

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
им. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»
(ННГУ)

Химический факультет

Кафедра органической химии

**Выпускная квалификационная работа
(дипломная работа)**

**СИНТЕЗ БИВАЛЕНТНОГО ИНГИБИТОРА
СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ МЕТАБОЛИЗМА МОЛОЧНОЙ
КИСЛОТЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ**

Заведующий кафедрой:
д.х.н. проф. РАН Фёдоров А.Ю.

Научный руководитель:
д.х.н. проф. РАН Фёдоров А.Ю.

Исполнитель, студент
5 курса очной формы обучения
Фонарёва И.П.

Нижний Новгород
2021 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	3
Введение	4
1. Литературный обзор	6
1.1. Особенности жизнедеятельности раковых клеток	6
1.2. Эффект Варбурга и его роль в выживаемости раковых клеток	7
1.3. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR	11
1.4. Ингибирование PI3K/AKT/mTOR пути и его составных частей	15
1.5. Роль монокарбоксилатных переносчиков, их ингибирование	21
1.6. Ингибиторы монокарбоксилатных транспортеров	24
1.7. pH-чувствительные линкеры	28
2. Обсуждение результатов	31
2.1. Получение ингибитора PI3K/mTOR	32
2.2. Получение ингибитора MCT1/MCT4	40
3. Экспериментальная часть	48
Выводы	62
Благодарности	63
Список литературы	64

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ac	– ацетил
АКТ	– серин/треонин-киназа
DCM	– дихлорметан
DIPEA	– диизопропилэтиламин
DMAP	– 4-диметиламинопиридин
DMF	– N,N-диметилформаид
dppf	– 1,1'-бис(дифенилфосфин)ферроцен
EA	– этилацетат
HIF1	– индуцированный гипоксией фактор-1
LDA	– литийдиизопропиламид
MCT	– монокарбоксилатный транспортер
mTOR	– мишень рапамицина млекопитающих
PE	– петролейный эфир
Phth	– фталоил
PI3K	– фосфатидилинозитол-3-киназа
Piv	– пивалоил
rt	– комнатная температура
SEM	– 2-(триметилсилил)этоксиметил
THF (ТГФ)	– тетрагидрофуран
АДФ	– аденозиндифосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
DMCO	– диметилсульфоксид
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
НАД ⁺	– никотинамидадениндинуклеотид
НАДН	– восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида
НАДФ	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ТСХ	– тонкослойная хроматография
ФАДН ₂	– восстановленная форма флавинадениндинуклеотида
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Рак – большая группа болезней, способных поражать любую часть тела. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения в 2018 году он стал причиной смерти 9,6 млн. человек. В связи с этим, лечение рака – важное направление современной науки и медицины.

Основными методами лечения остаются хирургическое вмешательство, радио- и химиотерапия, а также применяются иммуно- и гормонотерапия, пересадка стволовых клеток или костного мозга, таргетная терапия. Выбор метода лечения обусловлен индивидуальными особенностями организма и протекания болезни. Существующие методы несовершенны, затрагивают в том числе и здоровые клетки, обладают большим количеством побочных эффектов таких, как анемия, кровотечения, проблемы желудочно-кишечного тракта и т.д. В настоящее время много внимания уделяется развитию таргетной терапии, направленной на изменения в раковых клетках, помогающих им усиленно расти, делиться и развиваться [1]. Поэтому, изучение биологических различий между здоровыми и раковыми клетками, особенностей их жизнедеятельности необходимо для разработки новых препаратов этой категории.

Канцерогенез во многом зависит от изменений в клеточном обмене веществ. Они влияют на способность приобретать необходимые питательные вещества, формируют предпочтительные метаболические пути, отвечающие необходимым потребностям клетки, изменяют опухолевое микроокружение. Так, вследствие онкогенных мутаций происходит переключение способа получения энергии с окислительного фосфорилирования, протекающего в митохондриях, на гликолиз, несмотря на наличие кислорода. Таким образом, клетки увеличивают скорость своего метаболизма и поддерживают активную пролиферацию. Это явление обнаружено в начале XX века немецким биохимиком Отто Варбургом и называется аэробным гликолизом или эффектом Варбурга [2].

В последнее время изучение вопросов активации, регуляции и функций аэробного гликолиза, а также применение этих данных в создании новых

противоопухолевых препаратов и их влиянии на метаболизм раковых клеток является актуальным направлением в медицине и химии.

Целью данной работы является разработка методов синтеза ингибиторов сигнальных путей, сопряженных с эффектом Варбурга, и синтез рН-чувствительного гибридного соединения, для которого планируется оценка цитотоксической активности по отношению к ряду опухолевых клеток, а также изучение его способности к контролируемому расщеплению при заданных значениях рН.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Особенности жизнедеятельности раковых клеток

Рак – это широкая группа заболеваний, которые характеризуются неконтролируемым размножением и ростом клеток, распространением в другие ткани и органы и метастазированием [3].

В результате многих генетических изменений клетками приобретает ряд важных особенностей, которые способствуют увеличению её выживаемости и пролиферации, т.е. росту тканей и органов за счет размножения клеток. Понимание биологических различий между нормальными и раковыми клетками имеет важное значение для проектирования и разработки противоопухолевых препаратов с селективной противораковой активностью. Во-первых, это независимость во внешних сигналах: о количестве питательных веществ, о состоянии субстрата, о наличии или отсутствии факторов роста и т.д., а также понижение чувствительности к ним. Еще одним существенным фактором является отсутствие лимита числа актов деления клетки, так называемого предела Хейфлика, а именно у здоровых клеток после 50-60 делений останавливается размножение, и они постепенно погибают [4]. Также большую роль играет снижение регуляции апоптотических белков, что приводит к увеличению выживаемости раковых клеток. Апоптоз – механизм программируемой клеточной гибели, в котором важную роль играют каспазы, иницирующиеся двумя путями – рецепторным и митохондриальным [5-6]. Также отличительными признаками опухолей являются инвазивность, т.е. способность к проникновению в соседние ткани и органы организма, и метастазирование, т.е. образование производных очагов. Для некоторых типов рака характерно изменение в дифференцировке клеток. В конечном итоге, накопление большого количества мутаций, провоцирующих нарушения клеточного цикла и механизмов размножения и старения, ослабление чувствительности к различным сигналам, является следствием генетической изменчивости [7].

Развитие рака во многом зависит от изменений в клеточном метаболизме, которые являются как прямыми, так и косвенными следствиями онкогенных мутаций. Главной чертой метаболизма раковых клеток является способность получать необходимые питательные вещества из зачастую обедненной среды и использовать их для поддержания своей жизнеспособности и создания новой биомассы [2]. В связи с этим, изменения, которые наиболее часто встречаются в обмене веществ в раковых клетках, выражаются в следующих шести признаках: 1) неконтролируемое потребление глюкозы и аминокислот, 2) использование условно-патогенных способов получения питательных веществ, 3) применение промежуточных веществ гликолиза и цикла трикарбоновых кислот для биосинтеза и производства НАДФН, 4) высокая потребность в азоте, 5) изменение в регуляции генов и 6) метаболические взаимодействия с микроокружением. Некоторые опухоли проявляют все признаки, но для большинства из них характерны только некоторые из вышеперечисленных [2].

1.2. Эффект Варбурга и его роль в выживаемости раковых клеток

Одной из наиболее заметных особенностей метаболизма раковых клеток в сравнении с нормальными является высокая зависимость от уровня потребляемой глюкозы, который иногда превышает потребность в ней у клетки.

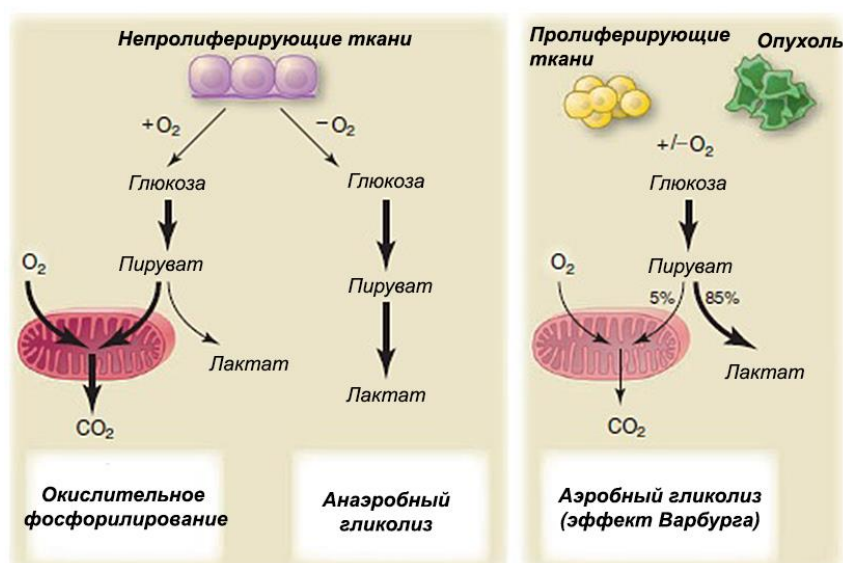


Рисунок 1. Схематическое представление различий между окислительным фосфорилированием, анаэробным гликолизом и аэробным гликолизом [8]

В клетках непрролиферирующих тканей сначала происходит катаболизм глюкозы до пирувата посредством гликолиза, а затем полное окисление образующегося пирувата в митохондриях до углекислого газа в процессе окислительного фосфорилирования. Поскольку для процесса полного окисления глюкозы требуется кислород как конечный акцептор электронов, то в условиях его недостатка накопленный пируват превращается в лактат, этот процесс называется анаэробным гликолизом. Такая генерация лактата позволяет поддерживать гликолиз путем регенерации NAD^+ из NADH , но приводит к менее эффективному получению АТФ (рис. 1).

Внимание привлекает тот факт, что в клетках опухолей получение энергии идёт не посредством окислительного фосфорилирования, а через гликолиз даже в условиях достаточного содержания кислорода. Это явление обнаружено в начале XX века немецким биохимиком Отто Варбургом и называется аэробным гликолизом или эффектом Варбурга [9]. При этом опухолевые клетки обладают функционирующими митохондриями, которые сохраняют способность проводить окислительное фосфорилирование.

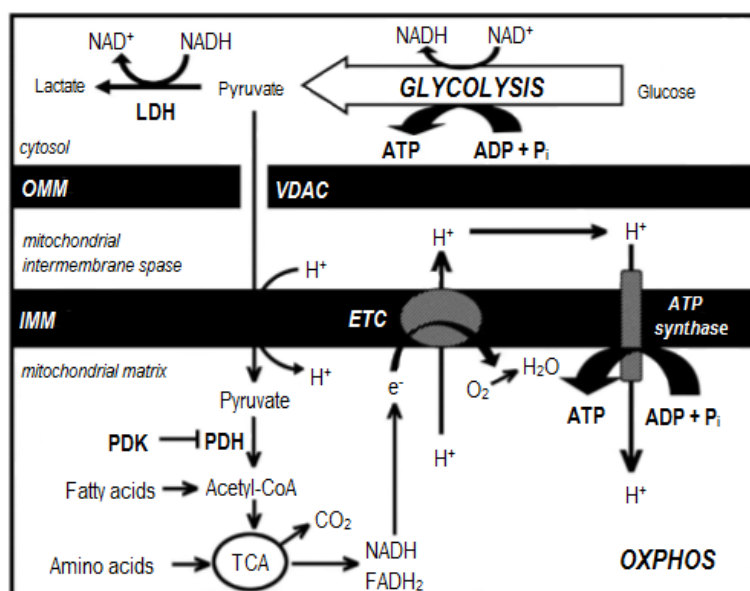


Рисунок 2. Упрощенная схема процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [10]. *LDH* – лактатдегидрогеназа, *ОММ* – наружная мембрана митохондрии, *VDAC* – потенциал-зависимый анионный канал, *ИММ* – внутренняя мембрана митохондрии, *ETC* – электрон-транспортная сеть, *PDK* – киназа пируватдегидрогеназы, *PDH* – пируватдегидрогеназа

Как видно из рисунка 2, выделение АТФ может происходить в цитозоле посредством гликолиза путём превращения глюкозы в пируват. В этом процессе участвует ряд ферментов, такие как гексокиназа, фосфофруктокиназа и др. Превращение сопровождается потреблением НАД⁺, который регенерируется за счет восстановления пирувата до лактата в реакции, катализируемой ферментом лактатдегидрогеназой (LDH). Пируват также используется для получения АТФ в митохондриях в процессе окислительного фосфорилирования. Пируват по потенциал-зависимым анионным каналам (VDAC) поступает через внешнюю мембрану. Транспорт через внутреннюю мембрану в матрикс управляется электрохимическим потенциалом Н⁺. Попав в матрикс, пируват переводится в ацетилкофермент А (ацетил-КоА), по реакции катализируемой пируватдегидрогеназой (PDH). Ингибирование этого фермента осуществляется киназой пируватдегидрогеназы (PDK). Затем происходит окисление ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот до углекислого газа с образованием НАДН и ФАДН₂. Далее осуществляется перенос электронов к кислороду в электрон-транспортной цепи (ETC), который приводит к перекачке Н⁺ из матрикса в межмембранное пространство. Это способствует возникновению электрохимического градиента Н⁺ через внутреннюю мембрану, который используется АТФ-синтазой для фосфорилирования АДФ [10].

Позже английский учёный Герберт Крабтри дополнил результаты Варбурга и показал, что интенсивность дыхания в раковых клетках переменна, а также показал гетерогенность процесса гликолиза в опухолевых клетках [11].

Этот феномен встречается при многих типах рака и обычно коррелирует с плохими прогнозами [2]. Варбург предположил, что подобное изменение в катаболизме глюкозы является ключевым изменением в раковых клетках, применяющимся ими для поддержания выживаемости. Аэробный гликолиз признают отличительной чертой развития злокачественной опухоли, и поэтому участники этого биохимического каскада могут рассматриваться как перспективные мишени для разработки селективных терапевтических средств [3].

Однако возникает вопрос, почему в активно делящихся и растущих клетках применяется менее энергетически выгодный путь синтеза АТФ? Известно, что при метаболизме глюкозы в лактат формируется 2 молекулы АТФ на молекулу глюкозы, в то время как при окислительном фосфорилировании образуется до 36 АТФ [12]. Этот выбор часто объясняют тем, что данный механизм дает ряд значительных преимуществ для выживания раковых клеток. Гликолиз по сравнению с окислительным фосфорилированием является более интенсивным процессом, и таким образом количество синтезированных единиц АТФ за одинаковый временной отрезок сопоставимо [13]. Это обстоятельство позволяет осуществлять быструю выработку энергии в условиях ограниченности питательных веществ и гипоксии. Еще одним преимуществом выделяют использование глюкозы как источника углерода в различных биосинтетических процессах, например, при синтезе липидов, белков и нуклеотидов, что важно при такой высокой скорости разрастания опухолей. Поскольку переход к аэробному гликолизу позволяет использовать более быстрый синтез АТФ, то лимитирующим фактором уже является потребность в НАДН и НАД⁺. Поэтому плюсом использования аэробного гликолиза является регенерация НАД⁺ из НАДН путем превращения пирувата в лактат. Некоторые исследования показывают, что аэробный гликолиз оказывает влияние на сигнальные функции раковых клеток [14-15]. Например, это сказывается на образовании активных форм кислорода (АФК). Их избыток оказывает разрушительное влияние на клеточные мембраны, а также нуклеиновые кислоты, а дефицит – нарушает работу сигнальных процессов, которые важны для пролиферации. Поэтому накопление АФК связано со многими патологиями, такими как нейродегенеративные заболевания, рак и преждевременное старение [16]. Также выдвигаются предположения о действии эффекта Варбурга на сигнальный механизм, отвечающий за состояние хроматина, нуклеопротеида ответственного за репарацию ДНК и транскрипционные процессы [11]. Образующийся в результате гликолиза лактат приводит к «закислению» окружения раковой клетки, что способствует снижению иммунного

ответа на развитие опухоли, её инвазии в соседние ткани и органы, метастазированию [17].

