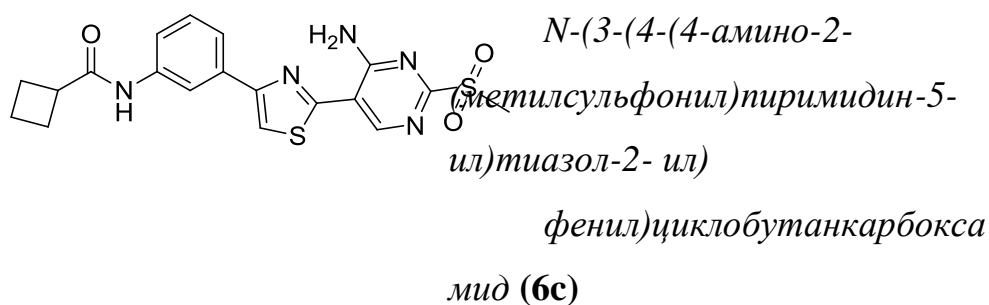


N-(3-(4-(4-амино-2-
(метилсульфонил)пиримидин-
5-ил)тиазол-2-
ил)фенил)ацетамид (**6a**)

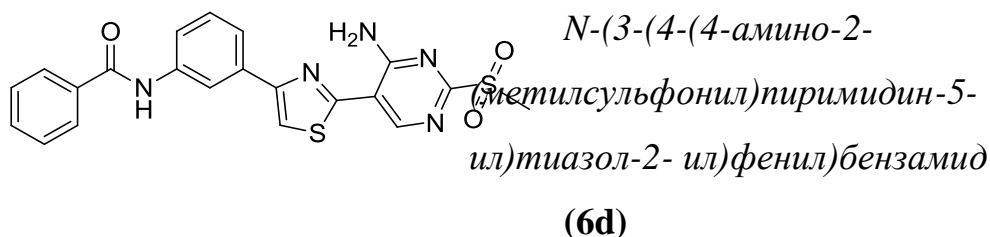
Выход продукта составил 72%; Т. пл. = 230-232°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 96%. ЯМР ¹H δ: 10.12 (с, 1H), 8.99 (д, *J* = 9.0 Гц, 3H), 8.21 (д, *J* = 8.6 Гц, 2H), 7.65 (дт, *J* = 8.1, 1.9 Гц, 2H), 7.42 (т, *J* = 7.9 Гц, 1H), 3.35 (с, 3H), 2.09 (с, 3H). ЯМР ¹³C δ: 169.00, 165.20, 163.10, 160.04, 155.54, 154.82, 140.39, 133.96, 129.86, 121.33, 119.67, 117.08, 115.69, 111.20, 39.35, 24.54.



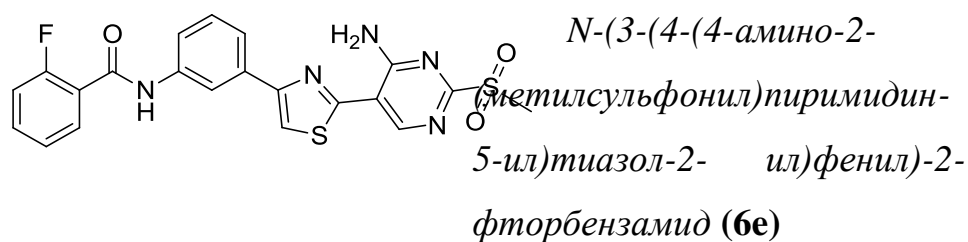
Выход продукта составил 43%; Т. пл. = 270-272°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 99%. ЯМР ¹H δ: 10.04 (с, 1H), 8.98 (д, *J* = 10.9 Гц, 3H), 8.21 (с, 2H), 7.73 – 7.60 (м, 2H), 7.41 (т, *J* = 8.0 Гц, 1H), 3.35 (с, 3H), 2.36 (квинт, *J* = 7.5 Гц, 2H), 1.11 (т, *J* = 7.5 Гц, 3H). ЯМР ¹³C δ: 172.69, 165.19, 163.08, 160.03, 155.52, 154.86, 140.43, 133.96, 129.85, 121.26, 119.69, 117.06, 115.66, 111.20, 39.34, 30.05, 10.11.



