

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ»

УДК 547.853+544.165

ФАРИНА  
АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ, СОДЕРЖАЩИХ  
4-МЕТИЛБЕНЗАМИД В КАЧЕСТВЕ ЛИНКЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2021

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

- Научный руководитель:** **Калиниченко Елена Николаевна**,  
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор химических наук, зам. директора Института биоорганической химии НАН Беларуси по научной и инновационной работе – начальник НПЦ «ХимФармСинтез»
- Официальные оппоненты:** **Книжников Валерий Алексеевич**,  
доктор химических наук, заведующий лабораторией производных аминокислот Института физико-органической химии НАН Беларуси
- Диченко Ярослав Владимирович**,  
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси
- Оппонирующая организация:** Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится «10» марта 2021 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Ученого Совета, e-mail: tbozhok@iboch.by, тел. +375 (17) 3979612.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «9» февраля 2021 г.

Ученый секретарь

Совета по защите диссертаций Д 01.21.01  
кандидат химических наук



Т.С. Божок

## ВВЕДЕНИЕ

Значительную часть современной таргетной противоопухолевой терапии составляют низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ (НИП). Биологическая функция протеинкиназ, заключающаяся в фосфорилировании остатков аминокислот, имеющих гидроксильные группы (серин, треонин и тирозин) или гетероциклические аминогруппы гистидина, является важным звеном клеточной сигнальной системы. В то же время раковые клетки часто характеризуются высокой и нерегулируемой киназной активностью, что приводит к неконтролируемому росту опухолевой ткани. Ингибируя избыточную биологическую активность данных ферментов, можно существенно замедлить развитие заболевания. Первый киназный ингибитор иматиниб был зарегистрирован в 2001 году для лечения хронического миелогенного лейкоза. В настоящее время число терапевтических НИП составляет почти полсотни, а спектр их использования включает, помимо целого ряда онкологических заболеваний, болезни, не связанные с раком (ревматоидный артрит, тромбоцитопения и др.).

Несмотря на значительные успехи в лечении рака, ингибиторы протеинкиназ во многих случаях все еще не обеспечивают стабильного положительного прогноза для пациента. Основной проблемой являются различные виды резистентности, обусловленные мутациями первичной мишени или изменением профиля киназной гиперактивности в процессе развития заболевания. Ожидается, что более селективные и/или мультитаргетные препараты могут существенно повысить терапевтическую эффективность ингибиторов протеинкиназ.

Таким образом, поиск новых киназных мишеней и соединений, способных их ингибировать с заданной селективностью, является актуальной задачей научных исследований, для решения которой может быть использован целый ряд методов, включающих классический и виртуальный скрининг, фармакофорный анализ, направленные модификации химических структур и установление зависимостей «структура-свойства», исследование комплексов белок-лиганд методами молекулярной динамики.

В диссертационной работе использован комплексный подход к рациональному конструированию новых НИП, включающий методы молекулярного докинга и молекулярной динамики. Идентифицированы перспективные классы химических соединений, осуществлен их синтез. Тестирование *in vitro* позволило выявить ряд соединений, способных ингибировать некоторые онкозначимые протеинкиназы и селективно блокировать рост опухолевых клеток. В рамках диссертационного исследования разработан препаративный метод получения иматиниба, предприняты попытки увеличения его ингибирующей активности путем химической дериватизации.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. раздел 2 «Биологические, химические, медицинские и фармацевтические технологии и производства», подраздел «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства».

Диссертационная работа является частью плановых исследований научно-производственного центра «ХимФармСинтез» Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в рамках ГПНИ «Химические технологии и материалы» (2016-2020 гг.), подпрограмма «Фармакология и фармация», задание 5.20 «Синтез и изучение биологических свойств структурных аналогов фолиевой кислоты, модифицированных по птеридиновому и L-глутаминовому фрагментам, в качестве ингибиторов роста опухолевых клеток» (2018-2020 гг., № ГР 20192257); ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма 2 «Биологически активные вещества» (2016-2018 гг.), задание 2.18 «Разработка химических методов синтеза биологически значимых, пуриновых и пиримидиновых нуклеозидных рибо- и 2'-дезоксид-аналогов, модифицированных в гетероциклическом основании, в качестве ингибиторов/модуляторов ферментативных процессов клеточного метаболизма» (2016-2018 гг., № ГР 20161999), Государственной программы по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных и диагностических средств в Республике Беларусь на 2010-2014 гг. и на период до 2020 г., подпрограмма «Фармсубстанции и готовые лекарственные средства», задание Ф11 «Разработать опытно-промышленную технологию производства фармацевтической субстанции противолейкемического (противоопухолевого) препарата Иматиниб и внедрить ее на опытно-экспериментальном участке ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (2010-2012 гг., № ГР 20103323); Государственной программы развития фармацевтической промышленности Республики Беларусь на 2016-2020 гг., подпрограмма 1 «Разработка и производство новых лекарственных средств», задание 80 «Разработать опытно-промышленную технологию производства фармацевтической субстанции противоопухолевого лекарственного средства Нилотиниб и внедрить ее на НПЦ «ХимФармСинтез» ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (2016-2020 гг., № ГР 20163623).

### Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы – с использованием методов направленного фармакофорного дизайна, оценки ингибирующей активности *in silico* и химической дериватизации осуществить поиск новых химических соединений, способных ингибировать протеинкиназы; идентифицировать и синтезировать молекулы,

перспективные для разработки низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ (НИП), а также исследовать их биологическую активность.

Обозначенная цель требовала решения следующих задач:

1. Создать виртуальные библиотеки ранее неизвестных структур, обладающих фармакофорным сходством с известными ингибиторами, и оценить их ингибирующую активность в отношении протеинкиназ методами молекулярного докинга и молекулярной динамики.

2. Усовершенствовать метод синтеза третичных аминов, включая получение производных 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]бензойной кислоты, с целью улучшения метода синтеза иматиниба и получения его аналогов.

3. Осуществить синтез соединений с предсказанной ингибирующей активностью, исследовать их биологические свойства *in vitro*, изучить взаимосвязи между их структурой и активностью.

**Объект исследования** – аналоги иматиниба и нилотиниба, содержащие в качестве линкера пиррольный либо 4-метилбензамидный фрагменты.

**Предмет исследования** – рациональный дизайн новых биологически активных соединений; комбинаторный подход молекулярного докинга для идентификации новых ингибиторов протеинкиназ; методы синтеза новых производных 4-метилбензамида, иматиниба и его структурных аналогов.

### **Научная новизна**

С использованием направленного дизайна созданы виртуальные библиотеки ранее неизвестных структур производных пиррола и производных 4-метилбензамида, обладающие высоким фармакофорным сходством с известными ингибиторами протеинкиназ 2-го типа. В условиях *in silico* экспериментов молекулярного докинга и молекулярной динамики на основании докинг-оценок и значений расчетной энергии связывания установлено наличие потенциальной противоопухолевой активности у данных классов соединений.

Усовершенствована препаративная технология получения фармацевтической субстанции иматиниба и его ключевого интермедиата - 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]бензойной кислоты.

Синтезированы новые структурные аналоги иматиниба, селективного ингибитора Bcr-Abl тирозинкиназы. Изучена их биологическая активность *in vitro* на клеточных линиях ряда опухолевых заболеваний.

Синтезированы новые производные 4-метилбензамида, ингибирующая активность которых была предсказана методами *in silico*. Методами тестирования *in vitro* установлено наличие антипролиферативной и противокиназной активности для этих соединений. При помощи методов компьютерного моделирования показана возможность их благоприятного размещения в активном центре протеинкиназ с

возможностью образования водородных связей с ключевыми аминокислотными остатками активного центра ферментов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Идентификация новых потенциальных ингибиторов протеинкиназ на основе структур, содержащих пиррольный или 4-метилбензамидный фрагмент, методами направленного фармакофорного дизайна, молекулярного докинга и молекулярной динамики.

2. Оригинальный способ получения иматиниба и его ключевого интермедиата, 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]бензойной кислоты, с использованием улучшенного метода восстановительного аминирования, который позволяет снизить температуру реакции, исключить взрывоопасные растворители и увеличить выходы.

3. Получение новых структурных аналогов иматиниба и исследование их антипролиферативной активности *in vitro* в отношении опухолевых клеточных линий.

4. Получение новых многоцелевых ингибиторов протеинкиназ, содержащих в качестве линкера 4-метилбензамид, ингибирующие свойства которых предсказаны методами молекулярного моделирования.

5. Обнаружение антипролиферативной активности в отношении опухолевых клеточных линий, а также ингибирующей активности в отношении онкозначимых протеинкиназ у ряда ранее неизвестных производных 4-метилбензамида и установление возможного механизма их противоопухолевого действия методами молекулярного моделирования.