Онкогенные мутации позволяют клеткам получать и перерабатывать питательные вещества таким образом, чтобы это способствовало быстрому созданию биомассы, а не в целях эффективного получения АТФ. Например, мутации в опухолевом супрессоре¹ *p53*, отвечающим за регуляцию экспрессии генов, остановки клеточного цикла и апоптоза, приводят к его инактивации и могут способствовать развитию аэробного гликолиза [18]. Также известно, что существуют сигнальные пути, вовлечённые в клеточную пролиферацию, которые связаны с метаболическими процессами. Большую роль здесь играет путь PI3K/AKT/mTOR, отвечающий как за контроль роста, так и за катаболизм глюкозы [8]. Высокие уровни таких ключевых ферментов, как гексокиназа, фосфокиназа, лактатдегидрогеназа, необходимых для регуляции гликолитического обмена, обнаружены в раковых клетках. Как известно, эффекты этих гликолитических ферментов прямо или косвенно регулируются сигнальными путями (PI3K/AKT/mTOR), онкогенами (например, *c-myc* участвует в регуляции деления клетки, апоптоза и способствует гликолизу), опухолевыми супрессорами (*p53*), транскрипционными факторами² (HIF1 – способствует поступлению глюкозы в клетку) [18]. Это может быть использовано в качестве целей для развития гликолитических ингибиторов как потенциальных противораковых агентов.

1.3. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR

Одним из сигнальных путей является PI3K/AKT/mTOR путь, который играет ключевую роль в пролиферации, росте, выживании и метаболизме. Известно, что его аномальная активация встречается в 70% случаев рака молочной железы в целом [19]. Поэтому, селективное подавление этого

¹ Опухолевый супрессор – ген, отвечающий за регуляцию клеточного деления и апоптоза, репарацию ДНК, тем самым оказывает профилактику возникновения раковых клеток.

² Транскрипционный фактор (фактор транскрипции) – белок, участвующий в контроле синтеза матричной РНК на ДНК, связываясь с определенными участками ДНК.

сигнального пути является перспективной целью для новых противораковых препаратов.

Фосфатидилинозитол-3-киназа (англ. phosphatidylinositol-3-kinase – PI3K) является липидной киназой, которая фосфорилирует фосфатидилинозитол-дифосфат (PIP₂) до соответствующего трифосфата (PIP₃). PI3K – важная составляющая в PI3K/AKT/mTOR сигнальном пути, ответственная за клеточную пролиферацию, рост, выживание и апоптоз, а также метаболизм белков и глюкозы. Кроме того, продукт деятельности PI3K – PIP₃ отвечает за активацию нисходящих сигнальных путей, в том числе протеинкиназы B, также известной как AKT. Среди PI3K семейства киназ выделяют три класса, которые различаются по структуре, способу регуляции и субстратной специфичности. Первый класс PI3K связан с развитием рака. Белки первого класса представлены четырьмя изоформами, которые известны как α , β , γ и δ , среди которых α -изоформа играет главную роль в поддержании и развитии рака, так как ген, отвечающий за эту единицу, мутирует и/или экспрессируется наиболее часто при раке молочной железы, яичников, лёгких, головного мозга (глиобластома) и желудка, различных лимфатических опухолях [20]. Поэтому ингибирование PI3K α является привлекательной стратегией для лечения рака. Изоформы первого класса PI3K обычно активируются через рецепторы тирозинкиназ, например, такие как рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), фактора роста тромбоцитов (PDGFR), трансформирующего ростового фактора (TGF α), фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и инсулиноподобного фактор роста (IGF1R) и т.д. [21]

Мишень рапамицина млекопитающих (англ. mammalian target of rapamycin – mTOR) является киназой, которая регулирует важные клеточные процессы в виде составной части комплексов mTORC1 и mTORC2 [22]. Рапамицин – макроциклический лактон, обладающий противогрибковым и антибактериальным свойствами, что определяет его использование в иммуносупрессивной терапии при трансплантациях [23]. TOR обнаруживается у многих организмов: от дрожжей до млекопитающих. Первоначально он был открыт путем исследования мутаций, придающих устойчивость к ингибирующим эффектам рапамицина, у

дрожжей. Именно mTORC1 является целью рапамицина и его аналогов, и он отвечает за метаболизм глюкозы, синтез белков и липидов, а также выступает регулятором роста и аутофагии, т.е. процесса утилизации собственных частей клеткой. В свою очередь, mTORC2 контролирует актиновый цитоскелет и фосфорилирование АКТ. Из-за значимости своей биологической роли mTOR является важной мишенью для терапии многих заболеваний, в том числе и опухолей [24-25].

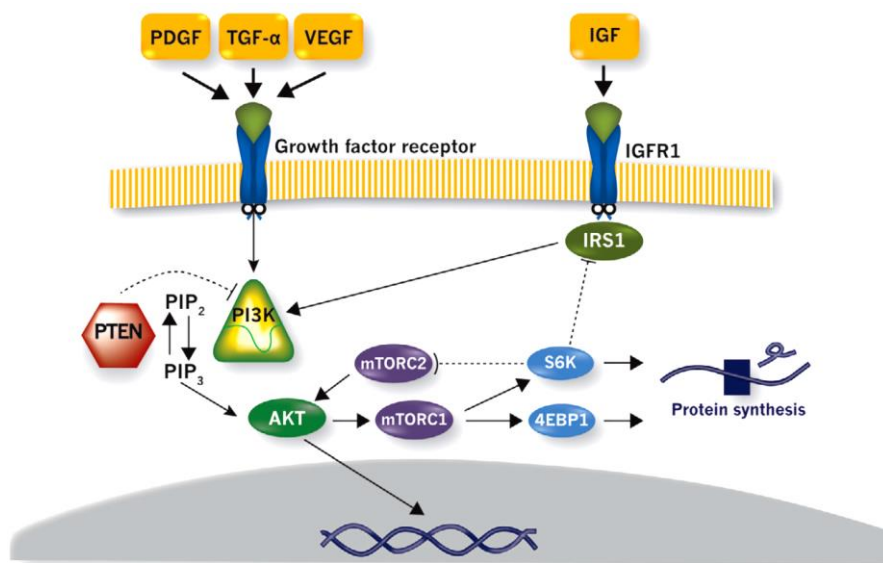


Рисунок 3. Схематическое представление работы PI3K/AKT/mTOR сигнального пути [21]. *PDGF* (англ. *platelet-derived growth factor*) – фактор роста тромбоцитов; *TGF-α* (англ. *transforming growth factor alpha*) – трансформирующий фактор роста; *VEGF* (англ. *vascular endothelial growth factor*) – фактор роста эндотелия сосудов; *IGF* (англ. *insulin-like growth factor*) – инсулиноподобный фактор роста; *IGFR-1* (англ. *insulin-like growth factor receptor 1*) – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; *IRS1* (англ. *insulin receptor substrate 1*) – субстрата инсулинового рецептора 1; *PI3K* (англ. *phosphatidylinositol-3-kinase*) – фосфатидилинозитол-3-киназа; *PIP2* (англ. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) – фосфатидилинозитол-дифосфат; *PIP3* (англ. *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) – фосфатидилинозитол-трифосфат; *PTEN* (англ. *phosphatase and tensin homolog*) – гомолог фосфатазы и тенсина; *mTORC1/2* (англ. *mammalian target of rapamycin complex 1/2*) – комплекс мишень рапамицина млекопитающих 1/2; *S6K* (англ. *S6 kinase*) – S6 киназа; *4EBP1* (англ. *factor 4E-binding protein 1*) – 4E-связывающий белок

Вследствие разных мутаций происходит усиление активности PI3K, что приводит к активации АКТ и mTOR, которые регулируют многие метаболические процессы, поддерживающие клеточный биосинтез. Противоположным по действию PI3K является белок PTEN – важный опухолевый супрессор (рис. 3). Мутации, вызывающие ингибирование PTEN или полную его потерю, приводит к чрезмерной активации сигнального пути PI3K.

В результате активации сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR происходят изменения в обмене веществ, связанные с ростом экспрессии генов, влияющих на протекание гликолиза и на стимуляцию работы разных гликолитических ферментов. АКТ стимулирует транскрипцию и трансляцию глюкозных переносчиков и ферментов, например, гексокиназы. Увеличивается активность семейства глюкозных переносчиков GLUT, отвечающих за транспорт глюкозы вдоль градиента концентраций, что коррелирует с неблагоприятными прогнозами [26]. Кроме того, АКТ-зависимая стимуляция влияет на активацию mTOR (рис. 3). Фосфорилированный mTORC1, субстрат АКТ влияет на рибосомный белок S6, который усиливает трансляцию и стимулирует рост клеток.

В целом, усиления действия АКТ может быть достаточно, чтобы вызвать включение гликолитического метаболизма в раковых клетках. mTOR является активатором транскрипционного фактора HIF1 α , который регулирует функции глюкозных транспортеров и ферментов, работу монокарбоксилатного транспортера, участвующего в выводе накопленного лактата из клетки. Таким образом, сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR влияет на экспрессию генов, ответственных за аэробный гликолиз, и разрушение этого сигнального пути способствовало бы возвращению метаболизма клетки к окислительному фосфорилированию, как главному источнику АТФ и сняло бы многие преимущества к выживанию у опухолевых клеток, полученные за счет перехода к другому типу катаболизма глюкозы [18].

1.4. Ингибирование PI3K/AKT/mTOR пути и его составных частей

Создание ингибиторов составных частей этого пути давно является важной целью исследований по получению потенциальных противораковых препаратов. Например, NVP-ВКМ120 Vuparlisip (рис. 4), который представляет собой производное 2,6-диморфолино-пиримидина и является селективным ингибитором всех четырёх изоформ PI3K первого класса, не проявляя существенной активности по отношению к mTOR. Важную роль в структуре этого соединения играют морфолиновые группы, так как кислород в этом случае выступает как акцептор водородной связи с аминогруппой Val851, входящего в белок изоформы PI3K α , а также аналогичное взаимодействие азота в пиридинильном заместителе. Он затормаживает активную пролиферацию раковых клеток и стимулирует у них способность к апоптозу. Vuparlisip также показывает хорошую пероральную биодоступность у мышей [27]. В целом, исследования показывают, что NVP-ВКМ120 Vuparlisip достаточно безопасный и переносимый препарат, токсичность которого проявляется, в основном, в виде гипергликемии, сыпи, тошноты и изменений в настроении [28]. Также была показана возможность его комбинирования с другими препаратами, применяющиеся для лечения рака молочной железы в настоящее время [27, 29]. Например, проводились исследования в комбинации с ингибиторами mTOR, такими как рапамицин и эверолимус, показывающие замедление роста раковых клеток [21].

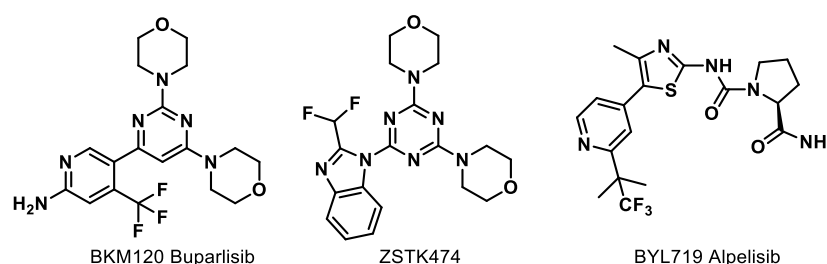


Рисунок 4. Ингибиторы PI3K пути

Еще одним ран-ингибитором³ PI3K пути является ZSTK474 (рис. 4), который аналогично ВКМ120 содержит морфолин-замещенный гетероатомный

³ Ран-ингибитор – неселективный ингибитор, влияющий на все формы данного белка.

фрагмент в своей структуре. Он ингибирует пролиферацию раковых клеток посредством остановки пресинтетической фазы клеточного цикла, блокирует VEGF⁴-индуцированную миграцию клеток, способствующую ангиогенезу, т.е. формированию новых кровеносных сосудов из уже существующих. ZSTK474 демонстрирует сильную противоопухолевую активность, например, по отношению к саркомам [30-31].

Новые исследования больше направлены на испытания селективных ингибиторов α -изоформы PI3K, чем на препараты, замедляющие активность рап-PI3K. Такая избирательность позволила бы поддерживать высокую эффективность при ограниченной активности. Среди таких ингибиторов отмечают BYL719 Alpelisib (рис. 4) [32], уже применяющегося для лечения рака молочной железы в сочетании с фулвестрантом под торговым названием Piqray.

Как уже было отмечено, важной целью противораковой терапии также является создание ингибиторов mTOR. Первым доступным ингибитором mTOR был рапамицин или сиролимус (рис. 5), который изначально разрабатывался как иммуносупрессант при трансплантациях, для устранения отторжения пересаженных органов. Используются аналоги рапамицина, так называемые рапалоги. Например, для лечения почечно-клеточного рака был разработан и впоследствии одобрен темсиролимус (рис. 5). Его эффект выражается в остановке клеточного цикла на пресинтетическом периоде интерфазы, а также торможении ангиогенеза за счет снижения синтеза VEGF [33].

Эверолимус – еще один одобренный FDA⁵ США для использования ингибитор mTOR. Он применяется, главным образом, для женщин в постменопаузе, у которых выявлен гормон-положительный рак молочной железы. Эверолимус также одобрен для лечения других видов рака, таких, как почечно-клеточный рак, некоторые опухоли поджелудочной железы [19].

⁴ VEGF (англ. vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов.

⁵ FDA (англ. Food and Drug Administration) – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

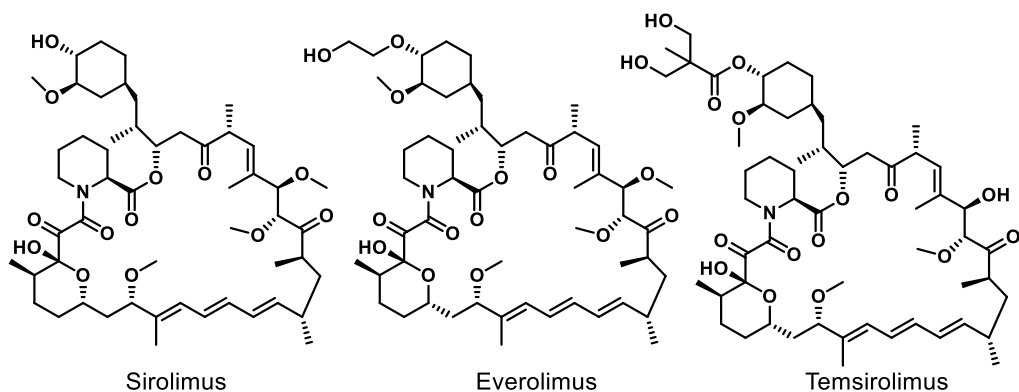


Рисунок 5. Ингибиторы mTORC1

Все эти препараты являются аллостерическими ингибиторами mTORC1 (т.е. воздействуют на молекулы вне её активного центра), и не влияют на mTORC2. Подобное действие на один комплекс провоцирует негативную обратную реакцию со стороны других регуляторных механизмов и механизмов резистентности, что уменьшает их эффективность в виде монотерапии [34]. У женщин, принимающих эверолимус для лечения рака молочной железы, часто развивается рецидив и прогрессирование опухоли. Вследствие ограниченности эффективности разрабатываются новые двойные ингибиторы, влияющие сразу и на mTORC1, и на mTORC2 (рис. 6). К ним относятся, например, INK128 (Sapanisertib) [35], который проходит клинические испытания и показывает приемлемую переносимость пациентами, AZD2014 (Vistusertib) [36], который ограничивает пролиферацию раковых клеток и может потенциально использоваться при лечении рака молочной железы, имеющего устойчивость в гормональной терапии и рапалогам [19]. Среди побочных эффектов от приема ингибиторов mTOR часто встречается гипергликемия⁶ и гиперлипидемия⁷. Пациенты, принимающие эверолимус, могут быть предрасположены к инфекциям, в том числе бактериальным, грибковым и вирусным.

⁶ Гипергликемия – состояние, характеризующееся повышенным уровнем глюкозы в крови.