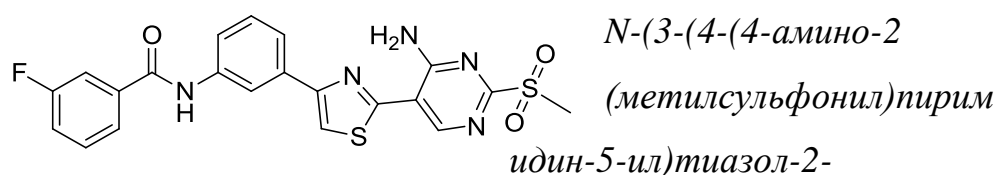
Выход продукта составил 77%; Т. пл. = 275-276°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹H δ: 9.91 (с, 1H), 9.09 – 8.75 (м, 3H), 8.33 – 8.03 (м, 2H), 7.67 (д, *J* = 44.1 Гц, 2H), 7.40 (с, 1H), 3.36 (с, 3H), 3.26 (с, 1H), 2.19 (д, *J* = 75.3 Гц, 4H), 1.88 (д, *J* = 80.7 Гц, 2H). ЯМР ¹³C δ: 173.56, 165.18, 163.63, 163.05, 160.01, 155.48, 154.85, 140.42, 133.93, 129.80, 121.28, 119.78, 117.14, 115.62, 114.88, 111.19, 109.61, 40.12, 39.33, 25.09, 18.21.



Выход продукта составил 67%; Т. пл. = 247-249°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 99%. ЯМР ¹H δ: 10.43 (с, 1H), 9.06 – 8.93 (м, 2H), 8.41 (с, 1H), 8.26 (с, 1H), 7.99 (д, J = 7.6 Гц, 2H), 7.89 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.75 (д, J = 7.5 Гц, 1H), 7.62 (т, J = 7.2 Гц, 1H), 7.56 (т, J = 7.4 Гц, 2H), 7.49 (т, J = 7.9 Гц, 1H), 3.36 (с, 3H). ЯМР ¹³C δ: 173.44, 166.24, 165.21, 163.14, 160.03, 155.56, 154.82, 140.26, 135.37, 133.94, 132.14, 129.80, 128.91, 128.15, 121.98, 121.00, 118.51, 115.73, 111.20.



Выход продукта составил 75%; Т. пл. = 250-252°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 97%. ЯМР ¹H δ: 10.60 (с, 1H), 9.04 – 8.97 (м, 2H), 8.36 (т, J = 2.1 Гц, 1H), 8.28 (с, 1H), 7.83 (дд, J = 8.2, 2.3 Гц, 1H), 7.79 – 7.67 (м, 2H), 7.65 – 7.56 (м, 1H), 7.49 (тд, J = 7.9, 2.2 Гц, 1H), 7.43 – 7.31 (м, 2H), 3.35 (с, 3H). ЯМР ¹³C δ: 173.46, 165.21, 163.76, 163.45, 163.17, 160.32, 160.03, 158.34, 155.59, 154.67, 139.98, 134.07, 133.04, 130.37, 129.99, 125.10, 122.13, 120.23, 117.80, 116.59, 115.86, 111.19, 39.35. ЯМР ¹⁹F δ: -114.63.



ил)фенил)-3-фторбензамид

(6f)

Выход продукта составил 72%; Т. пл. = 230-232°C; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2) 96%. ЯМР ¹H δ: 10.49 (с, 1H), 9.00 (д, *J* = 7.1 Гц, 2H), 8.44 – 8.35 (м, 1H), 8.27 (с, 1H), 8.22 (с, 0H), 7.91 – 7.73 (м, 4H), 7.62 (тд, *J* = 8.0, 5.8 Гц, 1H), 7.55 – 7.43 (м, 2H), 3.36 (с, 3H). ЯМР ¹³C: δ 173.47, 165.23, 164.80, 163.75, 161.42, 160.03, 155.59, 154.75, 154.58, 139.97, 137.61, 133.99, 131.16, 129.86, 124.37, 122.24, 121.09, 119.13, 118.59, 115.82, 115.08, 114.89, 111.20, 39.35. ЯМР ¹⁹F δ -112.56.

3.4 Биологические испытания

Культивирование клеток

В работе использовалась клеточная линия A431 (эпидермоидная карцинома). Культивирование производили в среде DMEM Advanced (Gibco) с 3% FBS (Gibco), в присутствии пенициллина 50 Ед/мл и гентамицина 50 мкг/мл, при 37 °С и 5% содержании CO₂. Все опыты с клетками проводили начиная с 4 пассажа. Общее количество пассажей при культивировании не превышало 10.

Исследование цитотоксичности

В 96-луночные плоскодонные планшеты (Eppendorf) помещали 7×10^3 клеток в 200 мкл полной ростовой среды и оставляли в инкубаторе на 24 ч для прикрепления. Далее производили раститровку исследуемых соединений, начиная с 500 μ М (концентрация в полной ростовой среде), и инкубировали планшет в течении 48 ч. Далее в каждую лунку добавляли 40 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол -2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид) в PBS с концентрацией 0.5 мг/мл и инкубировали 4 часа. По истечении времени среду удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 200 мкл ДМСО и фотометрировали при 560 нм.