**Личный вклад соискателя ученой степени** заключается в постановке цели и задач исследования; поиске, систематизации и анализе научной и патентной литературы по теме диссертации; дизайне и создании виртуальных библиотек структур; постановке и проведении экспериментов молекулярного докинга и молекулярной динамики; разработке синтетических методик; проведении экспериментальной части работы; анализе и интерпретации полученных результатов. Постановка цели исследования, интерпретация результатов, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялись совместно с чл.-корр. НАН Беларуси, д.х.н. Е. Н. Калиниченко. Соавторы работ, представленных в списке публикаций соискателя, участвовали в проведении отдельных химических и биологических экспериментов. Исследование биологической активности полученных соединений проводилось н.с. НПЦ «ХимФармСинтез» О. В. Авдошко и А. В. Белько. Спектры  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР получены в лаборатории физико-химических методов исследования д.х.н. А. В. Барановским. Запись масс-спектров высокого разрешения выполнена к.х.н. А. В. Янцевичем.

**Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.** Результаты работы представлены на международных и республиканских мероприятиях: Drug Discovery Conference (Riga, Latvia, 2015), Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Республика Беларусь, 2018),

Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, Республика Беларусь, 2014, 2019).

**Опубликование результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ: 6 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе 4 – в иностранных научных изданиях; 7 тезисов докладов и 2 патента Республики Беларусь. Общий объём опубликованных работ составил 7,0 авторских листов (из них 4,5 авторских листа – статьи в рецензируемых журналах).

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, библиографического списка. В первой главе приводится обзор литературных данных о роли низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ в современной терапии рака, основных проблемах и ограничениях их медицинского применения; методах идентификации новых соединений с потенциальной ингибирующей активностью в отношении протеинкиназ. Вторая глава посвящена обсуждению результатов собственных исследований по дизайну, виртуальному скринингу и молекулярному докингу для идентификации новых ингибиторов протеинкиназ. Третья глава посвящена синтезу новых молекул, исследованию их биологической активности и обсуждению результатов молекулярного моделирования для установления структурно-конформационных особенностей соединений, проявивших высокую ингибирующую активность в отношении ряда рецепторных белков протеинкиназ. Четвертая глава содержит экспериментальные данные, материалы и методы. Диссертация изложена на 127 страницах, содержит 27 рисунков, 5 схем, 11 таблиц. Библиографический список включает 171 ссылку на цитируемую литературу и 15 публикаций соискателя.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### **Глава 1. Низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ (обзор литературы)**

В первой главе приведен обзор литературных данных по текущему статусу низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ в лечении онкогематологических заболеваний: механизм действия, основные мишени, фармакофорные особенности известных ингибиторов и способы их связывания в активном центре киназы, ограничения медицинского использования, актуальные направления научных исследований в области киназных ингибиторов, методы идентификации новых соединений с потенциальной противокиназной активностью, в т.ч. с применением методов *in silico*.

### **Глава 2. Идентификация новых ингибиторов протеинкиназ методами молекулярного докинга и молекулярной динамики**

#### **2.1 Дизайн новых ингибиторов протеинкиназ**

Основываясь на экспериментальных данных по связыванию иматиниба, нилотиниба и их аналогов (рисунок 1) в активном центре протеинкиназ, проведена разработка структур новых потенциальных ингибиторов протеинкиназ с применением комбинационной стратегии биоизостерической замены и конформационного ограничения. В качестве гибкого линкера между структурными фрагментами, ответственными за связывания в АТФ- и аллостерическом участках активного центра неактивной конформации киназы, было предложено использовать пиррольный фрагмент либо 4-метилбензамид.

## 2.2 Идентификация потенциальных ингибиторов протеинкиназ, содержащих пиррольный фрагмент, методом молекулярного докинга

Комбинаторным методом сконструирована библиотека пиррол-содержащих аналогов иматиниба, содержащая различные варианты структурных фрагментов для АТФ-кармана, аллостерического кармана и линкера, всего 50 структур (рисунок 2). Библиотека была изучена методом молекулярного докинга с применением программы Autodock Vina. В качестве рецепторов использовались экспериментальные структуры трех протеинкиназ семейства Abl (PDB коды: 1IEP, 3CS9, 3OY3). Для валидации процедуры докинга и фильтрации полученных результатов использовались структуры известных ингибиторов протеинкиназ: иматиниба, нилотиниба, понатиниба. В случае немутантных Abl-киназ, две структуры А и Б (рисунок 3) продемонстрировали высокие

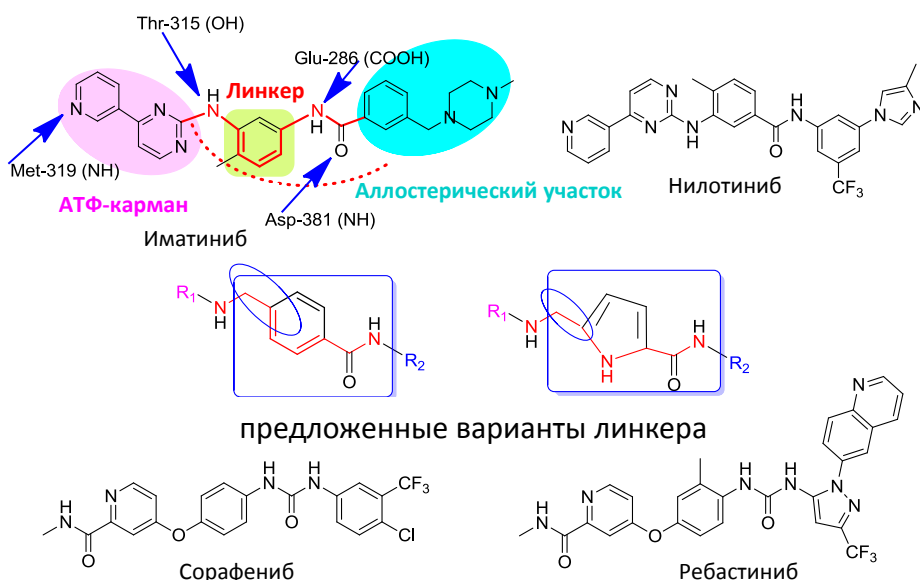


Рисунок 1. – Дизайн целевых соединений на основании фармакофорных особенностей известных ингибиторов

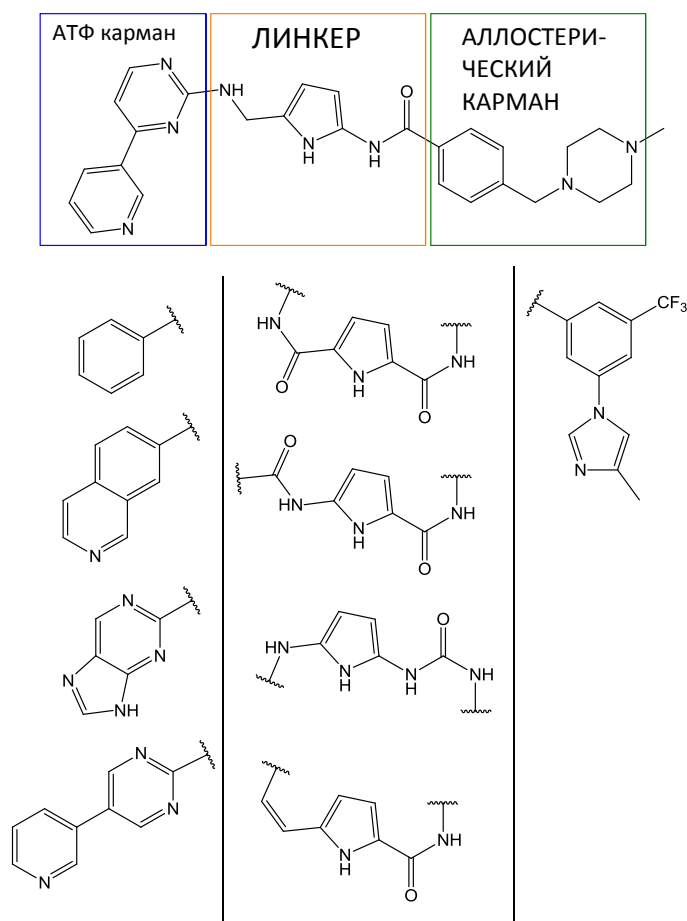


Рисунок 2. – Виртуальная библиотека производных пиррола



докинг-оценки (таблица 1), сравнимые с таковыми для известных ингибиторов, и возможность образования водородных связей с ключевыми аминокислотными остатками Glu-286, Met-318, Asp-281. При этом расположение молекул в активном центре соответствовало исходной логике их дизайна. С учетом полученных результатов структуры **A** и **B** могут представлять интерес как потенциальные ингибиторы протеинкиназ.