⁷ Гиперлипидемия – состояние, характеризующееся высоким содержанием липидов и/или липопротеинов.

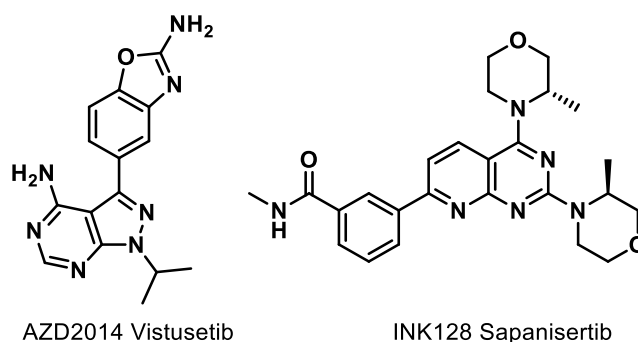


Рисунок 6. Двойные ингибиторы mTORC1/2

Из приведенных примеров видно, что PI3K/AKT/mTOR представляет собой сложную сеть взаимосвязанных механизмов, и снижение активности одного из них приводит к активации других путей, которые бы компенсировали действие недостающего элемента. Так как показано, что PI3K α вносит существенный вклад в развитие опухоли, регулируя пролиферацию и метаболические процессы, то ингибирование этой изоформы является важной целью для лечения рака. Кроме того, было выявлено, что при селективном угнетении mTOR происходит активация пути PI3K α , поэтому перспективным является создание двойных ингибиторов PI3K/mTOR. Среди уже полученных низкомолекулярных ингибиторов отмечают BEZ235 – производное имидазохинолина, который селективно уменьшает активность PI3K первого класса, а также оба комплекса mTORC1 и mTORC2. Оно замедляет пролиферацию раковых клеток, вызывая остановку клеточного цикла в G1-периоде интерфазы. Сообщается о его высокой активности против многих видов рака, например, рака молочной железы, лёгких, яичников и других [37]. Еще одно соединение, влияющее на активность всех изоформ первого класса PI3K, но обладающее значительно меньшей эффективностью для подавления mTOR – GDC-0941 проходит клинические испытания [38]. Также был получен двойной ингибитор PI3K/mTOR (PKI402) – производное триазолпиримидина, которое проявляет достаточную эффективность, но обладает низкой растворимостью.

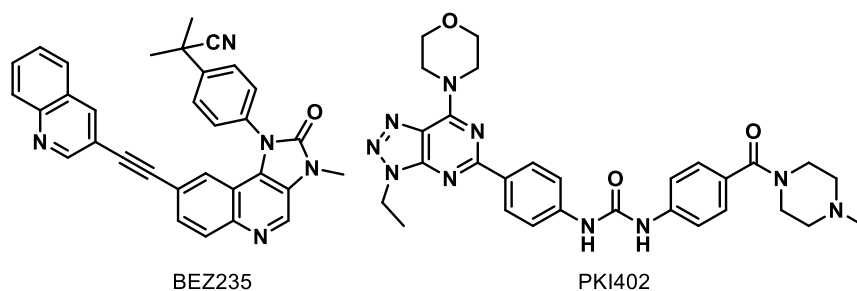
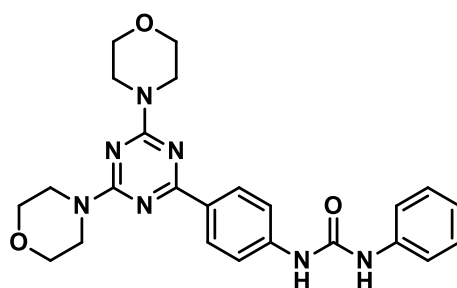


Рисунок 7. Двойные ингибиторы PI3K/mTOR

Анализ приведенных примеров, показал перспективность структур, содержащих пиримидиновое ядро или его аналоги, для синтеза потенциальных двойных ингибиторов PI3K/mTOR. Одной из таких структур является 1,3,5-триазин по следующим причинам. Во-первых, он имеет моноциклическую симметричную структуру, подобную пиримидиновому циклу с двумя азотами в 1,3-положениях. Таким образом, этот цикл мог бы имитировать пиримидиновое ядро, для производных которого уже имеется ряд накопленных исследований. Во-вторых, наличие трёх атомов азота придаст полярность всей молекуле и повлияет на биодоступность и повышенную растворимость в воде. Еще одной важной чертой предполагаемого соединения является наличие двух морфолиновых заместителей. Как уже отмечалось ранее, кислород в структуре морфолина участвует в образовании водородных связей с валином в каталитическом домене PI3K α , но при этом он окисляется PI3K α , что вызывает уменьшение активности. Это говорит о необходимости двух групп для того, чтобы даже после метаболического окисления одного морфолина, оставался бы второй заместитель, который продолжал бы взаимодействие с белком. Таким образом, было подобрано соединение, удовлетворяющее перечисленным требованиям (рис. 8).



PI3K α IC₅₀ = 3,0 nM
 PI3K γ IC₅₀ = 27,0 nM
 mTOR IC₅₀ = 3,9 nM
 clogP = 2,5
 Solubility at pH 7,4 < 1 μ g/mL

Рисунок 8. Базовая структура ингибитора PI3K/mTOR

Установлено, что данное соединение, как показано на рисунке 9, образует водородную связь с Val851 через кислород в морфолиновой группе, ещё две через NH-группы в участке мочевины с Asp810 и одну с лизином (Lys802).

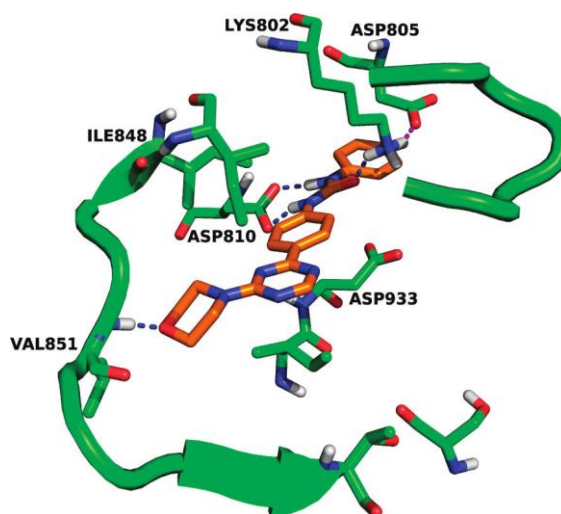


Рисунок 9. Взаимодействие модельного соединения с PI3K γ [20]

В ходе исследований было показано, что это соединение обладает ингибирующими свойствами по отношению к двум изоформам PI3K α , PI3K γ и mTOR, но умеренной активностью в тестах клеточной пролиферации, а именно MDA-361 (аденокарциномы молочной железы), PC3MM2 (карцинома предстательной железы), что объясняется плохой растворимостью и проницаемостью соединения.

Авторами [20] изучены аналогичные соединения, в которых вместо фенильного заместителя у мочевины находились алкильные, фтор- и хлорсодержащие группы, насыщенные гетероциклы. По результатам SAR⁸-исследований было установлено, что для наибольшей эффективности против PI3K α предпочтительно, чтобы эта группы была арильным заместителем. Для повышения ферментативной и клеточной активностей необходимо наличие полярных заместителей в арильном кольце, поскольку они взаимодействуют с растворителем. Таким образом, было выбрано соединение PKI587, которое

⁸ SAR (англ. structure–activity relationship) исследования направлены на изучение взаимосвязи между химической структурой молекулы и ее биологической активностью.

показывает высокую ферментативную и клеточную активность, растворимость (рис. 10).

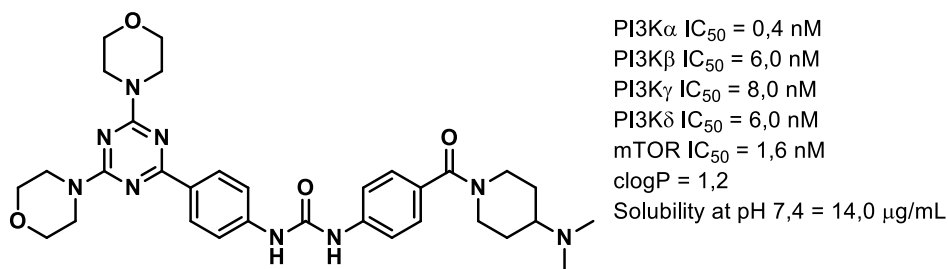


Рисунок 10. Ингибитор pan-PI3K/mTOR – PKI587

В результате проведённых испытаний показано, что данный продукт является ингибитором pan-PI3K/mTOR пути, а также эффективно замедляет клеточный рост и провоцирует апоптоз за счет подавления фосфорилирования белков этого сигнального пути. Таким образом, указанное соединение является эффективным ингибитором PI3K/mTOR *in vitro* и *in vivo* [20].

1.5. Роль монокарбоксилатных переносчиков, их ингибирование

Поскольку опухолевые клетки в основном полагаются на высокую скорость аэробного гликолиза, а не окислительного фосфорилирования для того, чтобы производить достаточно энергии для поддержания активной пролиферации, то это сказывается на количестве выделяемого лактата – конечного продукта гликолиза. Чрезмерное накопление молочной кислоты привело бы к внутриклеточному подкислению и апоптозу, однако существуют специальные механизмы для её транспорта из клетки и нормализации pH. Это обеспечивает прогрессирование гликолиза, вносит вклад в кислое микроокружение опухоли. Гомеостаз, т.е. сохранение постоянного состава внутренней среды, лактата поддерживается с помощью семейства мембранных белков, называемых монокарбоксилатными транспортерами (англ. monocarboxylate transporter – MCT), так же известное как семейство транспортеров SLC16A.

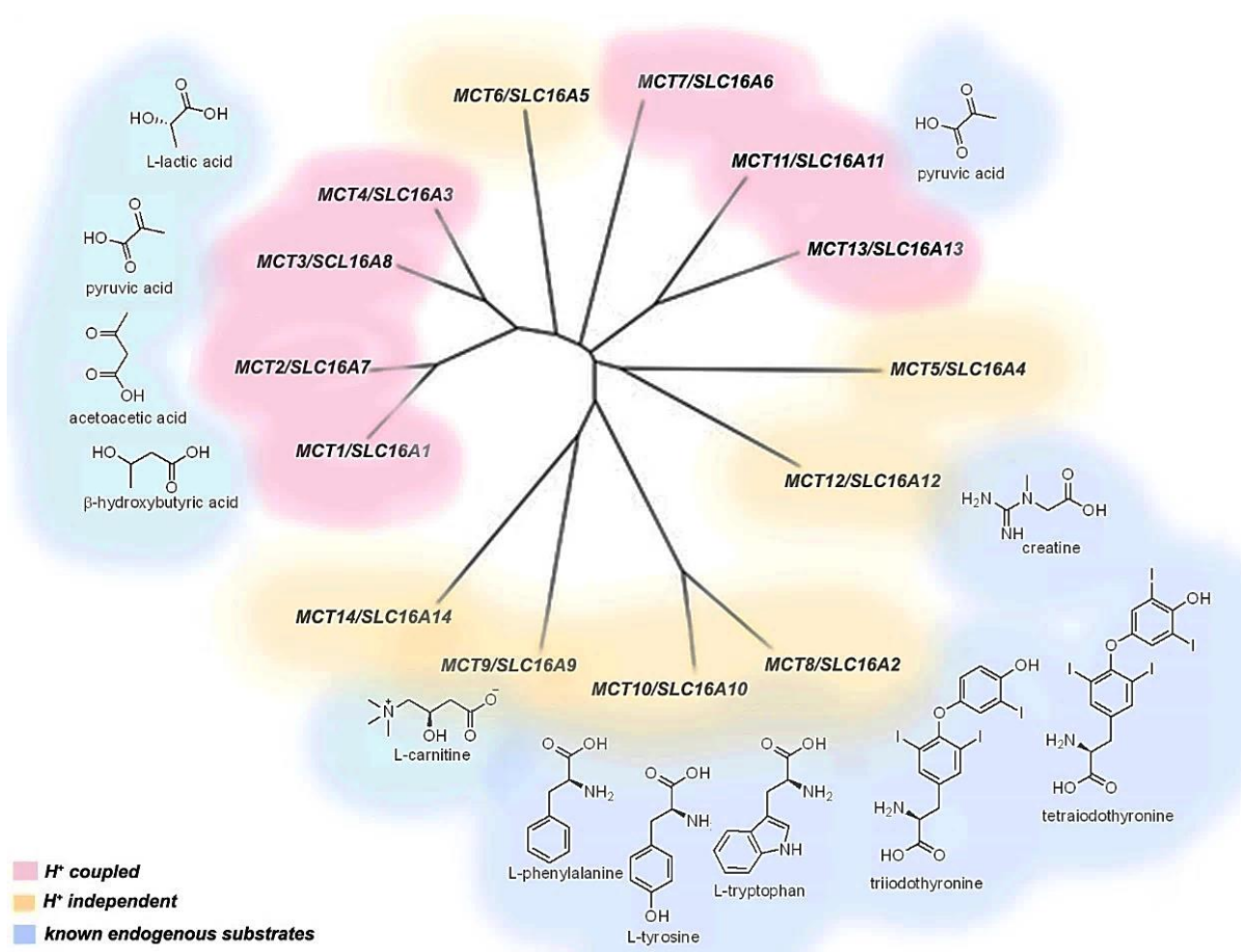


Рисунок 11. Предсказанное филогенетическое древо членов семейства монокарбоксилатных транспортеров и соответствующие известные эндогенные субстраты [37]

Всего известно 14 монокарбоксилатных транспортеров (рис. 11), среди которых только MCT1, MCT2, MCT3 и MCT4 переносят через клеточную мембрану в протон-связанном обмене небольшие монокарбоксилаты, такие как лактат, пируват и кетоновые тела (ацетоуксусная и β-оксимасляная кислоты). Для MCT5-7, MCT13, MCT14 эндогенные субстраты у людей не выявлены. Основными различиями между 14 изоформами MCT кроме специфичности субстратов, являются их тканевое распределение и внутриклеточная локализация, а также регуляция их экспрессии [39].

MCT1 обладает умеренным сродством к субстратам и облегчает либо приток, либо отток веществ в зависимости от концентрации H⁺. Поэтому он

распространен практически во всех тканях, особенно в зависящих от вывода или поглощения энергетических метаболитов.

МСТ2, наоборот, обладает высоким сродством к субстрату и экспрессируется в тканях, которые зависимы от поглощения веществ в качестве топлива для окислительного фосфорилирования, глюконеогенеза, липогенеза и, следовательно, в основном встречается в нейронах, печени, почках, а также в желудке, сердце, поджелудочной железе и т.д.

Экспрессия МСТ3 ограничивается пигментным эпителием сетчатки, где он, в первую очередь, ответственен за отток лактата.

МСТ4 обладает низким сродством к определенным субстратам, но при этом характеризуется высокой пропускной способностью по отношению к лактату, как основного субстрата. Этот транспортер главным образом ответственен за вывод лактата из высокогликолитических клеток, например, в мышечных тканях и лейкоцитах. Также было показано, что МСТ4 встречается в клетках почек, тонкой кишки и плаценты [40].

Исследования показывают, что в злокачественных опухолях заметно повышается экспрессия МСТ1, МСТ4 или обоих [41]. Их образование регулируется двумя основными онкогенными факторами транскрипции: Мус и HIF1 α , которые вызывают гиперэкспрессию ключевых белков, поддерживающих аэробный гликолиз, ферментов и глюкозных транспортеров [42]. Ингибиторы МСТ нарушают гипоксический метаболизм опухоли, который обуславливает устойчивость к стандартной химио- и лучевой терапии [43]. Такими трудно поддающимися лечению опухолями являются трижды негативный рак молочной железы и глиомы. Вследствие высокой экспрессии этих транспортеров в опухолевых клетках, МСТ представляют собой мишень для специфической доставки химиотерапевтических препаратов к раковой ткани. Например, исследования показывают, что противоопухолевый аппарат 3-бромпируват, ингибитор гексокиназы, доставляется в клетку с помощью МСТ1 [44].