Клоногенный тест

В 6-луночные планшеты (Eppendorf) помещали 1.5×10^3 клеток в 2 мл полной ростовой среды и оставляли в инкубаторе на 24 ч для прикрепления. Далее в лунки 2-6 добавляли исследуемые соединения в концентрациях EC50 с последующим трехкратным разведением и инкубировали в течении 24 ч. После старую среду заменяли на новую и инкубировали планшеты в течении 14 дней, обновляя среду каждые 3 дня. По окончанию культивирования, среду удаляли, клетки фиксировали добавлением 2 мл метанола в каждую лунку на 10 минут, промывали водой и окрашивали 5% раствором

кристаллического фиолетового в течении 10 минут, промывали водой и сушили на воздухе.

ВЫВОДЫ

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. С применением мишень-ориентированного молекулярного дизайна предложены новые цитотоксические агенты, содержащие 4-аминопиримидиновый скаффолд.

2. Методами высокопроизводительного молекулярного докинга установлены ключевые взаимодействия белок-лиганд, обуславливающие их высокую активность.

3. Разработана синтетическая стратегия сборки комбинаторной библиотеки производных 4-аминопиримидина, позволяющая с легкостью вводить весь спектр фармакоформных фрагментов для дальнейшей heat to lead оптимизации.

4. Получены данные по цитотоксичности синтезированных соединений, говорящие о значительном превосходстве цитотоксического эффекта (более чем в 40 раз) клинически используемого ингибитора EGFR – гефитиниба.

5. Установлены факты (небольшое снижение pEGFR, относительно контроль по данным ИФА), позволяющие утверждать о более сложном механизме цитотоксического действия синтезированных соединений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Budzyn K., Marley P. D., Sobey C. G. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease // Trends in pharmacological sciences. 2006. Vol. 27. №. 2. P. 97-104.
2. Sasaki Y., Suzuki M., Hidaka H. The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline) sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway // Pharmacology & therapeutics. 2002. Vol. 93. №. 2-3. P. 225-232.
3. Rath N., Olson M. F. Rho- associated kinases in tumorigenesis: re- considering ROCK inhibition for cancer therapy // EMBO reports. 2012. Vol. 13. №. 10. P. 900-908.
4. O'Dell KM, Rummel AE. Tofacitinib: A novel oral Janus kinase inhibitor for rheumatoid arthritis // Formulary. 2012. Vol. 47.№.10. P. 353–358.
5. Grant S. K. Therapeutic protein kinase inhibitors // Cellular and molecular life sciences. 2009. Vol. 66. №. 7. P. 1163-1177.
6. Mazzei M. E., Richeldi L., Collard H. R. Nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis // Therapeutic advances in respiratory disease. 2015. Vol. 9. №. 3. P. 121-129.
7. Reichert J. M., Wenger J. B. Development trends for new cancer therapeutics and vaccines // Drug discovery today. 2008. Vol. 13. №. 1-2. P. 30-37.
8. Walker I, Newell H. Do molecularly targeted agents in oncology have reduced attrition rates // Nat Rev Drug Discov. 2009. Vol. 8. №. 1. P. 15–16.
9. Capdeville R. et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug // Nature reviews Drug discovery. 2002.

Vol. 1. №. 7. P. 493-502.

10. Roth B. L., Sheffler D. J., Kroeze W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia // *Nature reviews Drug discovery*. 2004. Vol. 3. №. 4. P. 353–359.

11. Goldstein D. M., Gray N. S., Zarrinkar P. P. High-throughput kinase profiling as a platform for drug discovery // *Nature reviews Drug discovery*. 2008. Vol. 7. №. 5. P. 391–397.

12. Patricelli M. P. et al. Functional interrogation of the kinome using nucleotide acyl phosphates // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. №. 2. P. 350-358.

13. Shoshan M. C., Linder S. Target specificity and off-target effects as determinants of cancer drug efficacy // *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2008. Vol. 4. №. 3. P. 273-280.

14. Csermely P., Agoston V., Pongor S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design // *Trends in pharmacological sciences*. 2005. Vol. 26. №. 4. P. 178-182.

15. Hopkins A. L., Mason J. S., Overington J. P. Can we rationally design promiscuous drugs? // *Current opinion in structural biology*. 2006. Vol. 16. №. 1. P. 127-136.

16. Jenwitheesuk E. et al. Novel paradigms for drug discovery: computational multitarget screening // *Trends in pharmacological sciences*. 2008. Vol. 29. №. 2. P. 62-71.

17. Roskoski Jr R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes // *Pharmacological research*. 2016. Vol. 103. P. 26-48.

18. Zhang J., Yang P. L., Gray N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // *Nature Reviews Cancer*. 2009. Vol. 9. №. 1. P.

28–39.