Таблица 1. – Оценки эффективности связывания с Abl-киназами, полученные методом докинга для известных ингибиторов и лучших из исследуемых производных пиррола

Структура	Докинг-оценка эффективности связывания, ккал/моль								
	Abl (PDB: 1IEP)			Abl (PDB: 3CS9)			T315-мут. Abl (PDB: 3OY3)		
	н/м*	MMFF* 94s	GAFF*	н/м	MMFF 94s	GAFF	н/м	MMFF 94s	GAFF
Иматиниб	-12,9 **	-12,7	-13,2	-11,9	-11,9	-12,0	-9,4	-8,8	-9,9
Нилотиниб	-13,9	-13,8	-13,7	-14,0	-13,9	-14,0	-12,4	-9,9	-12,3
Понатиниб	-12,5	-12,8	-12,7	-11,3	-11,4	-11,4	-13,1	-13,7	-13,2
<b>A</b>	-13,6	-13,4	-13,6	-12,9	-13,1	-12,9	-12,2	-11,6	-12,0
<b>B</b>	-12,7	-13,0	-13,1	-12,5	-12,7	-12,7	-12,4	-12,2	-11,8

\* - варианты предварительной минимизации структуры лигандов: н/м - исходная неминимизированная структура, полученная при помощи сервиса Molview. MMFF94s и GAFF – минимизация соответствующими силовыми полями.

\*\* - приведены значения для модели связывания с наиболее высокой оценкой. Оценка «Autodock Vina Score» является аппроксимацией энергии связывания (ккал/моль). Меньшее значение говорит о более высоком сродстве лиганда к активному центру ферменту.

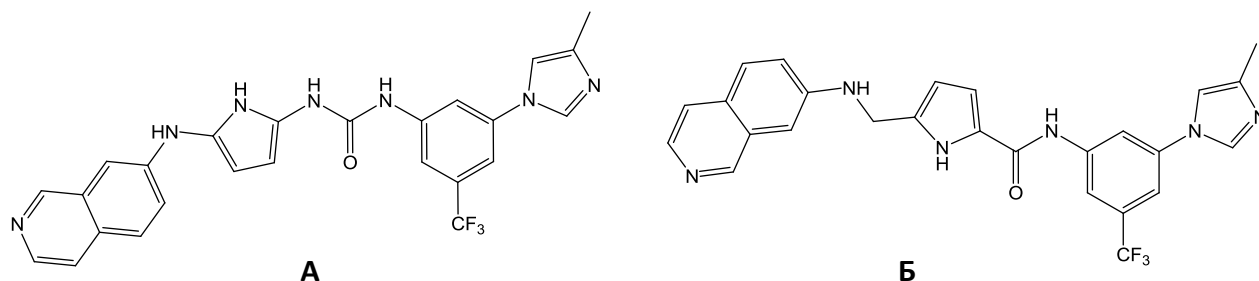


Рисунок 3. - Структуры **A** и **B**

### 2.3 Оценка ингибирующей активности *in silico* производных 4-(аминометил)бензамида с использованием методов молекулярного докинга и молекулярной динамики

Комбинаторным методом была сгенерирована библиотека структур 4-метилбензамида (рисунок 4). На первом этапе проводился сравнительный докинг исследуемых структур и известных ингибиторов. В качестве рецепторов использовались структуры девяти протеинкиназ, полученных из базы данных PDB, и их минимизированные по энергии варианты. Процедура докинга валидировалась с помощью структур известных ингибиторов, минимизированных силовыми полями molconverter, GAFF и MMFF94s. Среднее значение

оценки энергии связывания оригинальных лигандов составило -11,9 ккал/моль для неминимизированных рецепторов и -11,1 ккал/моль для минимизированных рецепторов. Для 144 исследуемых структур в трех различных конформациях, минимизированных силовым полем GAFF, были получены докинг-позы и соответствующие им

докинг-оценки для комплексов с минимизированными и оригинальными структурами рецепторов. Для оригинальных рецепторов число поз с оценкой -11,5 ккал/моль и выше соответствовало 75 конформациям и 50 уникальным структурам; для минимизированных было идентифицировано 28

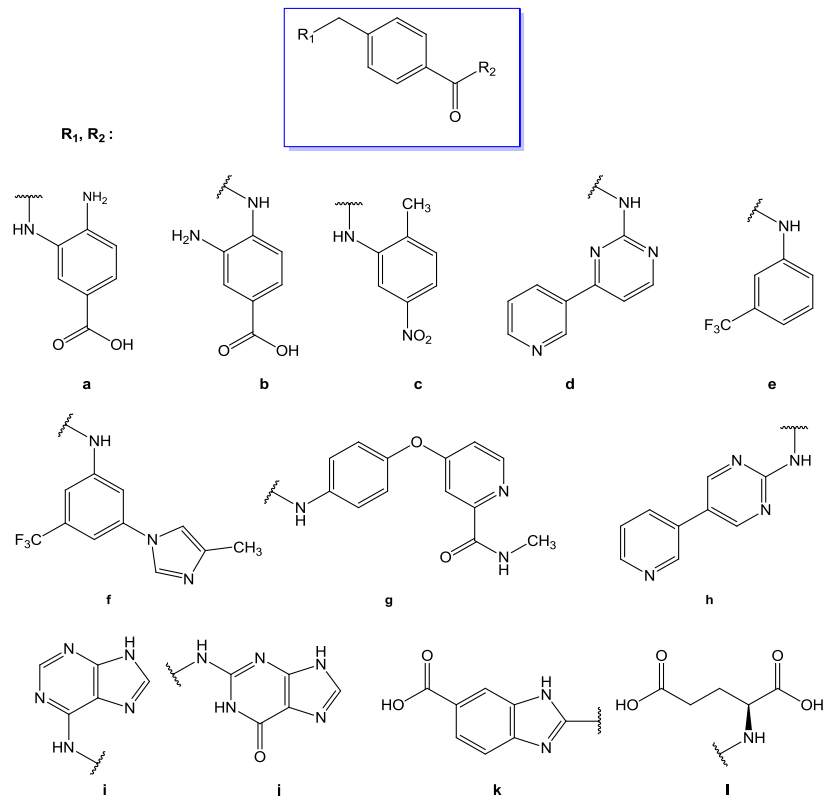


Рисунок 4. – Виртуальная библиотека производных 4-метилбензамида

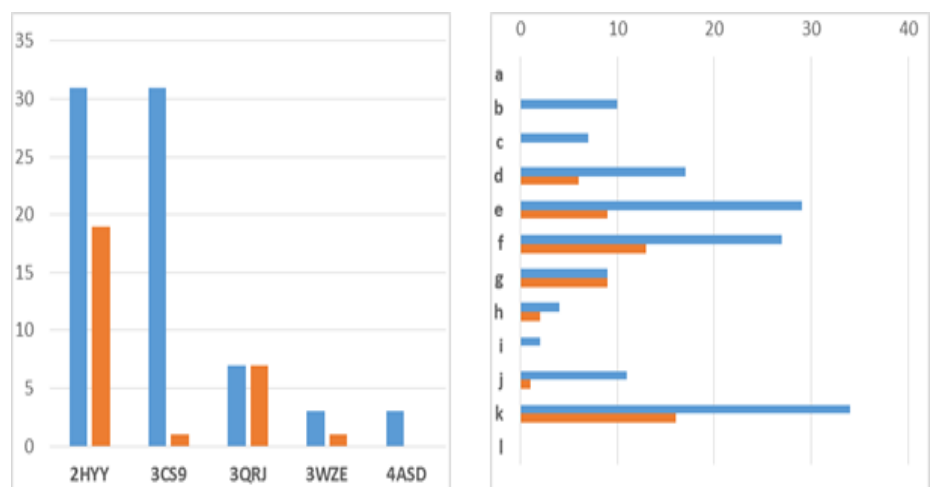
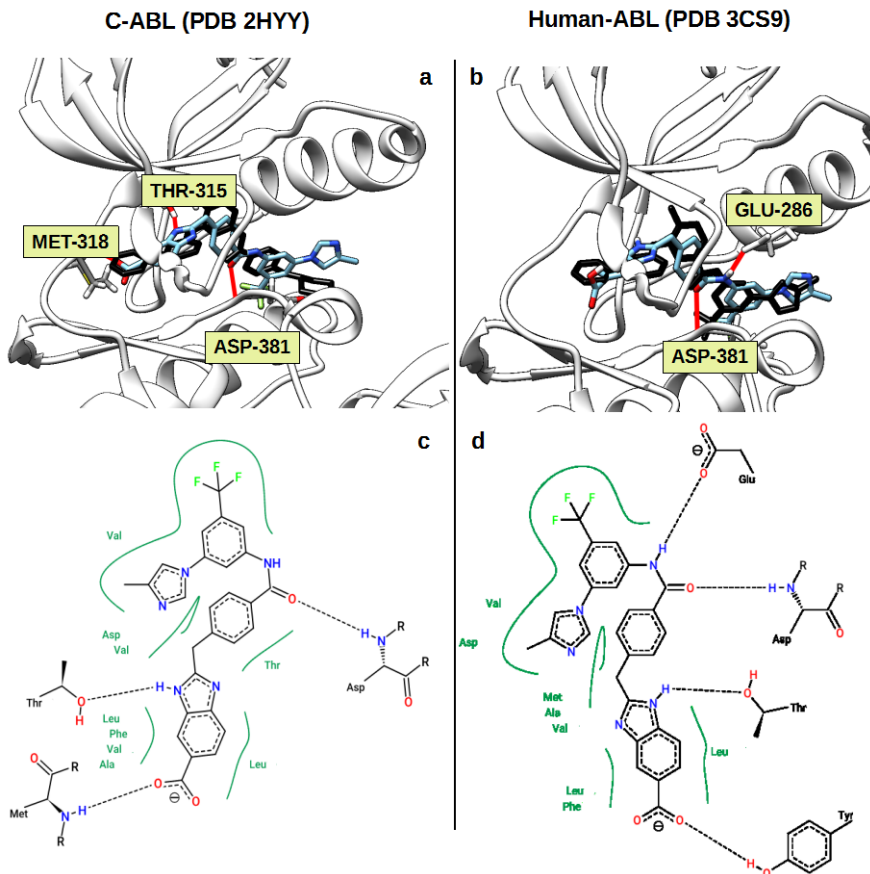