Таким образом, ингибирование МСТ1 и МСТ4 может быть эффективным способом лечения за счет нарушения метаболизма опухолевых клеток, что приведёт к снижению способности к выживанию раковых клеток.

1.6. Ингибиторы монокарбоксилатных транспортеров

Были описаны многие слабые ингибиторы МСТ1, т.е. эффективные на высоких микромолярных концентрациях, такие, как α -циано-4-гидроксикоричная кислота, флоретин и родственные флавоноиды, статины [42]. Флавоноиды – большая группа полифенольных фитохимических веществ, таких как флоретин, кверцетин, лютеолин, морин и т.д. (рис. 12), которые содержатся в широко потребляемых растительных продуктах, например, в луке, зеленом чае, облепихе и др. Исследования показывают их ингибирующую активность по отношению к МСТ1 и МСТ6 [45].

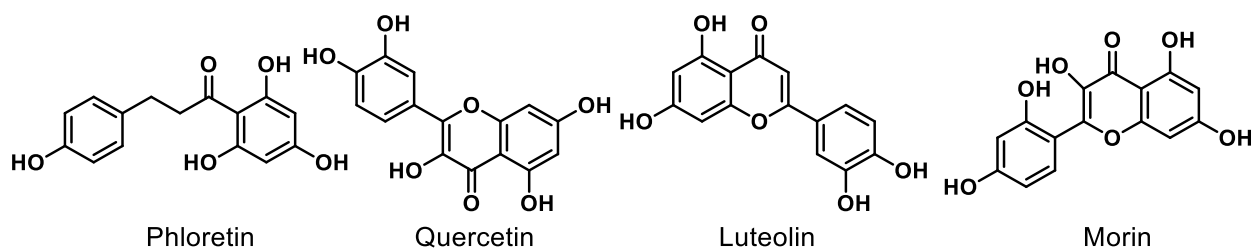


Рисунок 12. Флавоноиды – потенциальные ингибиторы монокарбоксилатных транспортеров

Статины – наиболее широко используемая группа препаратов для снижения уровня холестерина. Было выяснено, что липофильные статины, такие как флувастатин, аторвастатин, ловастатин (рис. 13), ингибируют МСТ4 [46].

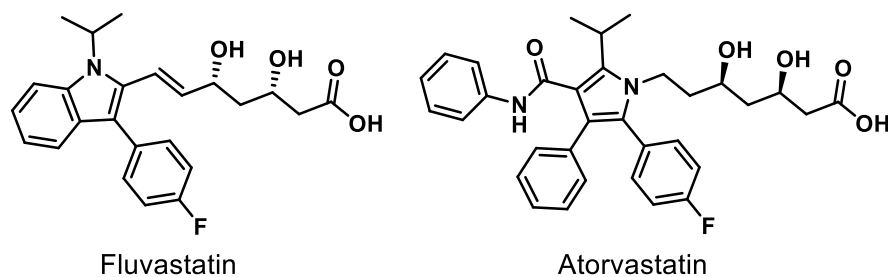


Рисунок 13. Липофильные статины, проявляющие ингибирующие свойства по отношению к МСТ4

Противоопухолевый препарат лонидамин (рис. 14) эффективен для повышения чувствительности раковых клеток к другим химиотерапевтическим препаратам, эту активность отчасти объясняют нарушением транспорта лактата за счет неспецифического ингибирования МСТ1, МСТ2 и МСТ4 [39]. Лонидамин – впервые упоминается как ингибитор аэробного гликолиза в 1981 году [47], проводятся клинические испытания по применению его в сочетании с другими противораковыми агентами для лечения рака молочной железы, яичников и лёгких [48-50].

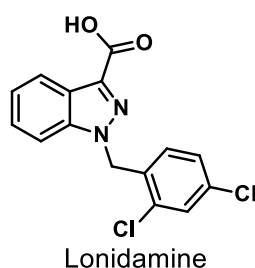


Рисунок 14. Лонидамин – неспецифический ингибитор МСТ1, МСТ2, МСТ4

Разрабатываются селективные ингибиторы, действие которых направлено только на МСТ1 и МСТ2 (рис. 15). К примеру, AZD3965 проходит клинические испытания для лечения пациентов с раком желудка и показывает свою эффективность против мелкоклеточной формы рака лёгких [39]. В тоже время, некоторые вещества этой группы оказывают сильное ингибирующее действие на пролиферацию лейкоцитов, что определяет их использование в иммуносупрессивной терапии. Так, мощным ингибитором транспорта лактата является AR-C117977, блокирующий деятельность МСТ1 и МСТ2, и вследствие этого приводящий к накоплению молочной кислоты внутри Т-лимфоцитов и вызывающий их угнетение [51].

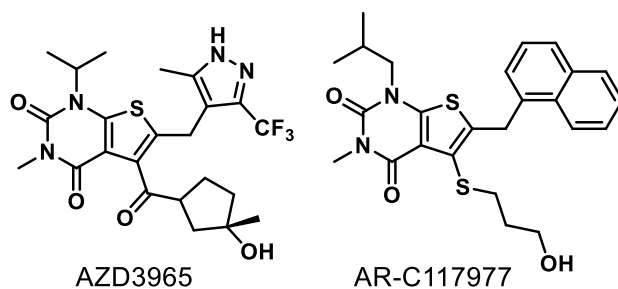


Рисунок 15. Ингибиторы МСТ1/2

К настоящему моменту известно, МСТ2 играет, скорее всего, меньшую роль, чем МСТ1 и МСТ4 для транспорта лактата в опухолевых клетках человека. Поэтому перспективным является разработка специфических ингибиторов МСТ4. Сообщается об эффективности биндарита, уже известного противовоспалительного агента [52], в качестве селективного препарата для подавления МСТ4. Выясняя влияние структуры на эффективность ингибирования, авторы [53] рассмотрели влияние фибратов⁹ на транспорт лактата с помощью МСТ4 (рис. 16).

В результате проведенных исследований выяснено, что безафибрат, фенофибрат анион и клинофибрат селективно ингибировали транспорт лактата через МСТ4, в то время как клофибрат анион – нет. Сравнивая структуры этих соединений, было предположено, что для получения соответствующей активности необходимо, чтобы изобутиратная часть и два ароматических кольца соединялись двухатомным линкером. Также проведено сравнение активности лонидамина, неселективного ингибитора МСТ, и его дехлорированной формы (ВІС), и установлено, что для увеличения подавляющей способности необходимо введение атомов хлора в орто- и/или пара-положение бензильной группы, связанной с индазолом через атом азота. На основании этих выводов авторы [53] исследовали ингибирующее действие противовоспалительного препарата биндарита и обнаружили, что он обладает гораздо больше ингибирующей способностью МСТ4, чем рассмотренные фибраты и другие производные бензилиндазола.

⁹ Фибраты – это группа гиполипидемических препаратов.

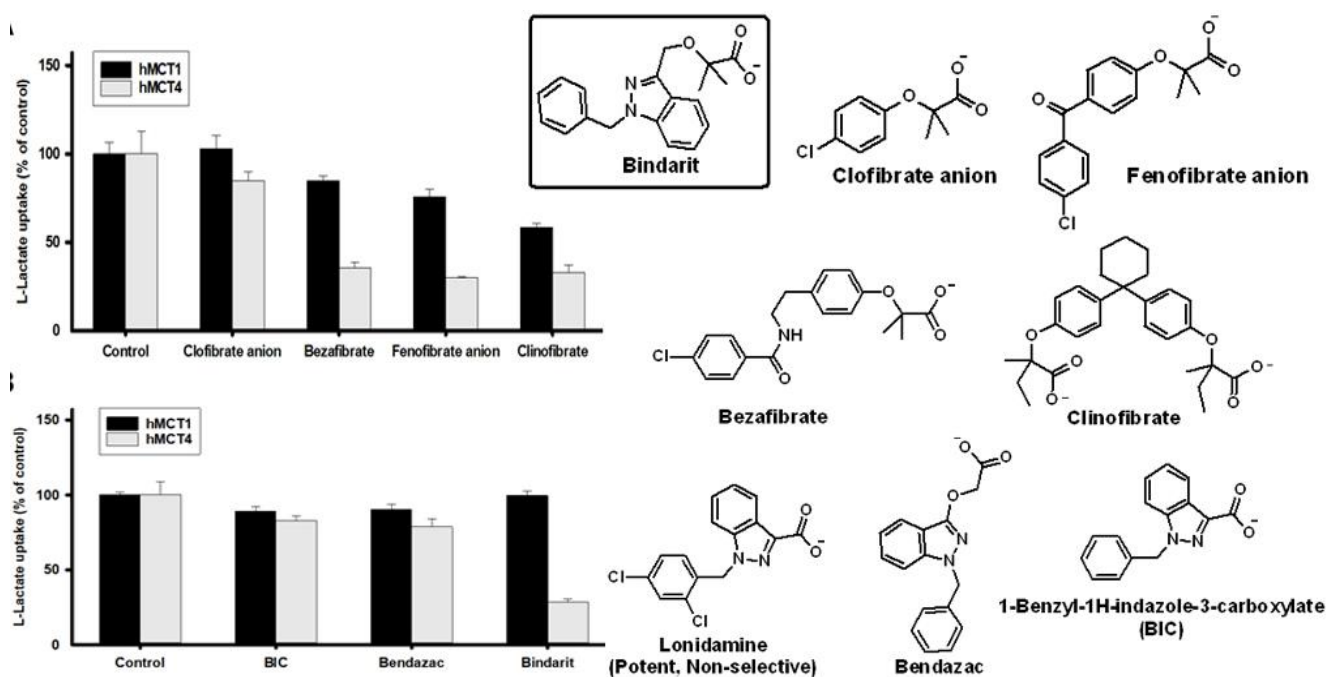
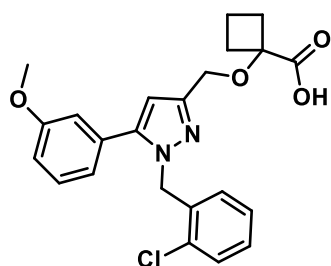


Рисунок 16. Влияние производных изобутирата на поглощение L-лактата через MCT1 и MCT4 [53]

На основании сравнительного анализа существующих ингибиторов монокарбоксилатных транспортеров и приведённых выше рассуждений, авторами [54] была предложена структура двойного ингибитора MCT1/MCT4. Активность описанного соединения была испытана на клеточных линиях рака молочной железы по отношению к MCT1 (BT20) и по отношению к MCT4 (MDA-MB-231) (рис. 17).



MCT1 IC_{50} = 1200 nM (BT20)
MCT4 IC_{50} = 55 nM (MDA-MB-231)

Рисунок 17. Двойной ингибитор MCT1/4

Использование селективных ингибиторов MCT1, MCT4 или двойных ингибиторов MCT1/MCT4 может остановить остановку роста опухоли или увеличить чувствительность к химио- или радиотерапии, но этого может

оказаться недостаточно для гибели опухолевых клеток в значительных количествах.

1.7. pH-чувствительные линкеры

Для того, чтобы обеспечить достижение необходимой терапевтической концентрации препарата в опухолевых клетках, а в здоровых поддержать её на безопасном уровне, а также эффективно доставить лекарство внутрь клетки, необходимо использовать пролекарственные формы активных соединений со специфическими линкерами. Поскольку в раковых клетках из-за аэробного гликолиза происходит интенсивное образование лактата, то микроокружение опухоли имеет значения pH ниже ($\text{pH} \approx 6,8$) физиологического ($\text{pH} \approx 7,4$) [55], за счет вывода молочной кислоты монокарбоксилатными транспортерами. Поэтому, целесообразно применять pH-чувствительные линкеры (рис. 18), предназначенные для селективного гидролиза при кислом pH, что может быть использовано для контролируемого высвобождения терапевтических средств в месте их действия. В этой области в качестве кислотно-лабильных систем применяют гидразоны, ацетали, силоксаны, ортоэфиры и др. [56]

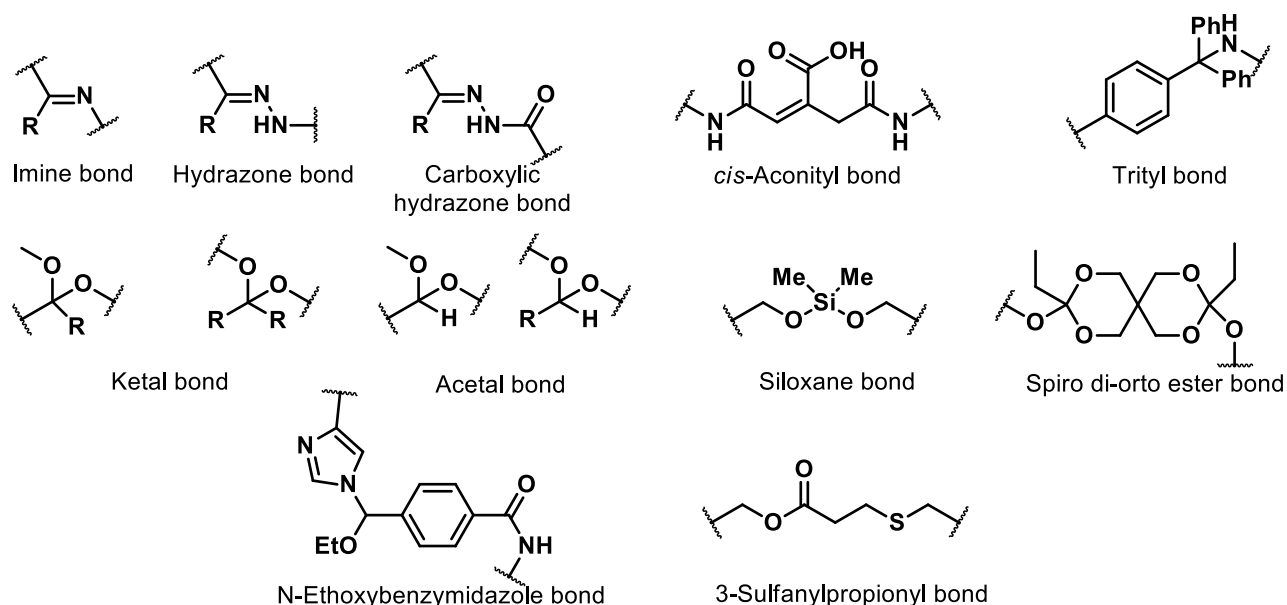


Рисунок 18. Примеры чувствительных к кислой среде связей [56]

Авторами [57] предлагается использовать pH-чувствительный линкер на основе фосфорамидатной структуры, который может быть применен для высвобождения аминокислотных молекул лекарственных препаратов при различных значениях pH (рис. 19).

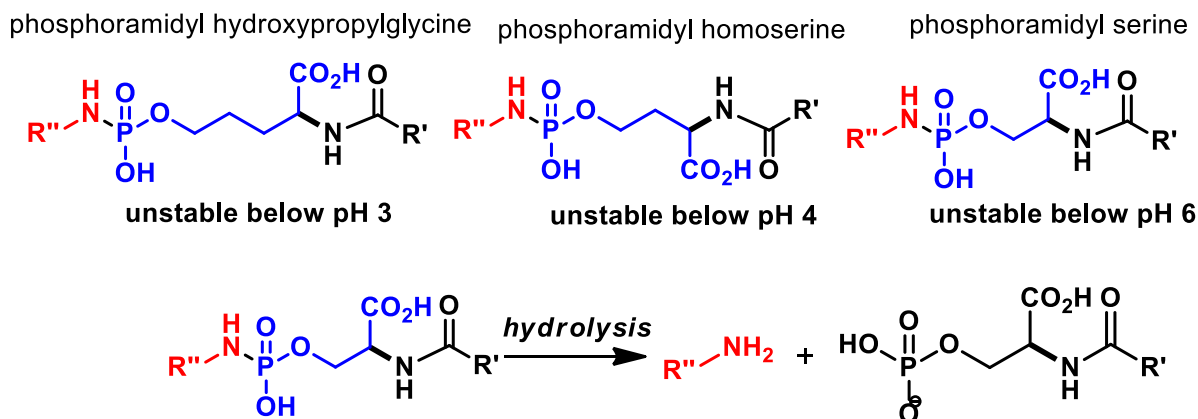


Рисунок 19. pH – чувствительные линкеры на основе фосфорамидатной структуры [57]

В ходе исследования замечено, что фосфорамидаты, связанные с гидроксильной группой серина, проявляли лабильность при pH ниже 6,5, но при этом оставались стабильными при физиологическом pH. Предполагается, что любая слабокислая группа, находящаяся рядом с центральным фосфорамидатным участком, может активировать линкер. Эта идея легла в основу исследования аналогичных соединений, содержащие протонированную пиридиновую группу. Авторы [57] предполагают, что гидролиз фосфорамидата, протекает по внутримолекулярному механизму общего кислотного катализа (рис. 20).