19. Knight Z. A., Shokat K. M. Features of selective kinase inhibitors // *Chemistry & biology*. 2005. Vol. 12. №. 6. P. 621-637.

20. Yung-Chi C., Prusoff W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction // *Biochemical pharmacology*. 1973. Vol. 22. №. 23. P. 3099-3108.

21. Garuti L., Roberti M., Bottegoni G. Non-ATP competitive protein kinase inhibitors // *Current medicinal chemistry*. 2010. Vol. 17. №. 25. P. 2804-2821.

22. Tummino P. J., Copeland R. A. Residence time of receptor–ligand complexes and its effect on biological function // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47. №. 20. P. 5481-5492.

23. Bradshaw J. M. et al. Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors // *Nature chemical biology*. 2015. Vol. 11. №. 7. P. 525–531.

24. Copeland R. A. The drug–target residence time model: a 10-year retrospective // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016. Vol. 15. №. 2. P. 87–95.

25. Arteaga CL. Molecular therapeutics: Is one promiscuous drug against multiple targets better than combinations of molecule-specific drugs // *Clin Cancer Res* 2003. Vol. 9. №. 4. P. 1231–1232.

26. Faivre S., Djelloul S., Raymond E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors // *Seminars in oncology*. Elsevier, 2006. Vol. 33. №. 4. P. 407-420.

27. de Jonge M. J. A., Verweij J. Multiple targeted tyrosine kinase inhibition in the clinic: all for one or one for all? // *European Journal of Cancer*. 2006. Vol. 42. №. 10. P. 1351-1356.

28. Van Etten R. A. Pathogenesis and treatment of Ph⁺ leukemia: recent insights from mouse models // *Current opinion in hematology*. 2001. Vol. 8. №. 4. P. 224-230.
29. Druker B. J. Imatinib: paradigm or anomaly? // *Cell Cycle*. 2004. Vol. 3. №. 7. P. 833-835.
30. Weinstein I. B., Joe A. K. Mechanisms of disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy // *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2006. Vol. 3. №. 8. P. 448–457.
31. Sharma S. V., Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy // *Genes & development*. 2007. Vol. 21. №. 24. P. 3214-3231.
32. Comoglio P. M., Giordano S., Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience // *Nature reviews Drug discovery*. 2008. Vol. 7. №. 6. P. 504–516.
33. Daub H., Specht K., Ullrich A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors // *Nature reviews drug discovery*. 2004. Vol. 3. №. 12. P. 1001–1010.
34. Engelman J. A., Jänne P. A. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non–small cell lung cancer // *Clinical Cancer Research*. 2008. Vol. 14. №. 10. P. 2895-2899.
35. D’Amato V. et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer // *Cancer treatment reviews*. 2015. Vol. 41. №. 10. P. 877-883.
36. Fojo T. Multiple paths to a drug resistance phenotype: mutations, translocations, deletions and amplification of coding genes or promoter regions, epigenetic changes and microRNAs // *Drug resistance updates*. 2007. Vol. 10. №. 1-2. P. 59-67.

37. Duesberg P., Stindl R., Hehlmann R. Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: chromosome reassortments catalyzed by aneuploidy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. Vol. 98. №. 20. P. 11283-11288.
38. Duesberg P. et al. Cancer drug resistance: the central role of the karyotype // *Drug Resistance Updates*. 2007. Vol. 10. №. 1-2. P. 51-58.
39. Kerkelä R. et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate // *Nature medicine*. 2006. Vol. 12. №. 8. P. 908–916.
40. Berman E. et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate // *New England Journal of Medicine*. 2006. Vol. 354. №. 19. P. 2006-2013.
41. Bianchini D. et al. Epidermal growth factor receptor inhibitor–related skin toxicity: mechanisms, treatment, and its potential role as a predictive marker // *Clinical colorectal cancer*. 2008. Vol. 7. №. 1. P. 33-43.
42. Robert C. et al. Dermatologic symptoms associated with the multikinase inhibitor sorafenib // *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009. Vol. 60. №. 2. P. 299-305.
43. Barrick C. J. et al. Chronic pharmacologic inhibition of EGFR leads to cardiac dysfunction in C57BL/6J mice // *Toxicology and applied pharmacology*. 2008. Vol. 228. №. 3. P. 315-325.
44. Force T., Krause D. S., Van Etten R. A. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition // *Nature Reviews Cancer*. 2007. Vol. 7. №. 5. P. 332–344.
45. Crouthamel M. C. et al. Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia // *Clinical Cancer Research*. 2009. Vol. 15. №. 1. P. 217-225.
46. de Klein A. et al. A cellular oncogene is translocated to the

Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia // Nature. 1982. Vol. 300. №. 5894. P. 765–767.