Рисунок 5. – Количество докинг-поз с высокой докинг-оценкой и частота присутствия в них различных структурных фрагментов для минимизированных (оранжевый) и неминимизированных (синий) рецепторов



**Рисунок 6. – Комплексы с Abl-киназами (а,б) и двухмерные карты взаимодействий (с,д) структуры, содержащей фрагменты бензимидазола (к) и 3-(4-метил-1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилина (f)**

оценками связывания -12,6 ккал/моль и -12,3 ккал/моль для рецепторов 2HYU и 3CS9 соответственно и возможностью образования водородных связей с аминокислотными остатками Met-318, Thr-315, Asp-381, Glu-286 и Thr-251 (рисунок 6). Предложенные направленные модификации бензимидазольного фрагмента этой структуры улучшали расчетную энергию связывания (рисунок 7).



**Рисунок 7. – Энергия связывания (кДж/моль) и ее компоненты, рассчитанные для известных ингибиторов (оранжевый цвет), исследуемых структур (синий) и предложенных структурных модификаций (зеленый)**

конформаций (18 уникальных структур) с такими позами. Наиболее распространенными фрагментами для поз с такой оценкой являлись фрагменты бензимидазола **к**, 3-(трифторметил)анилина **е** и 3-(4-метил-1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилина **ф** (рисунок 5).

Для комплексов известных ингибиторов и ряда исследуемых структур была определена энергия связывания методом ММ-РBSA со средними значениями -161,0 кДж/моль и -121,3 кДж/моль, соответственно. Структура, содержащая фрагменты бензимидазола **к** и анилина **ф**, была отмечена как наиболее перспективная с

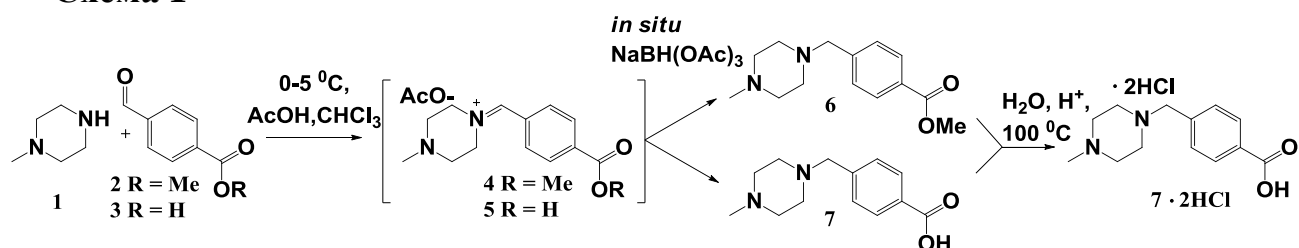
Полученные результаты могут свидетельствовать о наличии у исследуемых производных 4-метилбензамида потенциальной ингибирующей активности в отношении протеинкиназ.

### Глава 3. Синтез, молекулярный докинг и биологическая активность новых ингибиторов протеинкиназ

#### 3.1 Синтез иматиниба и его аналогов; докинг и биологическая активность новых аналогов иматиниба

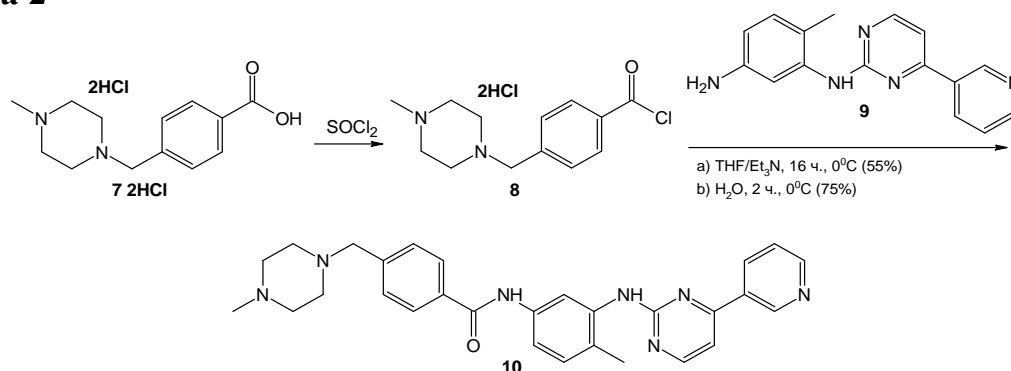
Нами разработан препаративный метод синтеза третичных бензиламинов **6** и **7** восстановительным аминированием 4-формилбензойной кислоты (**2**) или ее метилового эфира **3** 1-метилпиперазином (**1**) (схема 1). Метод характеризуется непродолжительным временем реакции, отсутствием взрывоопасных реагентов и высокой чистотой конечного продукта. Выход соединения **7**, ключевого интермедиата в синтезе иматиниба, полученного в виде дигидрохлорида, составил 97% на две стадии.

Схема 1



Взаимодействие **7** с тионилхлоридом приводило к образованию дигидрохлорида 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]бензоилхлорида (**8**), конденсация которого с коммерчески доступным N-(5-амино-2-метилфенил)-4-(3-пиридил)-2-пиримидинамином (**9**) давала иматиниб (**10**) с выходом 70% (схема 2). Результаты работы вошли в состав двух патентов.

Схема 2

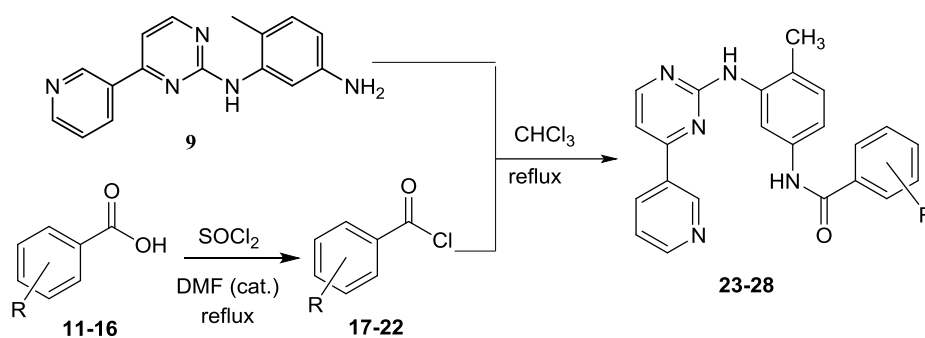


Новые структурные аналоги иматиниба **23-28** были синтезированы с высокими выходами (56-82%) реакцией амина **9** с хлорангидридами производных бензойной кислоты **11-16** (схема 3).

В исследованиях *in vitro* мета-фторпроизводное **24** значительно ингибировало рост клеток хронического миелогенного лейкоза (К-562); производные **25** и **26**, содержащие галоген в *n*-положении бензольного кольца, были наименее активными (таблица 2). Аналоги **23**, **28** показали активность в отношении клеток Т-лимфоцитарной

лейкемии человека (MOLT-4). Докинг-оценка эффективности связывания целевых соединений с Abl-киназой и их расчетная липофильность не позволили объяснить различий в ингибирующей активности синтезированных соединений (таблица 4). Вероятно, стратегия введения гидрофобного заместителя в *мета*-положение терминального бензольного кольца в структуре иматиниба может быть перспективной для увеличения эффективности последнего.

Схема 3



11, 17, 23 R = *o*-F; 12, 18, 24 R = *m*-F; 13, 19, 25 R = *n*-F; 14, 20, 26 R = *n*-Br;

15, 21, 27 R = *o*-OAc; 16, 22, 28 R = *o*-OH.