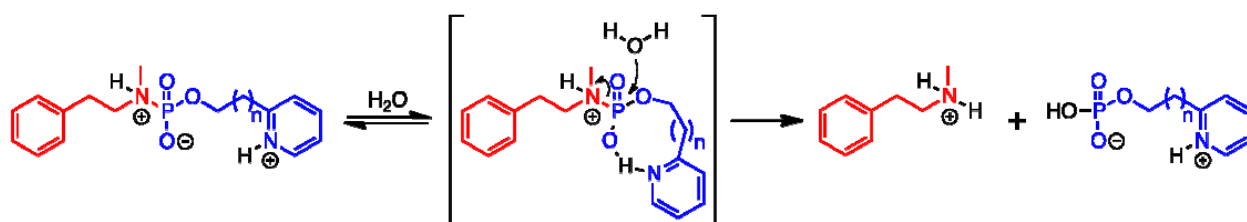


Рисунок 20. Механизм гидролиза фосфорамидата [57]

На основании выше изложенных примеров нами предложена структура гибридного ингибитора, действие которого направлено на две ключевые особенности, отвечающие за регулирование аэробного гликолиза и поддержание

самого процесса, а именно на сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR и монокарбоксилатные транспортеры (рис. 21).

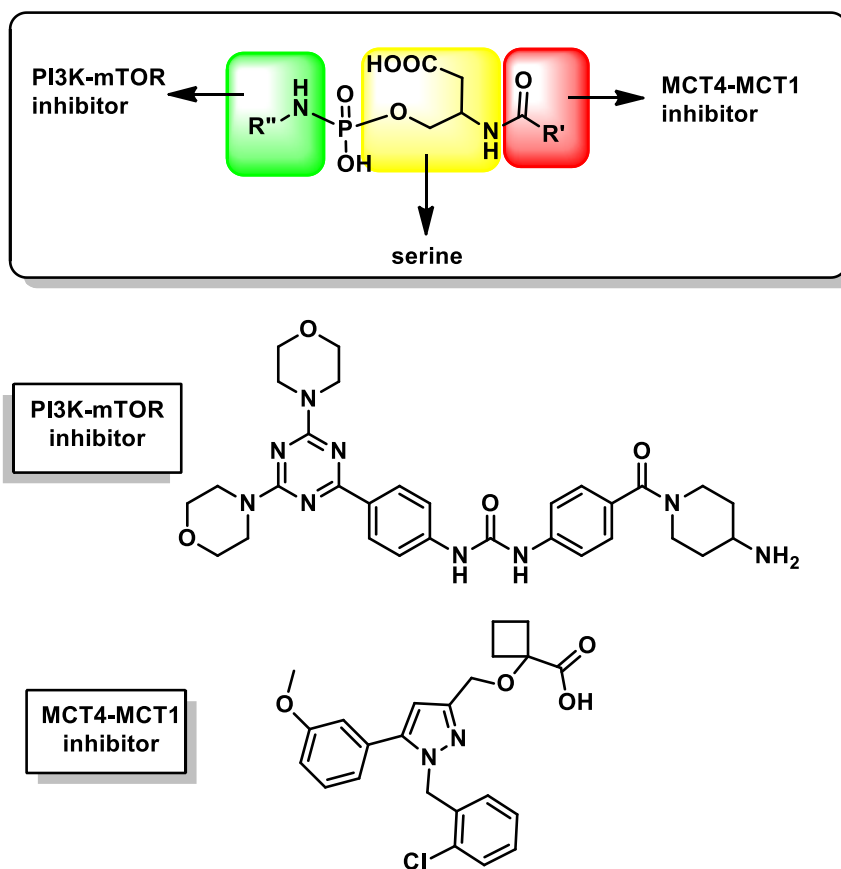


Рисунок 21. Предлагаемый противоопухолевый агент, нацеленный на ингибирование PI3K/mTOR сигнального пути и MCT1/4

В связи с этим, целями данной работы является разработка методов синтеза ингибиторов сигнальных путей, сопряженных с эффектом Варбурга, и синтез pH-чувствительного гибридного соединения, для которого планируется оценка цитотоксической активности по отношению к ряду опухолевых клеток, а также изучение его способности к контролируемому расщеплению при заданных значениях pH.

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью данной работы является разработка методов синтеза ингибиторов сигнальных путей, сопряженных с эффектом Варбурга, и синтез рН-чувствительного гибридного соединения, для которого планируется оценка цитотоксической активности по отношению к ряду опухолевых клеток, а также изучение его способности к контролируемому расщеплению при заданных значениях рН. Одна из частей этой молекулы является ингибитором PI3K/mTOR сигнального пути, который играет ключевую роль в пролиферации, росте, выживании и метаболизме раковой клетки. Другая – ингибитор монокарбоксилатных переносчиков МСТ1/МСТ4, которые регулируют транспорт лактата – основного метаболита углеводного обмена опухолевых клеток. В качестве базового соединения для ингибирования киназ PI3K/mTOR был выбран РКИ587 (рис. 22), ввиду высокой аффинности к таргетным киназам, селективности действия и хорошей биодоступности. В качестве ингибитора монокарбоксилатного транспортера МСТ1/МСТ4 было выбрано соединение, представленное на рисунке 22, ввиду высоких показателей антипролиферативной активности *in vitro*, однако в литературе не было детального описания синтеза указанного вещества. В связи с этим данная работа была направлена на решение следующих задач:

1. Оптимизация метода синтеза известного ингибитора PI3K/mTOR **9**;
2. Разработка метода получения ингибитора МСТ1/МСТ4 **30**;
3. Дизайн бивалентного ингибитора на основе веществ **9** и **30**, содержащего рН-чувствительный линкер;
4. Оценка биологической активности бивалентного ингибитора в сравнении с индивидуальными активными молекулами.

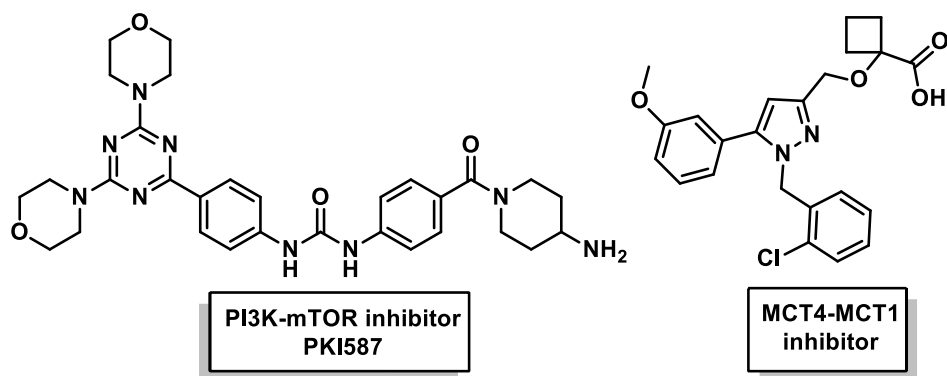


Рисунок 22. Базовые соединения – ингибиторы PI3K/mTOR и MCT1-MCT4

2.1. Получение ингибитора PI3K/mTOR

Основываясь на литературных данных [20] получения целевого соединения вначале была предложена следующая схема (схема 1).

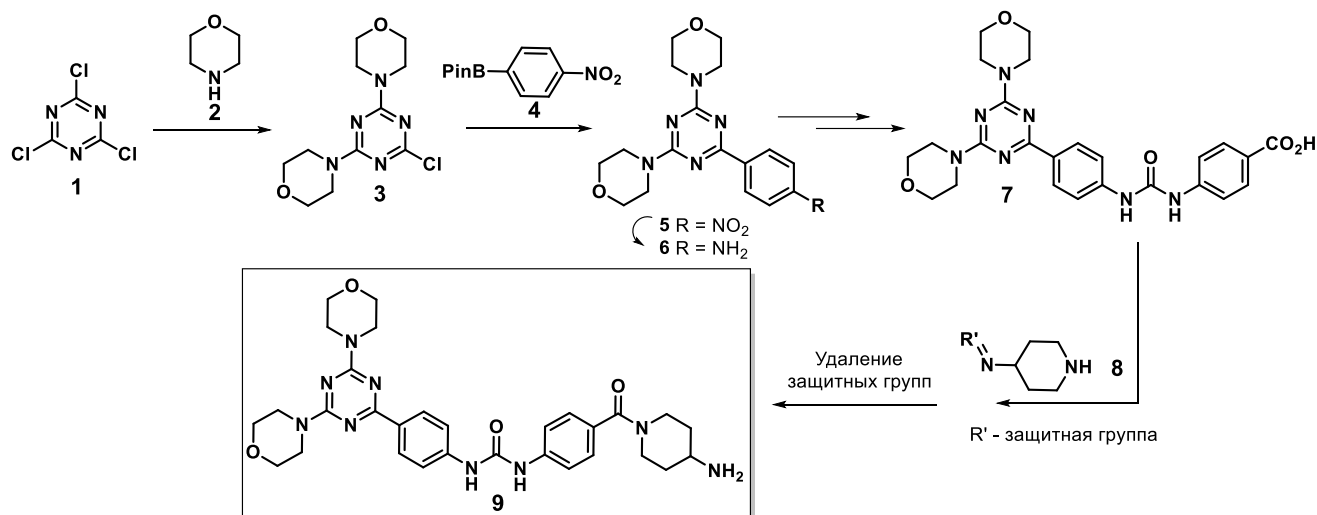


Схема 1. Предполагаемая схема синтеза ингибитора PI3K/mTOR 9

На первом этапе был получен диморфолин-замещенный триазин 3 по реакции нуклеофильного замещения между цианурхлоридом 1 и морфолином 2 с выходом 80% (схема 1).

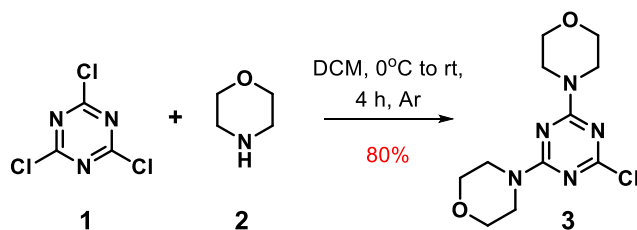


Схема 2. Синтез 2,4-диморфолин-6-хлортриазина 3

В качестве субстрата реакции кросс-сочетания Сузуки выступал пинаколовый эфир 4-нитрофенилбороновой кислоты **4**, полученный при замещении атома брома в *n*-бромнитробензоле **10** с использованием бис(пинаколато)дибора **11** в присутствии основания ацетата калия, катализатора Pd(dppf)Cl₂ с выходом 74% (схема 3).

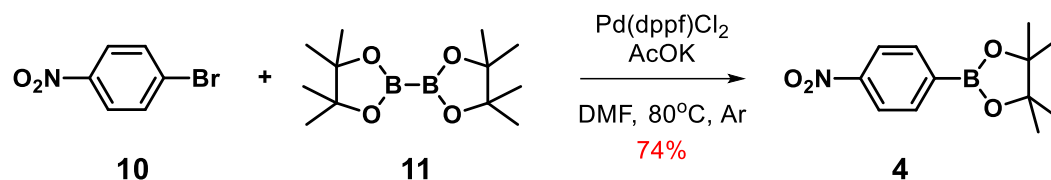
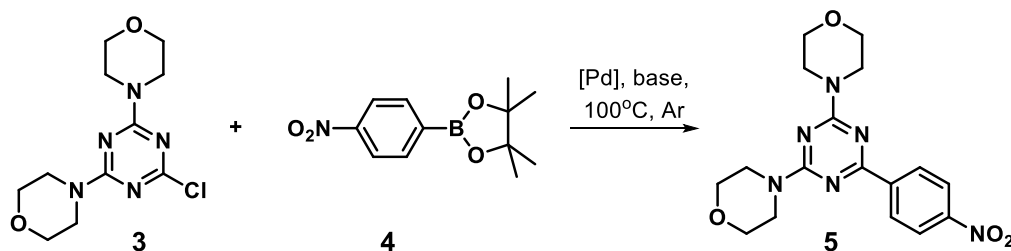


Схема 3. Синтез пинаколового эфира *n*-нитрофенилбороновой кислоты **4**

Далее для замещения атома хлора в соединении **3** на *n*-нитрофенильную группу была проведена реакция кросс-сочетания Сузуки. Скрининг условий синтеза приведен в таблице 1.

Таблица 1

Оптимизация условий кросс-сочетания Сузуки



№	Кат-р	Лиганд	Осн-е	Вода	Р-ль	Рез-т
1	Pd(PPh ₃) ₄	-	Na ₂ CO ₃ (2М в H ₂ O)	+	1,4-диоксан	-
2	Pd(PPh ₃) ₄	-	Na ₂ CO ₃	15 мкл	1,4-диоксан	-
3	Pd(OAc) ₂	DavePhos	K ₃ PO ₄	-	толуол	+ (следы)
4	Pd(OAc) ₂	DavePhos	K ₃ PO ₄	-	1,4-диоксан	-
5	Pd(OAc) ₂	S-Phos	Cs ₂ CO ₃	-	толуол	-
6	Pd(OAc) ₂	X-Phos	K ₃ PO ₄	-	толуол	-
7	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	-	K ₃ PO ₄	25 мкл	толуол	-
8	Pd(PPh ₃) ₄	-	NaOH (3 экв.)	25 мкл	1,4-диоксан	+ (следы)
9	Pd(dppf)Cl ₂	-	NaOH	25 мкл	1,4-диоксан	+ 19 %
10	Pd(PPh ₃) ₄ 50 мол. %	-	Na ₂ CO ₃	5 мкл	1,4-диоксан	+ 83 %

Как видно из таблицы 1, варьирование лиганда практически не приводило к каким-либо изменениям. Среди оснований наиболее эффективным оказался гидроксид натрия, а среди растворителей – диоксан с добавлением следовых количеств воды. Однако существенного увеличения выхода продукта реакции удалось достичь лишь при использовании субстехиометрических количеств катализатора, в связи с чем было принято решение, что использование данной методики нерационально.

В связи с полученными результатами, нами предложен другой путь получения соединения **5** на основании методики, описанной в [58] (схема 4):

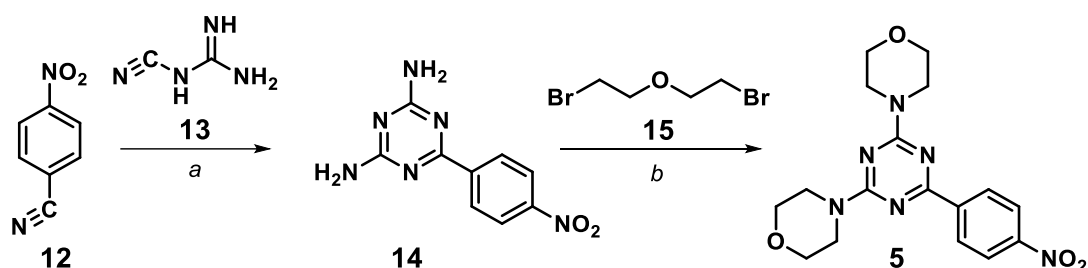


Схема 4. Синтез производного триазина **5**. Условия и реагенты: а) KOH , EtOH , $90\text{ }^\circ\text{C}$, 3 ч; б) NaH , DMF , $65\text{ }^\circ\text{C}$, 18 ч.