47. Kantarjian H. et al. Very long- term follow- up results of imatinib mesylate therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon alpha therapy // Cancer. 2012. Vol. 118. №. 12. P. 3116-3122.

48. Quintás-Cardama A., Kantarjian H., Cortes J. Flying under the radar: the new wave of BCR–ABL inhibitors // Nature Reviews Drug Discovery. 2007. Vol. 6. №. 10. P. 834–848.

49. Morphy R. Selectively nonselective kinase inhibition: striking the right balance // Journal of medicinal chemistry. 2009. Vol. 53. №. 4. P. 1413-1437.

50. Keller-von Amsberg G., Koschmieder S. Profile of bosutinib and its clinical potential in the treatment of chronic myeloid leukemia // OncoTargets and therapy. 2013. Vol. 6. P. 99–106.

51. Mauro MJ. T315I, more or less, predicts for major molecular response: The devil is in the details // Haematologica. 2013. Vol. 98. №. 5. P. 665–666.

52. Parsons S. J., Parsons J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction // Oncogene. 2004. Vol. 23. №. 48. P. 7906–7909.

53. Nam H. J. et al. Antitumor activity of saracatinib (AZD0530), a c-Src/Abl kinase inhibitor, alone or in combination with chemotherapeutic agents in gastric cancer // Molecular cancer therapeutics. 2013. Vol. 12. №. 1. P. 16-26.

54. Nygaard H. B. et al. A phase Ib multiple ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease // Alzheimer's research & therapy. 2015. Vol. 7. №. 1. P. 35.

55. Zhang S., Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph // Trends in pharmacological sciences. 2012. Vol. 33. №. 3. P. 122-128.
56. Noren N. K. et al. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl–Crk pathway // Nature cell biology. 2006. Vol. 8. №. 8. P. 815–825.
57. Fraser C. et al. Rapid discovery and structure–activity relationships of pyrazolopyrimidines that potently suppress breast cancer cell growth via SRC kinase inhibition with exceptional selectivity over ABL kinase // Journal of medicinal chemistry. 2016. Vol. 59. №. 10. P. 4697-4710.
58. Baselga J., Swain S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 // Nature Reviews Cancer. 2009. Vol. 9. №. 7. P. 463–475.
59. Lynch T. J. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–small-cell lung cancer to gefitinib // New England Journal of Medicine. 2004. Vol. 350. №. 21. P. 2129-2139.
60. Burotto M. et al. Gefitinib and erlotinib in metastatic non-small cell lung cancer: a meta-analysis of toxicity and efficacy of randomized clinical trials // The oncologist. 2015. Vol. 20. №. 4. P. 400-410.
61. Moy B, Kirkpatrick P, Kar S, Goss P. Lapatinib // Nat Rev Drug Discovery. 2007. Vol. 6. №. 6. P. 431–432.
62. Tan C. S., Gilligan D., Pacey S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer // The Lancet Oncology. 2015. Vol. 16. №. 9. P. e447-e459.
63. Krop I. E. Lessons from breast cancer trials of HER2-kinase inhibitors // The Lancet Oncology. 2016. Vol. 17. №. 3. P. 267-268.

64. Nagasawa J. et al. Novel HER2 selective tyrosine kinase inhibitor, TAK-165, inhibits bladder, kidney and androgen-independent prostate cancer in vitro and in vivo // *International journal of urology*. 2006. Vol. 13. №. 5. P. 587-592.
65. Cheng H., Nair S. K., Murray B. W. Recent progress on third generation covalent EGFR inhibitors // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016. Vol. 26. №. 8. P. 1861-1868.
66. Sanderson K. Irreversible kinase inhibitors gain traction // *Nat Rev Drug Discov*. 2013. Vol. 12. №. 9. P. 649–651.
67. Singh J. et al. The resurgence of covalent drugs // *Nature reviews Drug discovery*. 2011. Vol. 10. №. 4. P. 307–317.
68. Solca F. et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012. Vol. 343. №. 2. P. 342-350.
69. Hsieh A. C., Moasser M. M. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3 // *British journal of cancer*. 2007. Vol. 97. №. 4. P. 453–457.
70. Greig S. L. Osimertinib: first global approval // *Drugs*. 2016. Vol. 76. №. 2. P. 263-273.
71. Minguet J., Smith K. H., Bramlage P. Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer—Recent advances and future perspectives // *International journal of cancer*. 2016. Vol. 138. №. 11. P. 2549-2561.
72. Jackson A. L. et al. Targeting angiogenesis: vascular endothelial growth factor and related signaling pathways // *Translational Cancer Research*. 2015. Vol. 4. №. 1. P. 70-83.
73. Heldin C. H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor

treatment // *Cell Communication and Signaling*. 2013. Vol. 11. №. 1. P. 97.