Таблица 2. - Свойства полученных структурных аналогов иматиниба 23-28

Соединение	Заместитель (R)	Выход, %	logP	IC <sub>50</sub> , мкМ		Докинг-оценка, ккал/моль
				K-562	MOLT-4	
23	<i>o</i> -F	76	4,31	40	12	-12,6
24	<i>m</i> -F	82	4,33	6,7	30	-12,7
25	<i>n</i> -F	74	4,36	>100	>100	-12,6
26	<i>n</i> -Br	68	5,0	>100	>100	-12,7
27	<i>o</i> -OAc	56	4,25	20	68	-12,7
28	<i>o</i> -OH	62	4,68	57	17	-12,6
Иматиниб	-	-	3,89	0,45	-	-13,3
Нилотиниб	-	-	-	<0,1	15	-13,9

IC<sub>50</sub> - концентрация 50%-го ингибирования роста клеток.

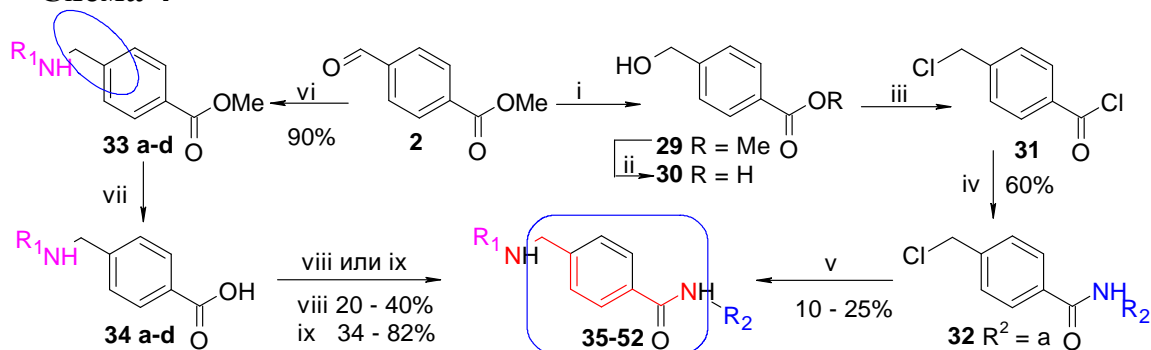
### 3.2 Синтез новых потенциальных многоцелевых ингибиторов тирозинкиназы с 4-метилбензамидом в качестве линкера

Нами было синтезировано 22 новых производных 4-метилбензамида, представляющих интерес как потенциальные ингибиторы протеинкиназ, исходя из результатов проведенных ранее *in silico* исследований (схема 4).

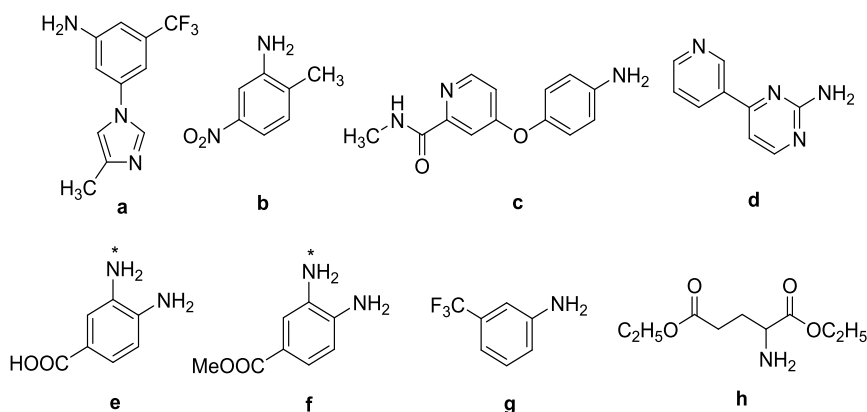
Для получения целевых соединений было разработано два синтетических подхода с 4-формилметилбензоатом (2) в качестве исходного соединения. Первый подход предполагал синтез дихлорпроизводного 31 и последовательное замещение атомов хлора на различные амины. Ключевой промежуточный продукт 32 был получен взаимодействием амина а с 31 со средним выходом 60%. Конечные соединения 35-39

синтезировали реакцией первичных аминов **a/b/c/e/g** с хлорпроизводным **32** с умеренными выходами (10–25%).

#### Схема 4



R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>; R<sup>2</sup>-NH<sub>2</sub>

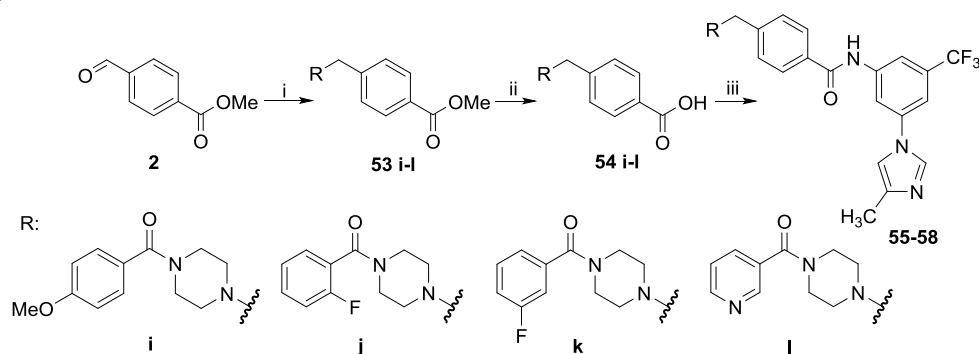


**35** R<sub>1</sub> = **a**, R<sub>2</sub> = **a**; **36** R<sub>1</sub> = **b**, R<sub>2</sub> = **a**;  
**37** R<sub>1</sub> = **c**, R<sub>2</sub> = **a**; **38** R<sub>1</sub> = **g**, R<sub>2</sub> = **a**;  
**39** R<sub>1</sub> = **e**, R<sub>2</sub> = **a**; **40** R<sub>1</sub> = **a**, R<sub>2</sub> = **g**;  
**41** R<sub>1</sub> = **a**, R<sub>2</sub> = **h**; **42** R<sub>1</sub> = **a**, R<sub>2</sub> = **b**;  
**43** R<sub>1</sub> = **b**, R<sub>2</sub> = **h**; **44** R<sub>1</sub> = **b**, R<sub>2</sub> = **c**;  
**45** R<sub>1</sub> = **b**, R<sub>2</sub> = **g**; **46** R<sub>1</sub> = **b**, R<sub>2</sub> = **f**;  
**47** R<sub>1</sub> = **c**, R<sub>2</sub> = **g**; **48** R<sub>1</sub> = **c**, R<sub>2</sub> = **h**;  
**49** R<sub>1</sub> = **d**, R<sub>2</sub> = **a**; **50** R<sub>1</sub> = **d**, R<sub>2</sub> = **h**;  
**51** R<sub>1</sub> = **d**, R<sub>2</sub> = **g**; **52** R<sub>1</sub> = **d**, R<sub>2</sub> = **b**.

Реагенты и условия: (i) NaBH<sub>4</sub>, MeOH; (ii) 1) KOH, MeOH/H<sub>2</sub>O, 2) HCl/H<sub>2</sub>O; (iii) SOCl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, reflux; (iv) R<sup>2</sup>NH<sub>2</sub> (**a**), Et<sub>3</sub>N, CHCl<sub>3</sub>; (v) R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> (**a/b/c/e/g**), DMF, reflux; (vi) R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> (**a-d**), NaBH(OAc)<sub>3</sub>, AcOH, CHCl<sub>3</sub>; (vii) HCl (18–27%), 80°C; (viii) 1) SOCl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, 2) R<sup>2</sup>NH<sub>2</sub> (**a/b/g/h**), NEt<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>; (ix) R<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (**a/c/f/g/h**), DCC (CDI), BtOH, NEt<sub>3</sub>, DMF.

Во втором подходе амины **33a-d** образовывались с высокими выходами (80–95%) по реакции восстановительного аминирования альдегида **2** с первичными аминами **a-d** в присутствии триацетокси-боргидрида натрия и уксусной кислоты при комнатной температуре. Кислотный гидролиз соединений **33a-d** водным раствором HCl (18–27%) при 80–90°C приводил к производным **34a-d** с высоким выходом (80–85%). Конечное амидирование для получения целевых структур **37** и **40-52** осуществлялось двумя способами. Первый способ предполагал получение промежуточных хлорангидридов действием тионилхлорида на карбоксильные производные **34a-d**, которые затем непосредственно вводили в реакцию с соответствующими аминами **a/b/g/h** в присутствии триэтиламина. Выход целевых амидов **37**, **40-42**, **49-52** после выделения и очистки составлял 20–50%. Второй способ амидирования заключался в предварительной активации карбоксильной группы соединений **34a-d** конденсирующими агентами, N,N'-дициклогексилкарбодиимидом (DCC) или 1,1'-карбонилдиимидазолом (CDI), в присутствии NEt<sub>3</sub>/BtOH и последующим добавлением первичных аминов **a/c/f/g/h**. Такой подход позволил получить целевые амиды **36**, **43-48** с хорошими выходами (34–82%).