При взаимодействии дициандиамида **13** с *n*-нитробензонитрилом **12** в присутствии основания гидроксида калия синтезировано соединение **14** с выходом 55%. Вероятно, данное превращение протекает по механизму нуклеофильного присоединения (схема 5).

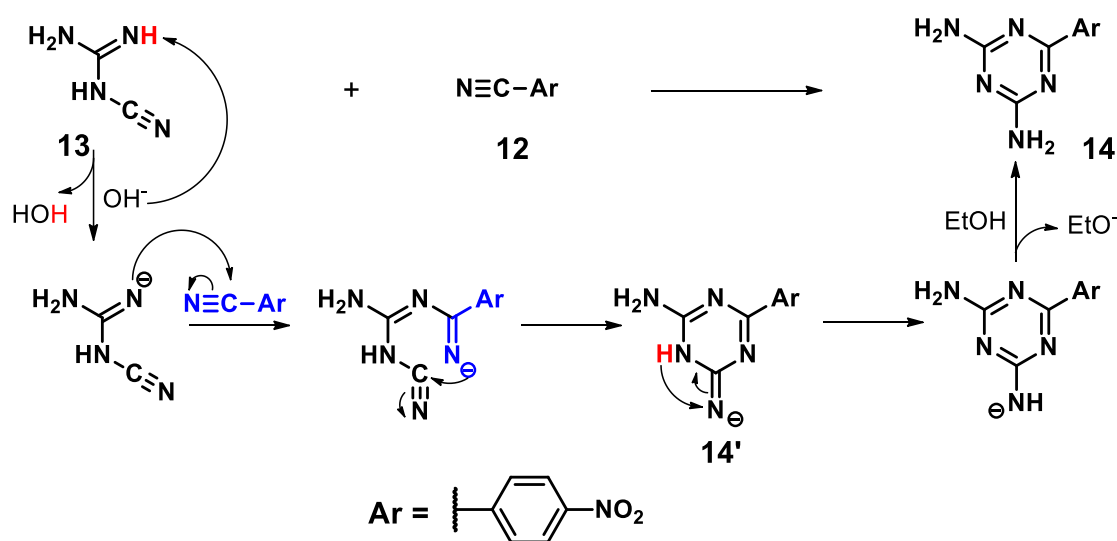


Схема 5. Вероятный механизм образования производного триазина **14**

Реакция начинается с образования азот-центрированного аниона из дициандиамида **13**, который атакует электрофильный атом углерода в составе арилнитрила **12**. На следующем этапе происходит внутримолекулярная атака отрицательно заряженного атома азота на вторую цианогруппу, после чего происходит перенос протона, сопровождающийся ароматизацией интермедиата **14'**. На последнем этапе реализуется протонирование азот-центрированного аниона и регенерация катализатора. Затем по реакции алкилирования аминогрупп в **14** сформировали морфолиновые кольца за счет взаимодействия с дибромдиэтиловым эфиром **15** (схема 6). Данный эфир синтезировали по реакции диэтиленгликоля **16** с трибромидом фосфора [59], выход продукта 91%.

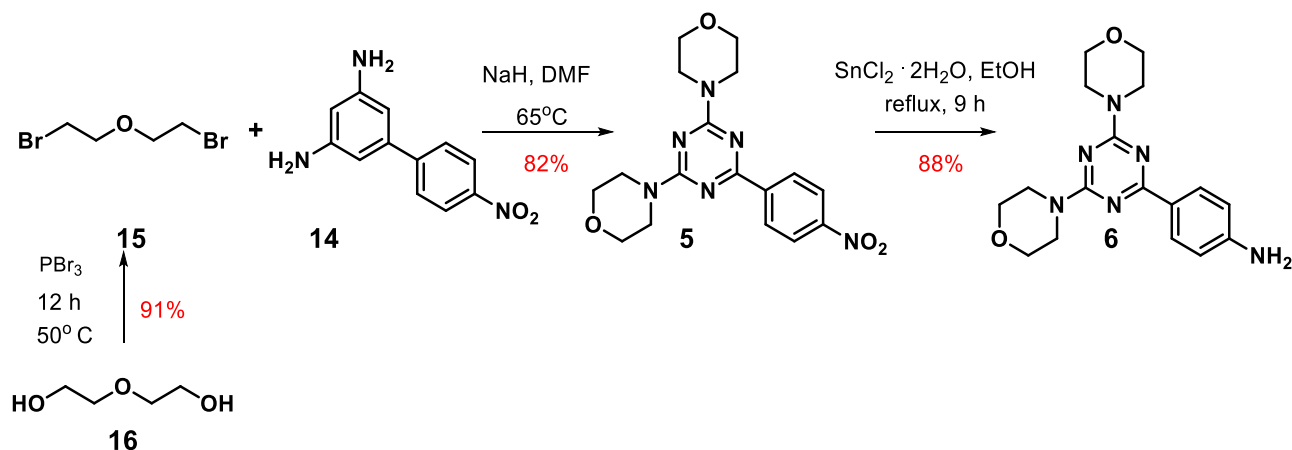


Схема 6. Синтез производного 2-(4-аминофенил)-4,6-диморфолин-1,3,5-триазина **6**

Далее провели восстановление нитрогруппы в соединении **5** до аминогруппы действием $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в этаноле (схема 6) [60]. Было установлено, что при масштабировании реакции выход продукта восстановления существенно снижается ввиду низкой растворимости исходных веществ. Предполагается, что существенное количество субстрата остается в твердой фазе и не переходит в раствор даже при длительном перемешивании и нагревании реакционной смеси (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость выхода в реакции восстановления нитрогруппы от количества используемого субстрата 5

№	n (R-NO ₂), ммоль	n (SnCl ₂ ·2H ₂ O), ммоль	Выход, %
1	0.27	1.33	88
2	0.47	2.33	49
3	0.52	2.60	29
4	5.36	26.77	15

Далее по реакции этерификации *n*-аминобензойной кислоты **17** и метанола в присутствии концентрированной серной кислоты получили метиловый эфир **18** с выходом 89% (схема 7) по методике, изложенной в [61].

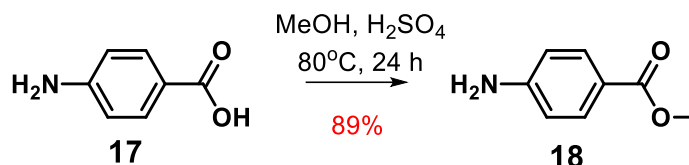
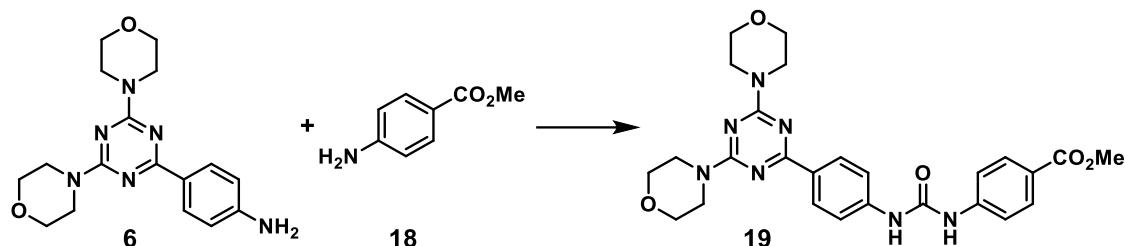


Схема 7. Получение метилового эфира *n*-аминобензойной кислоты **18**

Следующим шагом стало проведение сочетания триазольного производного **6** и эфира *n*-аминобензойной кислоты **18** (табл. 3). Первый рассмотренный нами метод предполагал использование в качестве связующего компонента и N,N'-карбонилдиимидазола (CDI) согласно [62], однако продукта в этом случае обнаружено не было. В связи с этим мы рассмотрели образование замещенной мочевины с использованием трифосгена – бис(трихлорметил)карбоната – на основании методики, изложенной в [63].

Оптимизация условий получения замещенной мочевины 19



№	Реагент	Основание	Растворитель	Температура	Результат
1	CDI	-	MeCN	0°C→rt	-
2	CDI	-	H ₂ O	0°C→rt	-
3	Трифосген	DIPEA	CHCl ₃	rt	+ 2%
4	Трифосген	Et ₃ N	1,4-диоксан	0°C→reflux	+ 15%
5	Трифосген	Et ₃ N	THF	0°C→reflux	+ 15%
6	Трифосген	Et₃N	CHCl₃	0°C→reflux	+ 87%

Взаимодействие с трифосгеном протекает по механизму нуклеофильного замещения (схема 8) [64]. Реакция начинается с образования трихлорметилкарбамата *A*, который быстро переходит в изоцианатный интермедиат *B*. Далее при действии второго амина происходит формирование замещенной мочевины *C*. Данный процесс требует присутствия акцептора кислоты, например, третичных аминов. В качестве первого аминокомпонента обычно выбирают менее нуклеофильный, в нашем случае это триазольное производное **6**.

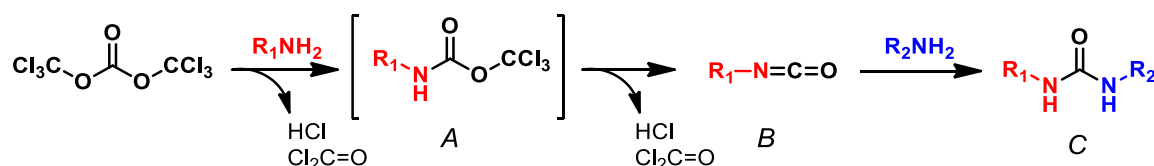


Схема 8. Механизм образования замещенной мочевины в присутствии трифосгена

Затем провели щелочной гидролиз сложноэфирной группы в соединении **19** действием метилата натрия в метаноле с выходом 76% (схема 9).

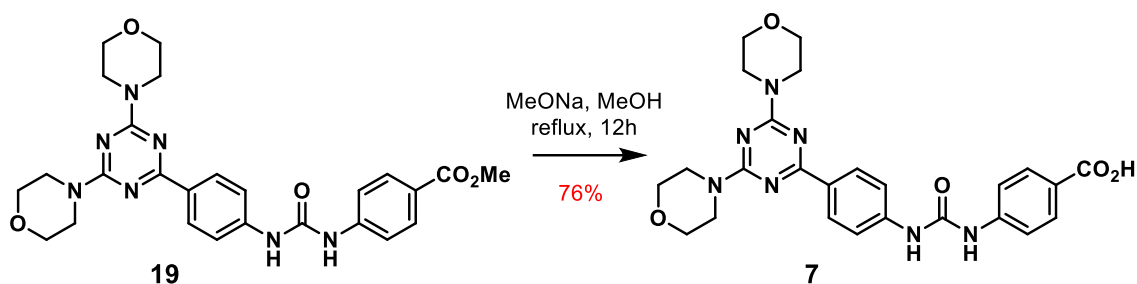


Схема 9. Получение кислоты **7** гидролизом сложноэфирной группы

Далее амидировали полученную кислоту **7** по реакции с защищенным 4-аминопиперидином **8**. В качестве защитной группы нами была выбрана фталоильная группа, установленная действием фталевого ангидрида на 4-аминопиперидин **20** в присутствии *n*-толуолсульфокислоты (pTSA) с выходом 20%. Также нами были рассмотрены N-дифенилметленовая группа и кремниевые защитные группы (STABASE¹⁰ и BENZOSTABASE¹¹) [65] (схема 10), однако предполагаемые защищенные амины выделены не были.

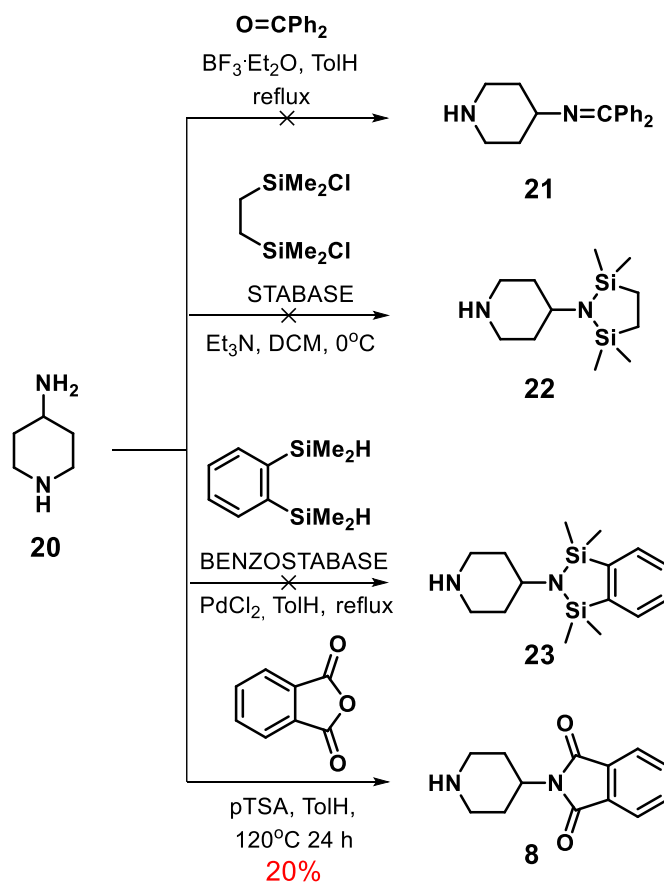


Схема 10. Подбор защитной группы для 4-аминопиперидина **20**

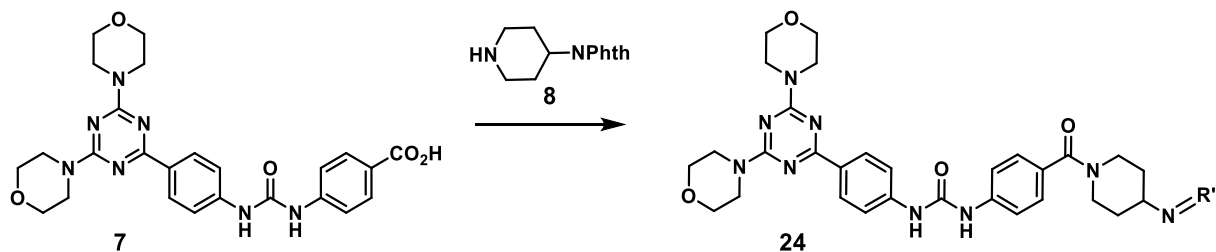
¹⁰ STABASE – 1,2-бис(диметилхлорсилил)этан.

¹¹ BENZOSTABASE – 1,2-бис(диметилсилил)бензол.

Для подбора оптимальных условий получения амидной связи нами были рассмотрены реакционные системы, представленные в таблице 4.

Таблица 4

Скрининг условий амидирования кислоты **7**



№	Активирующий агент	Добавки	Условия	Результат
1	EDC·HCl ¹² (1.1 экв.)	NHS ¹³ (1.1 экв.)	DMF 0°C→rt	+ ~20%
2	DIC ¹⁴ (1.5 экв.)	NHS (1.1 экв.), DMAP (3 экв.)	DCM 0°C→rt	следы
3	EDC·HCl (1.5 экв.)	NHS (1.1 экв.), DMAP (0.2 экв.)	DCM 0°C→rt	+ ~ 40%
4	HATU¹⁵ (2 экв.)	DIPEA (4 экв.)	DCM, rt	85%

При сравнении полученных результатов наиболее перспективным методом является синтез с использованием в качестве активирующего агента HATU в присутствии диизопропилэтиламина. В этих условиях целевой амид был получен с выходом 85%.

Следующим шагом стало снятие фталоильной защитной группы и выделение целевого ингибитора **9**. Стандартная процедура предполагает действие гидразингидрата на фталимид **24** в метаноле, однако в этом случае образовывалась смесь различных продуктов, включающие производные, в которых была разрушена амидная связь с аминопиперидином, а также производные, в которых отсутствовали морфолиновые группы. В связи с этим, мы выбрали более мягкую методику снятия фталоильной группы, основанной на

¹² EDC – N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид.

¹³ NHS – N-гидроксисукцинимид.

¹⁴ DIC – диизопропилкарбодимид.