74. García- Echeverría C., Traxler P., Evans D. B. ATP site- directed competitive and irreversible inhibitors of protein kinases // *Medicinal research reviews*. 2000. Vol. 20. №. 1. P. 28-57.

75. MacKenzie B. A. et al. Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis // *Respiratory research*. 2015. Vol. 16. №. 1. P. 83

76. Pàez-Ribes M. et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis // *Cancer cell*. 2009. Vol. 15. №. 3. P. 220-231.

77. Ebos J. M. L. et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis // *Cancer cell*. 2009. Vol. 15. №. 3. P. 232-239.

78. Sennino B., McDonald D. M. Controlling escape from angiogenesis inhibitors // *Nature Reviews Cancer*. 2012. Vol. 12. №. 10. P. 699–709.

79. Small D. FLT3 mutations: biology and treatment // *ASH Education Program Book*. 2006. Vol. 2006. №. 1. P. 178-184.

80. Zorn J. A. et al. Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor quizartinib (AC220) // *PloS one*. 2015. Vol. 10. №. 4. P. e0121177.

81. Zarrinkar P. P. et al. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML) // *Blood*. 2009. Vol. 114. №. 14. P. 2984-2992.

82. Smith C. C. et al. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. Vol. 111. №. 14. P. 5319-5324.

83. Zhao Z. et al. Exploration of type II binding mode: a privileged approach for kinase inhibitor focused drug discovery? // ACS chemical biology. 2014. Vol. 9. – №. 6. P. 1230-1241.

84. Lennartsson J., Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications // Physiological reviews. 2012. Vol. 92. №. 4. P. 1619-1649.

85. Nishida T., Doi T., Naito Y. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors // Expert opinion on pharmacotherapy. 2014. Vol. 15. №. 14. P. 1979-1989.

86. Ustun C. et al. Chemotherapy and dasatinib induce long-term hematologic and molecular remission in systemic mastocytosis with acute myeloid leukemia with KITD816V // Leukemia research. 2009. Vol. 33. №. 5. P. 735-741.

87. Zhu Y. et al. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models // Cancer research. 2014. Vol. 74. №. 18. P. 5057-5069.

88. Hallinan N. et al. Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer // Cancer treatment reviews. 2016. Vol. 46. P. 51-62.

89. Sohl C. D. et al. Illuminating the molecular mechanisms of tyrosine kinase inhibitor resistance for the FGFR1 gatekeeper mutation: the Achilles' heel of targeted therapy // ACS chemical biology. 2015. Vol. 10. №. 5. P. 1319-1329.

90. Bean J. et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007. Vol. 104. №. 52. P. 20932-20937.

91. Di Renzo M. F. et al. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer //79

Clinical Cancer Research. 1995. Vol. 1. №. 2. P. 147-154.

92. Yakes F. M. et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth // Molecular cancer therapeutics. 2011. Vol. 10. №. 12. P. 2298-2308.

93. Peters S., Adjei A. A. MET: a promising anticancer therapeutic target // Nature reviews Clinical oncology. 2012. Vol. 9. №. 6. P. 314–326.

94. Duchemann B, Friboulet L, Besse B. Therapeutic management of ALK+ nonsmall cell lung cancer patients. // Eur Respir J. 2015. Vol. 46. №. 1. P. 230–242.

95. Gambacorti Passerini C. et al. Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase–positive lymphoma patients // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2014. Vol. 106. №. 2.

96. Choi Y. L. et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors // New England Journal of Medicine. 2010. Vol. 363. №. 18. P. 1734-1739.

97. Fontana D. et al. Activity of second- generation ALK inhibitors against crizotinib- resistant mutants in an NPM- ALK model compared to EML4- ALK // Cancer medicine. 2015. Vol. 4. №. 7. P. 953-965.

98. Zhang I. et al. Targeting brain metastases in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer // The Lancet Oncology. 2015. Vol. 16. №. 13. P. e510-e521.

99. Johnson T. W. et al. Discovery of (10 R)-7-Amino-12-fluoro-2, 10, 16-trimethyl-15-oxo-10, 15, 16, 17-tetrahydro-2H-8, 4-(metheno) pyrazolo [4, 3-h][2, 5, 11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros oncogene 1 (ROS1) with preclinical brain exposure and broad-spectrum potency against ALK-resistant mutations // Journal of medicinal chemistry. 2014. Vol. 57. №. 11. P. 4720-4744.