## Схема 5



Реагенты: (i)  $R_3H$  (**i/j/k/l**),  $NaBH(OAc)_3$ ,  $AcOH$ ,  $CHCl_3$ ; (ii)  $HCl$  (18–27%),  $80^\circ C$ ; (iii) 1)  $SOCl_2$ ,  $CHCl_3$ , 2)  $RNH_2$  (**a**),  $NEt_3$ ,  $CHCl_3$ .

**55**  $R = i$ ; **56**  $R = j$ ; **57**  $R = k$ ; **58**  $R = l$ .

Пиперазин-содержащие производные 4-метилбензамида **55-58** получали восстановительным аминированием альдегидной группы 4-формилметилбензоата (**2**) гетероциклическими аминами **i-l** с последующим гидролизом сложных эфиров **53i-l** и амидированием соответствующих интермедиатов **54i-l** имидазольным производным 3-(трифторметил)анилина (**a**) (схема 5).

### 3.3 Изучение биологической активности полученных соединений

Полученные производные 4-метилбензамида продемонстрировали значительную или высокую активность в отношении двух или более опухолевых клеточных линий (таблица 3). Значение концентрации 50%-ого ингибирования ( $IC_{50}$ ) менее 20 мкМ показали соединения **35** (линия MCF-7), **37** (HL-60), **40** (K-562), **42** (HL-60), **55** (Hela), **56-58** (K-562). При этом существенного ингибирования роста культуры здоровых лимфоцитов (RPMI 1788) для всех соединений не наблюдалось.

### 3.4 Изучение ингибирующей активности в отношении протеинкиназ

Для соединений, активных в отношении клеточных культур, была исследована ингибирующая активность в концентрации 10 нМ в отношении восьми рецепторных тирозинкиназ (таблица 4). Аналоги **37**, **38**, **40**, **47**, **49**, **51** существенно снижали активность рецептора эпидермального фактора роста EGFR (21-92%); соединения **37**, **38**, **40**, **45** и **47** – тромбоцитарного фактора роста PDGFR $\alpha$  (55-77%). Полученные данные согласуются с результатами предыдущих *in silico* исследований, в которых наличие фрагмента 3-(трифторметил)анилина увеличивало прогнозируемую ингибирующую активность.

### 3.5 Докинг и молекулярная динамика

Для ранее не изучавшихся методами *in silico* соединений методом докинга были получены их комплексы с онкозначимыми протеинкиназами. Для этих комплексов методом ММ-РBSA была рассчитана энергия связывания и ее отдельные компоненты (таблица 5). В сравнении с результатами для известных ингибиторов, высокие значения ван-дер-ваальсовых взаимодействий были найдены для соединений **42**, **47**, **49**, **58**; электростатических – для соединений **42**, **45**, **47**, **49**, **58**.

С целью определения возможной конформации связывания с мишенью был визуализирован ряд комплексов исследуемых соединений и выполнен поиск водородных связей. Молекулярная стыковка аналога **37** с T315I-мутантной Abl (PDB: 3QRJ) и ребастиниба в качестве контроля продемонстрировала возможность связывания с обходом объемного остатка изолейцина (рисунок 8а). Визуализация комплекса **58** с Abl-киназой выявила возможность образования трех водородных связей (рисунок 8б). Расчетная энергия связывания для этого комплекса составила -148,6+/-19,5 кДж/моль.

Таблица 3. – Антипролиферативная активность *in vitro* производных 4-метилбензамида

Соединение	Log P (TPSA)*	IC <sub>50</sub> , мкМ						Ингибирование, %, 100 мкМ RPMI 1788
		K-562	HL-60	MCF-7	Hela	A-549	OKP-GS	
<b>32</b>	4,20 (46,92)	69	45	54	51,8	53,5	70	<0,1
<b>35</b>	5,68 (76,78)	н/д	н/д	<b>9,5</b>	87	85	>100	19,32
<b>36</b>	4,30 (97,63)	51	57	>100	н/д	>100	>100	н/д
<b>37</b>	5,00 (110,17)	40	<b>8,2</b>	>100	>100	>100	81	10,42
<b>38</b>	5,75 (58,95)	53	51	57	54	61	54,3	15,53
<b>40</b>	5,75 (58,95)	<b>5,6</b>	46	69	57,5	55	52	9,36
<b>41</b>	0,75 (133,55)	50	45	н/д	н/д	н/д	н/д	10,45
<b>42</b>	5,22 (104,78)	31	<b>5,8</b>	>100	78,5	73	>100	15,93
<b>46</b>	3,74 (150,27)	64	>100	н/д	н/д	н/д	н/д	10
<b>50</b>	-0,63 (154,40)	66	49	н/д	н/д	н/д	н/д	11,52
<b>55</b>	3,94 (79,70)	30,7	38	63	<b>11,5</b>	>100	78	6,32
<b>56</b>	4,00 (70,47)	<b>6,9</b>	30,6	71	н/д	>100	н/д	6,44
<b>57</b>	4,02 (70,47)	<b>3,6</b>	38,5	н/д	н/д	н/д	н/д	3,14
<b>58</b>	2,65 (83,36)	<b>4,5</b>	53,5	77	>100	>100	>100	н/д
Соединения сравнения								
иматиниб	3,89 (86,28)	0,41	44,5	49	46	54	48	13,37
нилотиниб	4,99 (97,63)	<0,1	55	н/д	н/д	н/д	55	<0,1
сорафениб	3,76 (92,35)	н/д	н/д	55	н/д	58	51	н/д

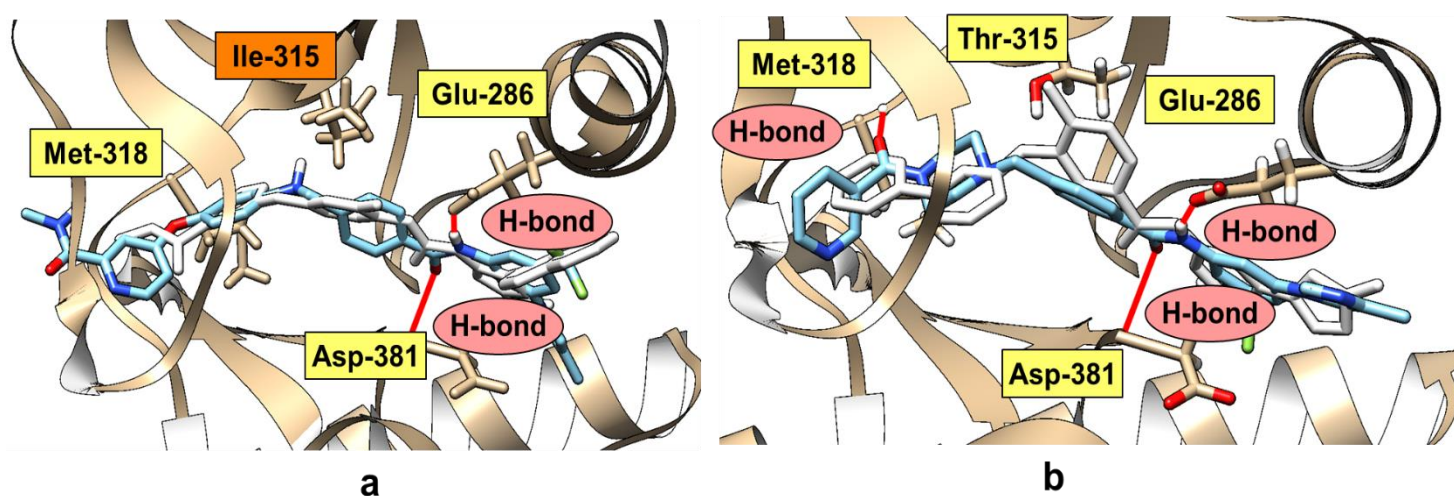
\* значения липофильности logP рассчитаны при помощи программы Molinspiration; TPSA – топологическая площадь полярной поверхности; н/д – нет данных.

Для изомерных пар **38/40** и **36/42** остаток 3-(трифторметил)анилина располагался в аллостерическом кармане, независимо от его места в структуре, что может говорить о высокоспецифичном сродстве данного фрагмента к аллостерическому участку каталитического центра протеинкиназ.

Результаты моделирования продемонстрировали, что использование 4-(аминометил)бензамида в качестве гибкого линкера позволяет его производным благоприятно располагаться в активном центре протеинкиназ с занятием



аллостерического и АТФ- карманов. Вероятно, это может объяснить высокую ингибирующую активность целевых соединений против ряда протеинкиназ и опухолевых клеточных культур.



Водородные связи обозначены красными линиями. Экспериментальные модели связывания известных ингибиторов ребастинаба (а) и нилотиниба (б) отмечены белым. (а) **37** с Т315I-мутантной Abl (PDB: 3QRJ; H-связь - Asp-381, Glu-286). (б) **58** с Abl (PDB: 3CS9; H-связь - Met-318, Asp-381, Glu-286).