¹⁵ HATU - (гексафторфосфат 2-(7-аза-1Н-бензотриазолил-1)-N,N,N',N'-тетраметилурия.

действии этилендиамина на фталимид **24** в этаноле при комнатной температуре в соответствии с [66]. В этих условиях было выделено целевое соединение **9** с выходом в 54% (схема 11).

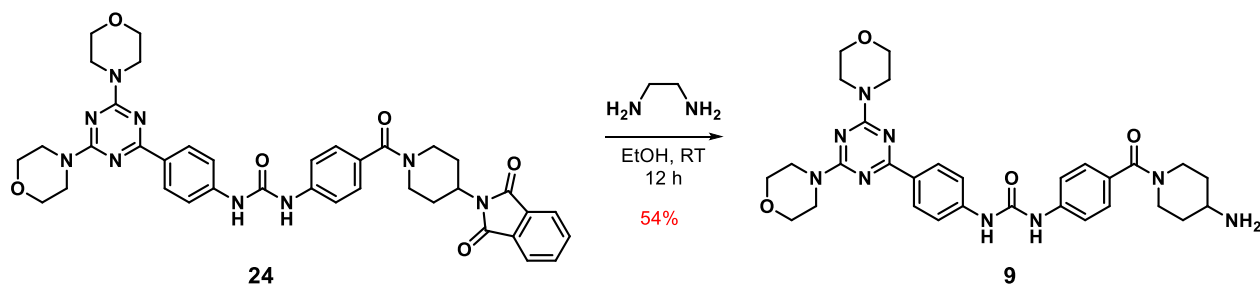


Схема 11. Получение целевого ингибитора **9**

Таким образом, целевое соединение **9** было получено исходя из *n*-нитробензонитрила **12** и дициандиамида **13**, *n*-аминобензойной кислоты **17** и 4-аминопиперидина **20** в 7 стадий с суммарным выходом 12%.

2.2. Получение ингибитора МСТ1/МСТ4

Получение целевого продукта предполагается по следующей схеме.

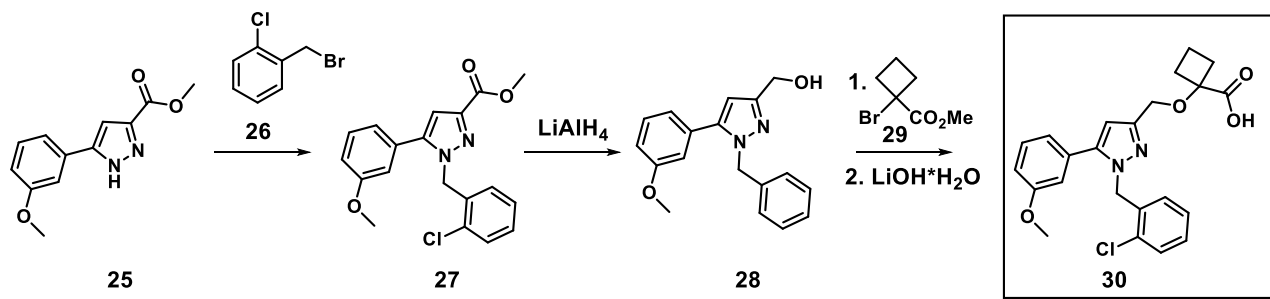


Схема 12. Общая схема получения ингибитора МСТ1/МСТ4 **30**

Для получения метилового эфира 5-(3-метоксифенил)пиразол-3-карбоновой кислоты **25** нами рассматривалось два пути: 1) формирование пиразольного кольца за счет присоединения гидразина к диоксопроизводному **32**; 2) реакция С-Н активации между производным пиразола **35** и 3-броманизолом **36** (схема 13).

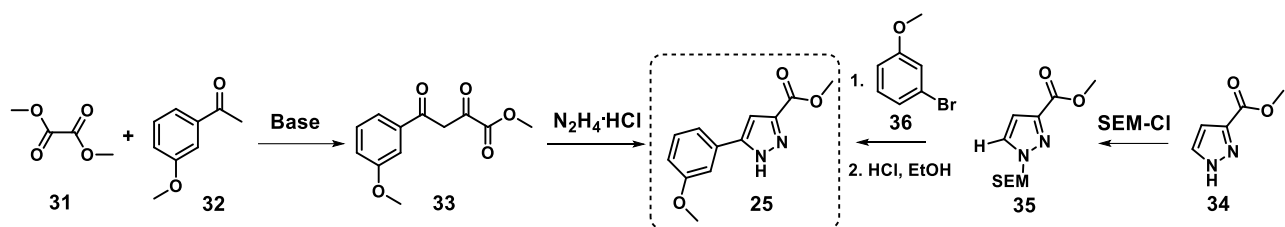


Схема 13. Альтернативные способы синтеза ключевого интермедиата **25**

Способ 1.

Получение кетоэфира **33** предполагалось провести по реакции конденсации между диметилксалатом **31** и *m*-метоксиацетофеноном **32**. Для этого по реакции этерификации щавелевой кислоты **37** с метанолом в присутствии серной кислоты нами синтезирован диметилксалат **31** с выходом 29% [67], который вводили в реакцию сложноэфирной конденсации Кляйзена с *m*-метоксиацетофеноном **30** (схема 14).

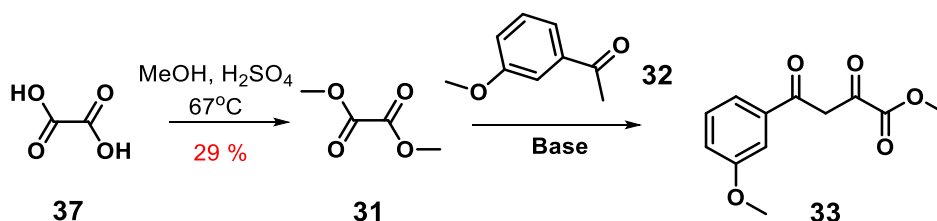


Схема 14. Получение метилового эфира 4-(3-метоксифенил)-2,4-диоксобутановой кислоты **33**

При проведении конденсации с использованием в качестве основания гидрида натрия по методике, изложенной в [68], была получена смесь продукта с исходным кетоном. В связи с этим, была проведена оптимизация условий реакции сложноэфирной конденсации (табл. 5).

Таблица 5

Оптимизация условий сложноэфирной конденсации

№	Основание	Растворитель	Температура	Результат
1	NaH (1,2 экв.)	толуол	0°C → 80°C	~ 9%
2	MeONa (3 экв.)	метанол	rt	-
3	MeONa (3 экв.)	метанол	0°C → 60°C	-
4	NaOH (3 экв.)	этанол	0°C	-

Продолжение таблицы 5

5	NaOH (1 экв.)	этанол	0°C	-
6	t-BuOK (1,2 экв.)	толуол	rt	-
7	t-BuOK (1,2 экв.)	толуол	110°C	-
8	Na (3 экв.)	метанол	0°C	-
9	Na (6 экв.)	толуол	110°C	-
10	LDA	ТГФ	-78°C → rt	~ 23%

Как видно из таблицы 5, изменение силы основания и условий проведения не привели к желаемому продукту, за исключением синтеза с использованием LDA, но и в этом случае была получена смесь.

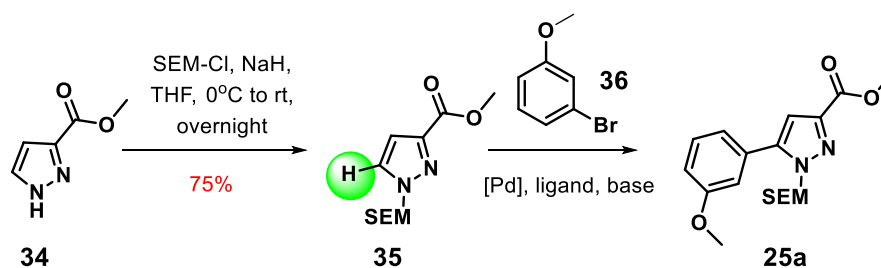
Таким образом, было решено сфокусироваться на другом способе получения соединения **25**.

Способ 2.

На первом этапе была установлена защитная 2-(триметилсилил)этиоксиметильная (SEM) группа по атому азота в соединении **34** [69], характеризующаяся устойчивостью в широком диапазоне значений pH и часто используемая в условиях реакции C-H активации. Выход составил 75%. Кроме того, эта защитная группа выполняет роль направляющей и способствует протеканию следующего арилирования по 5-му положению пиразольного кольца [70].

Следующим шагом является проведение арилирования защищенного пиразола **35** по положению «5» с использованием C-H активации. Для этого был проведен скрининг катализаторов, лигандов, оснований (табл. 6).

Оптимизация условий реакции C-H активации между 35 и 36



№	Кат-р	Лиганд	Осн-е	Добавки	Р-ль, t, °C	Рез-т
1	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	DavePhos (0.15 экв.)	Cs ₂ CO ₃ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	1,4-диоксан 110°C	-
2	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	D.I.P.I.-Cl ¹⁶ (0.1 экв.)	K ₂ CO ₃ (3 экв.)	-	DMF 140°C	-
3	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	D.I.I.-Cl ¹⁷ (0.1 экв.)	KOAc (3 экв.)	-	DMF 140°C	-
4	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	PPh ₃ (0.2 экв.)	K ₂ CO ₃ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 140°C	+ преобл. исх.
5	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	Cu ₃ P (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 6%
6	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	<i>rac</i> -BINAP (0.15 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 35 %
7	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 34 %
9	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	Ad-BippyPhos (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 19%
10	PdCl ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 12 %
11	Pd(dppf)Cl ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 12 %
12	Ni(dppe)Cl ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	-
11	Pd ₂ dba ₃ (0.1 экв.)		K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	-
12	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	Na ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 19 %

¹⁶ - см. рисунок 23.¹⁷ - см. рисунок 23.

Продолжение таблицы 6

13	Pd(OAc) ₂ (0.2 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.4 экв.)	КОАс (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	+ 13 %
14	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	DMAP (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.)	DMF 130°C	-
15	Pd(OAc) ₂ (0.2 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.4 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.) LiCl (0.5 экв.)	DMF 130°C	+ 22 %
16	Pd(OAc) ₂ (0.1 экв.)	<i>n</i> -BuPAd ₂ (0.2 экв.)	K ₃ PO ₄ (3 экв.)	PivOH (0.3 экв.) Sc(OTf) ₃ (0.5 экв.)	DMF 130°C	+ 12%

Для проведения реакции С-Н активации нужны апротонные полярные растворители, чаще всего используются такие как DMF, *N,N*-диметилацетамид, *N*-метил-2-пирролидон. В силу доступности в качестве растворителя нами был выбран DMF. Обычно для проведения прямого арилирования используют палладиевые катализаторы, реже никелевые [71]. Нами были рассмотрены несколько вариантов каталитических систем, и, как видно из таблицы 6, использование диацетата палладия наиболее эффективно, в то время как использование никелевого катализатора, а также Pd⁰ не привело к желаемому результату. Важным является присутствие пивалево́й кислоты, которая, как показано в [72], участвует в каталитическом цикле (схема 15).

Среди оснований наиболее эффективно оказалось применение фосфата калия, так как он обладает достаточной основностью для проведения арилирования, но не способствует гидролизу сложноэфирной группы, тем самым не выводя субстрат из реакционной среды. Применение органических аминов способствует протеканию побочного процесса – дегалогенирования [73].

Одной из основных задач оптимизации условий проведения С-Н активации является подбор лиганда с учетом особенностей использующихся субстратов. Опираясь на работу [73], нами рассмотрены несколько лигандов (рис. 23), среди которых есть как фосфиновые, так и ННС-лиганды. Для бромариллов обычно

рекомендуется использование как монодентантных фосфиновых лигандов, так и бидентантных. Из результатов, представленных в таблице 6, можно сделать вывод о том, что использование стерически затрудненного лиганда – бис(1-адамантил)-*n*-бутилфосфина – наиболее эффективно. Он является сильным σ -донорным лигандом, что облегчает окислительное присоединения палладия по связи C-Br. Протекание этого процесса скорее всего осложнено по причине того, что *m*-броманизол – электронно-насыщенная система. Также использование данного лиганда способно защитить катализатор от дезактивирующего влияния пиразола на катализатор. Этот эффект проявляется из-за того, что пиразол представляет собой основание Льюиса за счет наличия неподеленной электронной пары на азоте [70]. Исходя из этой особенности, нами была предпринята попытка уменьшить влияние основности пиразола, за счет введения кислоты Льюиса в реакционную систему, однако и это было неэффективным.

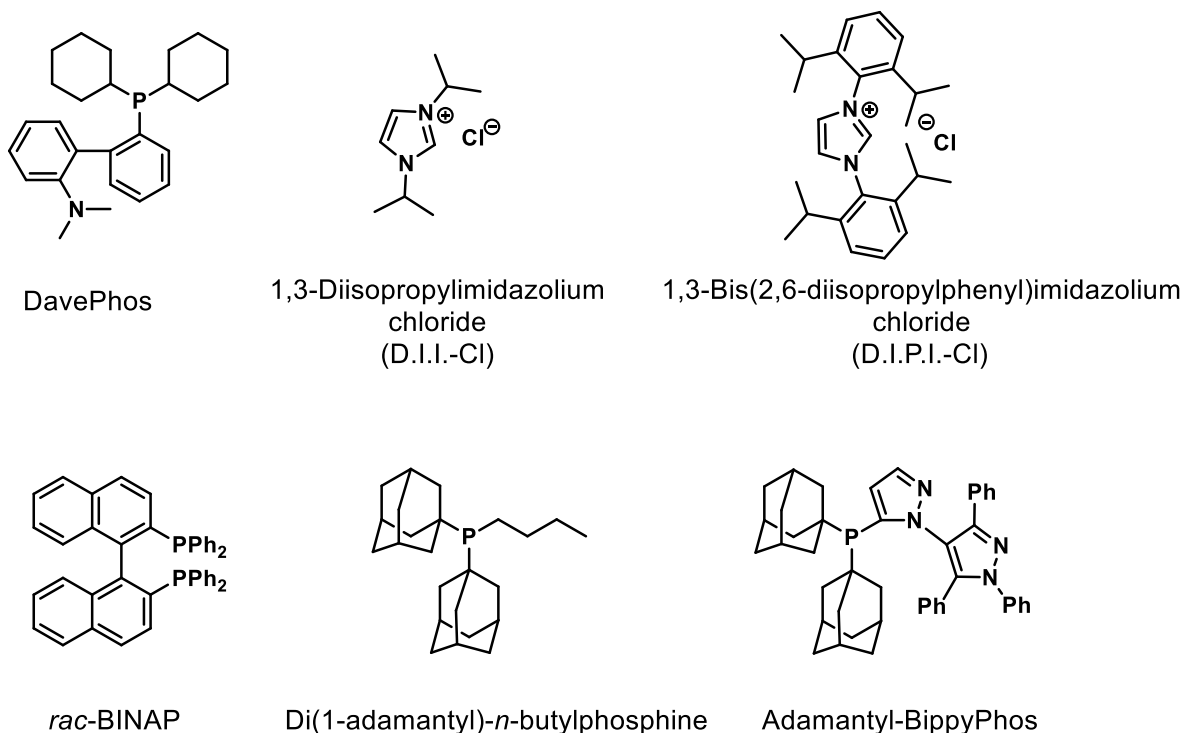


Рисунок 23. Лиганды, использованные при подбора оптимальных условий C-H активации

Таким образом, продукт **25a** был получен с максимальным выходом 35% (табл. 6). Однако, при масштабировании реакции с использованием системы,

содержащей ацетат палладия, *rac*-BINAP, фосфат калия и пивалевую кислоту выход падает до 15%. Сопоставимые выходы на малых количествах были получены в эксперименте, в котором использовали в качестве лиганда ди(1-адамантил)-*n*-бутилфосфин. Эта система показывала более стабильные результаты на больших количествах, в связи с чем мы остановили выбор на ней. Механизм этой реакции можно представить в следующем виде (схема 15).