100. Ryan P. D., Goss P. E. The emerging role of the insulin-like growth factor pathway as a therapeutic target in cancer // *The oncologist*. 2008. Vol. 13. №. 1. P. 16-24.
101. Pillai R. N., Ramalingam S. S. Inhibition of insulin-like growth factor receptor: end of a targeted therapy // *Translational lung cancer research*. 2013. Vol. 2. №. 1. P. 14–22.
102. Gombos A. et al. Clinical development of insulin-like growth factor receptor—1 (IGF-1R) inhibitors: At the crossroad? // *Investigational new drugs*. 2012. Vol. 30. №. 6. P. 2433-2442.
103. Vaishnavi A., Le A. T., Doebele R. C. TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy // *Cancer discovery*. 2015. Vol. 5. №. 1. P. 25-34.
104. Thiele C. J., Li Z., McKee A. E. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology // *Clinical cancer research*. 2009. Vol. 15. №. 19. P. 5962-5967.
105. Ardini E. et al. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications // *Molecular cancer therapeutics*. 2016. Vol. 15. №. 4. P. 628-639.
106. Graham D. K. et al. The TAM family: phosphatidylserine-sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer // *Nature reviews Cancer*. 2014. Vol. 14. №. 12. P. 769–785.
107. Myers SH, Brunton VG, Unciti-Broceta A. AXL inhibitors in cancer: A medicinal chemistry perspective. // *J Med Chem*. 2016. Vol. 59. №. 8. P. 3593–3608.
108. Mori M. et al. ASP2215, a novel FLT3/AXL inhibitor: Preclinical evaluation in acute myeloid leukemia (AML). – 2014. // *J Clin Oncol*. 2014. Vol. 32
109. Mulligan L. M. RET revisited: expanding the oncogenic

portfolio // Nature Reviews Cancer. 2014. Vol. 14. №. 3. P. 173–186.

110. Drilon A. et al. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas // Cancer discovery. 2013. Vol. 3. №. 6. P. 630-635.

111. Gautschi O. et al. A patient with lung adenocarcinoma and RET fusion treated with vandetanib // Journal of Thoracic Oncology. 2013. Vol. 8. №. 5. P. e43-e44.

112. Krajewska J., Kukulska A., Jarzab B. Efficacy of lenvatinib in treating thyroid cancer // Expert opinion on pharmacotherapy. 2016. Vol. 17. №. 12. P. 1683-1691.

113. Krajewska J., Olczyk T., Jarzab B. Cabozantinib for the treatment of progressive metastatic medullary thyroid cancer // Expert review of clinical pharmacology. 2016. Vol. 9. №. 1. P. 69-79.

114. Hayman S. R. et al. VEGF inhibition, hypertension, and renal toxicity // Current oncology reports. 2012. Vol. 14. №. 4. P. 285-294.

115. Jordan A. M. et al. Anilinoquinazoline inhibitors of the RET kinase domain—Elaboration of the 7-position // Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2016. Vol. 26. №. 11. P. 2724-2729.

116. Song M. Progress in discovery of KIF5B-RET kinase inhibitors for the treatment of non-small-cell lung cancer // J. Med. Chem. 2015. Vol. 58. №. 9. P. 3672-3681.

117. Drabsch Y., Ten Dijke P. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis // Cancer and Metastasis Reviews. 2012. Vol. 31. №. 3-4. P. 553-568.

118. Zhou L. et al. Reduced SMAD7 leads to overactivation of TGF- β signaling in MDS that can be reversed by a specific inhibitor of TGF- β receptor I kinase // Cancer research. 2011. Vol. 71. №. 3. P. 955-963.

119. Akhurst R. J., Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in

disease // Nature reviews Drug discovery. 2012. Vol. 11. №. 10. P. 790–811.

120. Quintás-Cardama A. et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond // Nature reviews Drug discovery. 2011. Vol. 10. №. 2. P. 127–140.

121. Quintás-Cardama A. et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms // Blood. 2010. Vol. 115. №. 15. P. 3109-3117.

122. Mascarenhas J., Hoffman R. A comprehensive review and analysis of the effect of ruxolitinib therapy on the survival of patients with myelofibrosis // Blood. 2013. Vol. 121. №. 24. P. 4832-4837.

123. Kalota A, Jeschke GR, Carroll M, Hexner EO. Intrinsic resistance to JAK2 inhibition in myelofibrosis. // Clin Cancer Res. 2013. Vol. 19. №. 7. P. 1729–1739.

124. Sonbol M. B. et al. Comprehensive review of JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms // Therapeutic advances in hematology. 2013. Vol. 4. №. 1. P. 15-35.

125. Alinari L., Quinion C., Blum K. A. Bruton's tyrosine kinase inhibitors in B- cell non- Hodgkin's lymphomas // Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2015. Vol. 97. №. 5. P. 469-477.

126. Kawakami Y. et al. Terreic acid, a quinone epoxide inhibitor of Bruton's tyrosine kinase // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999. Vol. 96. №. 5. P. 2227-2232.

127. Mahajan S. et al. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [α -cyano- β -hydroxy- β -methyl-N-(2, 5-dibromophenyl) propenamide] // Journal of Biological Chemistry. 1999. Vol. 274. №. 14. P. 9587-9599.