**Рисунок 8. – Докинг-модели связывания ингибиторов 37 и 58 с Abl-киназами**

**Таблица 4. - Ингибирование рецепторных тирозинкиназ целевыми соединениями**

Соединение	% Ингибирования при 10 нМ							
	EGFR	HER2	HER4	IGF1R	InsR	KDR	PDGFRa	PDGFRb
<b>37</b>	<b>65</b>	0	<b>51</b>	0	46	27	<b>66</b>	0
<b>38</b>	<b>91</b>	0	49	0	0	16	<b>55</b>	0
<b>40</b>	<b>92</b>	34	<b>54</b>	0	0	20	<b>59</b>	8
<b>41</b>	0	0	0	0	23	0	0	0
<b>42</b>	0	0	0	0	43	0	0	0
<b>44</b>	0	0	0	0	49	0	0	0
<b>45</b>	0	14	<b>56</b>	0	0	24	<b>67</b>	13
<b>47</b>	<b>56</b>	0	<b>57</b>	18	0	48	<b>77</b>	28
<b>49</b>	21	0	49	0	0	28	0	0
<b>50</b>	0	0	12	1	49	0	0	0
<b>51</b>	24	0	44	0	0	2	0	0
<b>55</b>	0	0	0	3	<b>52</b>	0	0	0
<b>56</b>	0	0	0	0	<b>50</b>	0	8	2
<b>57</b>	0	0	43	0	33	23	0	2
<b>58</b>	0	0	<b>51</b>	0	0	17	0	7
<b>иматиниб</b>	0	0	42	0	36	0	<b>56</b>	<b>75</b>

Таблица 5. – Энергия связывания, рассчитанная для комплексов исследуемых соединений и соединений сравнения

Соединения	Докинг-оценка	PDB код рецептора	Энергия связывания и ее компоненты, кДж/моль			
			Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия	Электростатические взаимодействия	Энергия сольватации	Энергия связывания
<b>37</b>	-12,3	3QRJ	<b>-289,1+/-11,8</b>	-18,2+/-14,1	175,7+/-21,0	<b>-160,0+/-13,7</b>
<b>38</b>	-11,9	3CS9	-259,0+/-10,3	-39,4+/-15,6	173,2+/-17,4	<b>-151,5+/-11,8</b>
<b>40</b>	-11,7	3CS9	-257,5+/-14,9	-34,7+/-8,2	200,3+/-17,8	-117,9+/-17,6
<b>42</b>	-10,7	3CS9	<b>-269,2+/-11,1</b>	<b>-65,9+/- 8,5</b>	239,0+/-16,0	-122,3+/-17,1
<b>45</b>	-11,2	2HYY	-215,1+/-12,6	<b>-69,8+/-14,3</b>	208,2+/-22,0	-99,1+/-18,0
<b>47</b>	-11,5	3WZE	<b>-271,5+/-13,0</b>	-41,9+/-14,1	203,3+/-19,8	-136,2+/-14,7
<b>49</b>	-11,5	2HYY	<b>-272,3+/-17,3</b>	-51,8+/-12,9	202,8+/-17,2	<b>-148,2+/-15,7</b>
<b>51</b>	-11,2	2HYY	-250,5+/-12,3	-23,0+/-8,6	161,9+/-18,0	-135,3+/-17,9
<b>51</b>	-11,5	3WZE	-238,3+/-14,7	-26,9+/-8,0	172,0+/-8,3	-115,9+/-14,5
<b>58</b>	-11,2	3CS9	<b>-290,5+/-14,6</b>	<b>-69,0+/-20,3</b>	238,9+/-41,2	<b>-148,6+/-19,5</b>
<b>Структуры сравнения</b>						
иматиниб	-11,9	2HYY	-282,1+/-10,0	-42,4+/-7,4	195,6+/-10,4	-154,7+/-12,3
понатиниб	-11,6	2HYY	-290,9+/-10,9	-32,9+/-8,7	191,0+/-20,0	-159,4+/-18,4
нилотиниб	-13,8	3CS9	-304,1+/-12,4	-63,2+/-10,6	216,4+/-13,2	-177,7+/-11,6
ребастиниб	-12,6	3QRJ	-322,1+/-10,7	-77,0+/-13,0	250,3+/-13,8	-178,0+/-14,2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Идентификация новых потенциальных ингибиторов протеинкиназ на основе структур, содержащих пиррольный или 4-метилбензамидный фрагмент, методами направленного фармакофорного дизайна, молекулярного докинга и молекулярной динамики [2,4,6,11].

2. Оригинальный способ получения иматиниба и его ключевого интермедиата, 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]бензойной кислоты, с использованием улучшенного метода восстановительного аминирования, который позволяет снизить температуру реакции, исключить взрывоопасные растворители и увеличить выходы [1,2,14,15].

3. Получение новых структурных аналогов иматиниба и исследование их антипролиферативной активности *in vitro* в отношении опухолевых клеточных линий [2,3,7,8,13].

4. Получение новых многоцелевых ингибиторов протеинкиназ, содержащих в качестве линкера 4-метилбензамид, ингибирующие свойства которых предсказаны методами молекулярного моделирования [2,5,9,10,11,12].

5. Обнаружение антипролиферативной активности в отношении опухолевых клеточных линий, а также ингибирующей активности в отношении онкозначимых

протеинкиназ у ряда ранее неизвестных производных 4-метилбензамида и установление возможного механизма их противоопухолевого действия методами молекулярного моделирования.

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Разработанный препаративный способ синтеза иматиниба основания внедрен в промышленное производство в НПЦ «ХимФармСинтез» Института биоорганической химии НАН Беларуси. Разработанные эффективные методы синтеза новых ингибиторов протеинкиназ, содержащих в качестве линкера 4-метилбензамид, могут использоваться для дальнейших исследований и поиска в их ряду соединений, обладающих противоопухолевой активностью.

### **Список публикаций соискателя**

*Статьи в рецензируемых научных журналах:*

1. A Practical Synthesis of 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzoic acid - the Key Precursor of Imatinib / E. V. Koroleva, A. P. Kadutskii, A.V. Farina, J. V. Ignatovich, A. L. Ermolinskaya, K. N. Gusak, E. N. Kalinichenko // *Tetrahedron Letters*. - 2012. - Vol. 53, iss. 38. - P.5056-5058.

2. Фарина, А. В. Дизайн, синтез и биологические свойства ингибиторов BCR-ABL тирозинкиназы, применяемых для лечения хронического миелолейкоза / А. В. Фарина, Е. Н. Калиниченко // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук*. - 2016. - Т. 1. - С. 105-121.

3. Design, Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Structural Analogues of Imatinib / A. Faryna, E. Kalinichenko, O. Avdoshko, A. Belko // *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*. - 2017. - Vol. 3, iss. 2. - P. 27-31.

4. Фарина, А. В. Виртуальный скрининг пиррол-содержащих структурных аналогов иматиниба методом молекулярного докинга / А. В. Фарина, Е. Н. Калиниченко // *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. - 2019. - Т. 63, №1. - С. 37-43.

5. Synthesis, Biological Activities and Docking Studies of Novel 4-(Arylaminoethyl)benzamide Derivatives as Potential Tyrosine Kinase Inhibitors / E. Kalinichenko, A. Faryna, V. Kondrateva, A. Vlasova, V. Shevchenko, A. Melnik, O. Avdoshko, A. Belko // *Molecules*. - 2019. - Vol. 24, iss. 19. - P. 3543-3568.

6. Faryna, A.V. Computer-aided molecular design of new potential inhibitors of protein kinases using of 4-methyl-benzoic acid as a linker / A. V. Faryna, E. N. Kalinichenko // *Journal of Computational Chemistry & Molecular Modeling*. - 2019. - Vol. 3, iss. 2. - P. 285-293.

*Тезисы докладов:*

7. Фарина, А. В. Разработка новых структурных аналогов нилотиниба / А. В. Фарина, О. В. Авдошко, Е. Н. Калиниченко // *Белорусские лекарства: материалы междунар. научно-практ. конф., Минск, 27-28 нояб. 2014 г.* / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов. - Минск, 2014. - С. 218-220.

8. Фарина, А. В. Разработка новых структурных аналогов иматиниба / А. В. Фарина, П. А. Антонов, Е. Н. Калиниченко // Белорусские лекарства: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27-28 нояб. 2014 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов. - Минск, 2014. – С. 215-217.

9. Synthesis and antitumor activity of novel structural analogues of folic acid / A. V. Farina, V. V. Kondrateva, O. V. Avdoshko, A. V. Belko, E. N. Kalinichenko. // «Химия и структура биомолекул»: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию НАН Беларуси, Минск, 20-25 мая, 2018 / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов. - С. 117-119.

10. Novel folic acid derivatives: synthesis and in vitro antitumor activity / A. V. Farina, V. A. Shevchenko, A. K. Melnic, E. I. Vlasova, O. V. Avdoshko, A. V. Belko, E. N. Kalinichenko. // «Химия и структура биомолекул»: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию НАН Беларуси, Минск, 20-25 мая, 2018 / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов. - С. 177-179.

11. Фарина, А. В. Дизайн *de novo* и оценка ингибирующей активности *in silico* производных 4-метилбензамида как потенциальных ингибиторов протеинкиназ / А. В. Фарина, Е. Н. Калиниченко. // «Белорусские лекарства»: материалы междунар. науч. конф., Минск, 10-12 окт. 2019 / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов. - С. 181-185.

12. Синтез и биологическая активность производных бензоиламида в качестве потенциальных ингибиторов VEGFR-2 / А. В. Фарина, А. К. Мельник, В. В. Кондратьева., О. В. Авдошко, А. В. Белько., Е. Н. Калиниченко. // “Белорусские лекарства”: материалы междунар. науч. конф., Минск, 10-12 окт. 2019 / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси; редкол.: С. А. Усанов. - С. 176-180.

13. New structural analogs of imatinib and nilotinib / A. V. Farina, O. V. Avdoshko, P. A Antonov, E. N. Kalinichenko // Drug Discovery Conference: abstracts, Riga, 27-29 Aug. 2015 / Latvian Institute of Organic Synthesis; ed.: M. Dambrova. - Riga, 2015. - P. 96.

#### Патенты:

14. Способ получения метансульфоната 4-[(4-метил-1-пиперазинил)-метил]-N-[4-метил-3-{[4-(3-пиридил)-2-пиримидинил]-амино}фенил]бензамида: пат. ВУ 17047 / В. Е. Агабеков, Е. В. Королева, В. Н. Гапанович, К. Н. Гусак, Ж. В. Игнатович, А. Л. Ермолинская, А. П. Кадуцкий, М. П. Бей, Е. Н. Калиниченко, А. В. Фарина. - Опубл. 30.04.2013.

15. Способ получения метилового эфира и дигидрохлорида 4-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-бензойной кислоты: пат. ВУ 17842 / Е. В. Королева, К. Н. Гусак, Ж. В. Игнатович, А. Л. Ермолинская, А. П. Кадуцкий, Е. Н. Калиниченко, А. В. Фарина. - Опубл. 30.12.2013.

## РЕЗЮМЕ

Фарина Александр Васильевич

### **Молекулярное моделирование, синтез и биологическая активность новых ингибиторов протеинкиназ, содержащих 4-метилбензамид в качестве линкера**

**Ключевые слова:** низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ, иматиниб, 4-метилбензамид, молекулярный докинг, молекулярная динамика, виртуальный скрининг.

**Цель работы:** осуществить поиск новых химических соединений, способных ингибировать протеинкиназы, с использованием методов направленного фармакофорного дизайна, оценки ингибирующей активности *in silico* и химической дериватизации; идентифицировать и синтезировать молекулы, перспективные для разработки низкомолекулярных ингибиторов протеинкиназ, а также исследовать их биологическую активность.

**Методы исследования:** современные методы органического синтеза, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, МТТ-тест, виртуальный скрининг, молекулярный докинг, молекулярная динамика.

**Предмет исследования:** рациональный дизайн новых биологически-активных соединений; комбинаторный подход молекулярного докинга для идентификации новых ингибиторов протеинкиназ; методы синтеза новых производных 4-метилбензамида, иматиниба и его структурных аналогов.

**Полученные результаты и их новизна:** Методами молекулярной динамики и молекулярного докинга идентифицированы новые классы соединений как потенциальные ингибиторы протеинкиназ, содержащие структурные фрагменты пиррола и 4-метилбензамида. Разработан усовершенствованный метод восстановительного аминирования для синтеза третичных бензиламинов. Разработан оригинальный препаративный метод получения иматиниба. Синтезированы новые структурные аналоги иматиниба, изучена их биологическая активность. Получены новые производные 4-метилбензамида с предсказанной биологической активностью, среди которых обнаружены соединения, способные ингибировать рост опухолевых клеток и функцию некоторых онкозначимых протеинкиназ.

**Рекомендации по использованию:** результаты работы могут быть использованы для поиска новых высокоэффективных ингибиторов протеинкиназ и создания на их основе таргетных противоопухолевых препаратов. Разработанный препаративный способ синтеза иматиниба внедрен в промышленное производство в НПЦ «ХимФармСинтез» Института биоорганической химии НАН Беларуси.

## РЭЗІЮМЭ

Фарына Аляксандр Васільевіч

### Малекулярнае мадэляванне, сінтэз і біялагічная актыўнасць новых інгібітараў пратэінкіназ, якія змяшчаюць 4-метылбензамід ў якасці лінкера

**Ключавыя словы:** нізкамалекулярныя інгібітары пратэінкіназ, іматыніб, 4-метылбензамід, малекулярны докінг, малекулярная дынаміка, віртуальны скрынінг.

**Мэта работы:** з выкарыстаннем метадаў накіраванага фармакафорнага дызайну, ацэнкі інгібіруючай актыўнасці *in silico* і хімічнай дэрыватызацыі ажыццявіць пошук новых хімічных злучэнняў, здольных інгібіраваць пратэінкіназы, ідэнтыфікаваць і сінтэзаваць малекулы, перспектыўныя для распрацоўкі нізкамалекулярных інгібітараў пратэінкіназ, а таксама даследаваць іх біялагічную актыўнасць.

**Метады даследавання:** сучасныя метады арганічнага сінтэзу, ЯМР-спектраскапія, мас-спектраметрыя, МТТ-тэст, віртуальны скрынінг, малекулярны докінг, малекулярная дынаміка.

**Прадмет даследавання:** камбінаторны падыход малекулярнага докінга і малекулярнай дынамікі для ідэнтыфікацыі новых інгібітараў пратэінкіназ, рацыянальны дызайн інгібітараў пратэінкіназ.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** Метадамі малекулярнай дынамікі і малекулярнага докінга ідэнтыфікаваны новыя класы злучэнняў як патэнцыйныя інгібітары пратэінкіназ, якія змяшчаюць структурныя фрагменты піррола і 4-метылбензаміда. Распрацаваны удасканалены метады аднаўленчага амінавання для сінтэзу трацічных бензіламінаў. Распрацаваны арыгінальны прэпаратыўны метады атрымання іматынібу. Сінтэзаваны новыя структурныя аналагі іматыніба, вывучана іх біялагічная актыўнасць. Атрыманы новыя вытворныя 4-метылбензаміда з прадказанай біялагічнай актыўнасцю, сярод якіх выяўлены злучэнні, здольныя інгібіраваць рост пухлінных клетак і функцыю шэрагу анказначных пратэінкіназ.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** вынікі працы могуць быць выкарыстаны для пошуку новых высокаэфектыўных інгібітараў пратэінкіназ і стварэння на іх аснове таргетных проціпухлінных прэпаратаў. Распрацаваны прэпаратыўны спосаб сінтэзу іматыніба ўкаранёны ў прамысловую вытворчасць у НПЦ «ХімФармСінтэз» Інстытута біяарганічнай хіміі НАН Беларусі.

**ABSTRACT**

Faryna Aliaksandr

**Molecular modeling, synthesis and biological activity of novel protein kinase inhibitors containing 4-methylbenzamide as a linker.**

**Keywords:** small-molecule protein kinase inhibitors, imatinib, 4-methylbenzamide, molecular docking, molecular dynamics, virtual screening.

**The aim of the research:** identification of novel protein kinase inhibitors using pharmacophore based drug design, *in silico* binding affinity estimation, chemical derivatization; synthesis and biological activity testing of new compounds with potential anti-kinase activity.

**Methods of research:** organic synthesis, NMR-spectroscopy, mass-spectrometry, MTT-testing, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics.

**The object of the research:** rational drug design, combination workflow of molecular docking and molecular dynamics for the identification of novel kinase inhibitors, methods of synthesis of imatinib, imatinib analogues and 4-methylbenzamide derivatives.

**Obtained results and their novelty:** New classes of chemical compounds containing pyrrole and 4-methylbenzamide moieties were identified as novel protein kinase inhibitors using pharmacophore based drug design, molecular dynamics and molecular docking. Improved synthetic methods for the preparation of imatinib as well as tertiary benzylamines were developed. Several new 4-methylbenzamide derivatives were synthesized and tested showing strong antiproliferation activity against various cancer cell lines along with the ability to inhibit cancer-related protein kinases.

**Application guidelines:** the results of the research may be used for the development of new kinase inhibitors and related drugs. Developed method of imatinib synthesis is approved for full-scale production on SPC "ChemPharmSynthesis" of the Institute of bioorganic chemistry NAS Belarus.