128. Pan Z. et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase // *ChemMedChem*. 2007. Vol. 2. №. 1. P. 58-61.
129. Honigberg L. A. et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. Vol. 107. №. 29. P. 13075-13080.
130. Lee B. Y. et al. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics // *Pharmacology & therapeutics*. 2015. Vol. 146. P. 132-149.
131. Yoon H. et al. Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2015. Vol. 63. №. 2. P. 114-128.
132. Sulzmaier F. J., Jean C., Schlaepfer D. D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications // *Nature reviews Cancer*. 2014. Vol. 14. №. 9. P. 598–610.
133. Iwatani M. et al. Discovery and characterization of novel allosteric FAK inhibitors // *European journal of medicinal chemistry*. 2013. Vol. 61. P. 49-60.
134. Geahlen R. L. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target // *Trends in pharmacological sciences*. 2014. Vol. 35. №. 8. P. 414-422.
135. Seda V., Mraz M. B- cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells // *European journal of haematology*. 2015. Vol. 94. №. 3. P. 193-205.
136. Lucas M. C., Tan S. L. Small-molecule inhibitors of spleen tyrosine kinase as therapeutic agents for immune disorders: will promise meet expectations? // *Future medicinal chemistry*. 2014. Vol. 6. №. 16. P. 1811-1827.
137. McAdoo SP, Tam FWK, Pandian R, Bolos J, Castaner R.

Fostamatinib disodium: Tyrosineprotein kinase SYK/FLT3 inhibitor treatment of rheumatoid arthritis oncolytic // *Drugs Future*. 2011. Vol. 36. №. 4. P. 273–280.

138. Coffey G. et al. The novel kinase inhibitor PRT062070 (Cerdulatinib) demonstrates efficacy in models of autoimmunity and B-cell cancer // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2014. Vol. 351. №. 3. P. 538-548.

139. Bjornsti M. A., Houghton P. J. Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer // *Cancer cell*. 2004. Vol. 5. №. 6. P. 519-523.

140. Faivre S., Kroemer G., Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents // *Nature reviews Drug discovery*. 2006. Vol. 5. №. 8. P. 671–688.

141. Thomas G. V. et al. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer // *Nature medicine*. 2006. Vol. 12. №. 1. P. 122–127.

142. Bjornsti M. A., Houghton P. J. The TOR pathway: a target for cancer therapy // *Nature Reviews Cancer*. 2004. Vol. 4. №. 5. P. 335–348.

143. Raimondo L. et al. Everolimus induces Met inactivation by disrupting the FKBP12/Met complex // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. №. 26. P. 40073–40084.

144. Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer // *The Journal of clinical investigation*. 2008. Vol. 118. №. 9. P. 3003-3006.

145. Workman P. et al. Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic // *Cancer research*. 2010. Vol. 70. №. 6. P. 2146-2157.

146. Thorpe L. M., Yuzugullu H., Zhao J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting //

Nature Reviews Cancer. 2015. Vol. 15. №. 1. P. 7–24.

147. Workman P., van Montfort R. L. M. Unveiling the secrets of the ancestral PI3 kinase Vps34 // Cancer cell. 2010. Vol. 17. №. 5. P. 421-423.

148. Ikeda H. et al. PI3K/p110 δ is a novel therapeutic target in multiple myeloma // Blood. 2010. Vol. 116. №. 9. P. 1460-1468.

149. Ali K. et al. Inactivation of PI (3) K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer // Nature. 2014. Vol. 510. №. 7505. P. 407–411.

150. Utermark T. et al. The p110 α and p110 β isoforms of PI3K play divergent roles in mammary gland development and tumorigenesis // Genes & development. 2012. Vol. 26. №. 14. P. 1573-1586.

151. Busaidy N. L. et al. Management of metabolic effects associated with anticancer agents targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway // Journal of Clinical Oncology. 2012. Vol. 30. №. 23. P. 2919–2928.

152. Collins I. Targeted small-molecule inhibitors of protein kinase B as anticancer agents // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents). 2009. Vol. 9. №. 1. P. 32-50.

153. Kondapaka S. B. et al. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation // Molecular cancer therapeutics. 2003. Vol. 2. №. 11. P. 1093-1103.

154. Cho D. C. et al. A phase II trial of perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC) who have failed tyrosine kinase inhibitors (TKI) // Journal of Clinical Oncology. 2009. Vol. 27. №. 15_suppl. P. 5101-5101.

155. Barnett S. F. et al. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors // Biochemical Journal. 2005. Vol. 385. №. 2. P. 399-408.

156. Wu W. I. et al. Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition // PloS one. 2010. Vol. 5. №. 9. P. e12913.