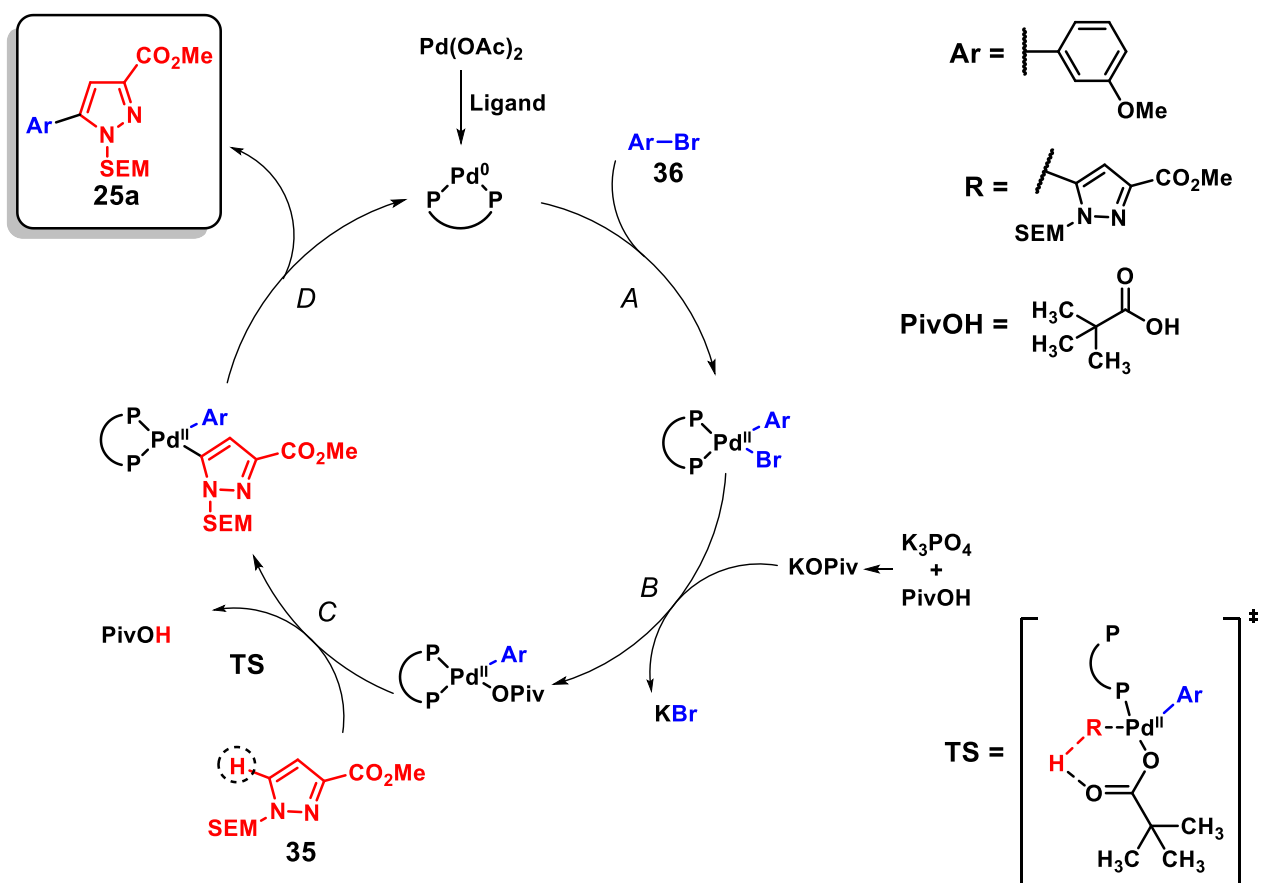


Схема 15. Механизм реакции C-H активации между **35** и **36**. *TS* – *transition state* – переходное состояние. Стадии: (A) окислительное присоединение, (B) обмен лигандов, (C) согласованное металлирование-депротонирование, (D) восстановительное элиминирование

Как показано на схеме 15, данная реакция протекает через цикл Pd (0/II). Существенная роль в данном процессе отводится пивалевой кислоте, которая, вероятно, стимулирует согласованное металлирование-депротонирование (стадия C), протекающее через переходное состояние, для которого бидентантный

дифосфиновый лиганд (*rac*-BINAP) должен перейти в монодентантную форму [74].

Таким образом, нами был выбран второй способ для получения соединения **25**.

Далее защитную SEM-группу удалили действием 3М соляной кислоты на SEM-замещенный пиразол **25a** в этаноле при кипячении с выходом 93%. Затем проалкилировали 1Н-пиразол **25** действием 2-хлорбензилбромида **26** (схема 16).

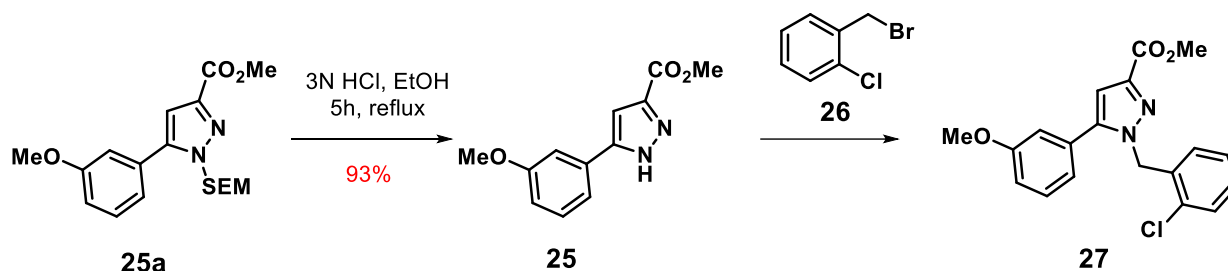


Схема 16. Получение производного **27**

Для проведения данного процесса мы рассмотрели несколько вариантов реакционных систем (таблица 7).

Таблица 7

Подбор условий алкилирования производного 1Н-пиразола **25**

№	Основание	Растворитель	Температура, °С	Результат
1	NaH (2 экв.)	THF	RT	-
2	NaH (2 экв.)	THF	60	12%
3	NaH (6 экв.)	толуол	110	25%

На данный момент наибольший выход продукта **27** получен при использовании гидрида натрия в толуоле. В дальнейшем планируется продолжить подбор оптимальных условий для проведения алкилирования производного 1Н-пиразола **25**.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

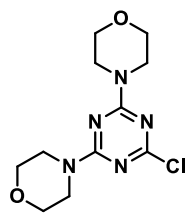
Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Agilent DD2 400, в CDCl_3 и ДМСО. Химические сдвиги приведены в шкале δ относительно Me_4Si . Спектры MALDI регистрировали на спектрометре Bruker Microflex LT. Для проведения колоночной хроматографии использовали AlfaAesarSilicagel 60 (70-230 mesh). Коммерчески доступные реагенты («Aldrich», «AlfaAesar», «Acros») использовали без предварительной очистки. Растворители готовили к использованию с применением стандартных методик очистки. Применяли петролейный эфир с интервалом кипения 40-70°C.

1. Получение ингибитора PI3K/mTOR сигнального пути

Получение (4,6-диморфолинил-6-(4-нитрофенил)-1,3,5-триазина **5**

Способ 1.

Синтез 2,4-диморфонил-6-хлор-1,3,5-триазина **3**

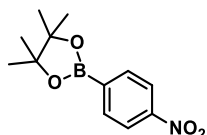


В колбу Шленка поместили цианурхлорид **1** (5.000 г., 27.00 ммоль, 1 экв.), заполнили аргоном. Добавили перегнанный под аргоном DCM (120.0 мл), затем по каплям прибавили морфолин **2** (9.4 мл, 108.00 ммоль, 4 экв.). Смесь перемешивали в течение 2 часов при 0°C, затем нагрели до комнатной температуры и продолжили перемешивание еще 2 часа. После завершения реакции смесь отфильтровали, фильтрат упарили. Для выделения продукта **3** использовали метод колоночной хроматографии на силикагеле, элюент PE:EA 3:1. Выход веществ из колонки проверяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) – элюент PE:EA 1:1. Отогнали элюат на роторном испарителе. Полученный продукт – белое твердое вещество, выход составил 80% (6.150 г).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.76 (с, 8H), 3.71 – 3.62 (м, 8H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ 169.72, 164.52, 66.69, 43.93.

Синтез пинаколового эфира *n*-нитрофенилбороновой кислоты **4**

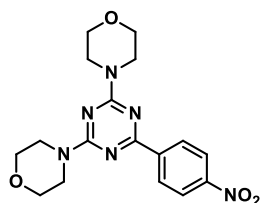


В колбу Шленка, содержащую бис(пинаколато)дибор **11** (2.763 г, 10.88 ммоль, 1.1 экв.), Pd(dppf)Cl₂ (362 мг, 0.50 ммоль, 0.05 экв.), ацетат калия (2.910 г, 29.70 ммоль, 3 экв.) в атмосфере аргона, добавили растворитель – DMF (50.0 мл). Поставили перемешиваться смесь при температуре 80°C и через несколько минут прибавили *n*-бромнитробензол **10** (2.000 г, 9.90 ммоль, 2 экв.), затем продолжили перемешивание при той же температуре в течение 10 часов. После завершения реакции прилили дистиллированной воды и экстрагировали этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой высушили над Na₂SO₄, затем отфильтровали и отогнали растворитель. Продукт **4** выделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент PE:EA 15:1. Выход веществ из колонки отслеживали по ТСХ (PE:EA 5:1). Отогнали элюат на роторном испарителе. Полученный продукт – белое кристаллическое вещество, выход составил 74% (1.766 г).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8.19 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.96 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 1.36 (с, 12H).

¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): δ 149.99, 135.80, 128.47, 122.54, 84.77, 25.02.

Синтез 2,4-диморфолинил-6-(4-нитрофенил)-1,3,5-триазина **5**



В колбу поместили хлортриазин **3** (50 мг, 0.175 ммоль 1 экв.), пинаколовый эфир **4** (65 мг, 0.262 ммоль, 1.5 экв.), гидроксид натрия (21 мг, 0.525 ммоль, 3 экв.), Pd(PPh₃)₄ (101 мг, 0.087 ммоль, 0.5 экв), заполнили аргоном, добавили 1,4-диоксан (10.0 мл), прибавили 5 мкл дистиллированной воды. Перемешивали смесь при 100°C в течение 14 часов. После окончания реакции отогнали

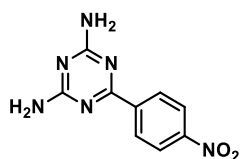
растворитель. Выделение продукта осуществляли методом колоночной хроматографии: элюент PE:EA 5:1, ТСХ PE:EA 3:1. Полученный продукт – желтое твердое вещество, выход составил 83% (53 мг).

$^1\text{H ЯМР}$ (400 МГц, CDCl_3): δ 8.53 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H), 8.26 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H), 3.94 (с, 8H), 3.80 – 3.75 (м, 8H).

$^{13}\text{C ЯМР}$ (101 МГц, CDCl_3): δ 168.58, 165.19, 149.76, 143.51, 129.35, 123.38, 66.95, 43.87.

Способ 2.

Синтез 2,4,-диамино-6-(4-нитрофенил)-1,3,5-триазина **14**

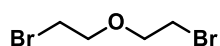


В колбу Шленка к перегнанному под аргоном этанолу (28.0 мл) добавили гидроксид калия (484 мг, 8.65 ммоль, 0.4 экв.) и перемешивали до растворения. Затем к полученному раствору прибавили дицианодиаמיד **13** (2.000 г, 23.80 ммоль, 1.1 экв.) и 4-нитробензонитрил **12** (3.200 г, 21.64 ммоль, 1 экв.). Смесь перемешивали при температуре 90°C в течение 3 часов. После окончания реакции смесь охладили до комнатной температуры, отфильтровали, промыли этанолом и высушили полученный продукт **14** – бежевый порошок, выход составил 55% (2.300 г).

$^1\text{H ЯМР}$ (400 МГц, DMSO-d_6): δ 8.45 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H), 8.34 (д, $J = 9.0$ Гц, 2H), 6.94 (с, 4H).

$^{13}\text{C ЯМР}$ (101 МГц, DMSO-d_6): δ 168.43, 167.38, 149.03, 143.17, 128.78, 123.47.

Синтез дибромдиэтилового эфира **15**

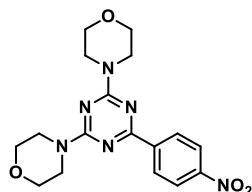


Синтез проводили согласно литературной методике [59]. В колбу Шленка, содержащую диэтиленгликоль **16** (2.68 мл, 28.27 ммоль, 1.25 экв.) в атмосфере аргона, добавляли трибромид фосфора (2.13 мл, 22.62 ммоль, 1 экв.) шприцевым насосом в течение 1 часа при 0°C. Затем реакционную смесь перемешивали при

температуре 50°C. После окончания реакции добавили в колбу немного хлороформа, затем медленно прибавили дистиллированную воду. Перенесли смесь в делительную воронку, добавили еще воды, экстрагировали хлороформом (3 раза по 50.0 мл), органический слой промыли водой, содой и еще раз водой, затем осушили над Na₂SO₄. Отфильтровали, упарили фильтрат. Очистку проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле, элюент PE:EA 5:1, ход колоночной хроматографии контролировали с помощью ТСХ (PE:EA 5:1). Отогнали элюат на ротационном испарителе. Полученный продукт – желтоватая маслянистая жидкость (4.758 г), выход составил 91%.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 3.83 (т, J = 6.2 Гц, 4H), 3.47 (т, J = 6.2 Гц, 4H).

Синтез (4,6-диморфолинил-6-(4-нитрофенил)-1,3,5-триазина **5**

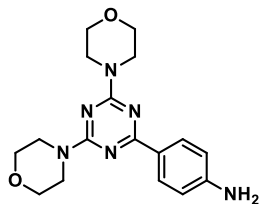


В колбе А получили суспензию гидрида натрия (1.096 г – 60% в минеральном масле, 27.39 ммоль, 4.2 ммоль) в DMF (30.0 мл) и перемешивали смесь при температуре 65°C. В колбе Б растворили в DMF (20.0 мл) соединение **14** (1.500 г, 6.52 ммоль, 1 экв.) и дибромдиэтиловый эфир **15** (3.330 г, 14.35 ммоль, 2.2 экв.), далее перемешивали раствор при температуре 65°C. Затем раствор из колбы Б прикапали к суспензии в колбе А шприцевым насосом в течении получаса. Продолжили перемешивание реакционной смеси при температуре 65°C ночь. После окончания реакции отогнали DMF под вакуумом, затем в колбу прилили 100.0 мл холодной дистиллированной воды и перемешивали смесь при комнатной температуре 1 ч. Отфильтровали осадок на фильтре Шота, собрали осадок и высушили его. Полученный продукт – желтое твердое вещество, выход составил 82% (1.992 г).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8.53 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 8.26 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 4.05 – 3.82 (м, 8H), 3.81 – 3.70 (м, 8H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3); δ 168.04, 164.29, 149.97, 142.48, 129.66, 123.42, 66.90, 44.16.

Синтез 2-(4-аминофенил)-4,6-диморфолин-1,3,5-триазина **6**

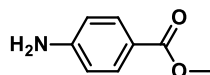


В колбе Шленка получили раствор с концентрацией 0,1 ммоль/мл **5** (100 мг, 0.27 ммоль, 1 экв.) в этаноле, перегнанным под аргоном, затем добавили к нему $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (300 мг, 1.33 ммоль, 5 экв.). Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C в течение 10 часов. После завершения реакции отогнали этанол, добавили этилацетат и раствор соды, перенесли смесь в делительную воронку и экстрагировали этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой осушили над Na_2SO_4 , затем отфильтровали и отогнали этилацетат на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент PE:EA 1:1, ТСХ 1:1. Полученный продукт – белое кристаллическое вещество. Выход составил 88% (80 мг).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 8.05 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.57 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 5.69 (с, 2H), 3.77 (с, 8H), 3.66 – 3.61 (м, 8H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, DMSO-d_6): δ 169.44, 164.56, 152.26, 129.74, 123.38, 112.70, 66.05, 43.21.

Синтез метилового эфира *n*-аминобензойной кислоты **18**



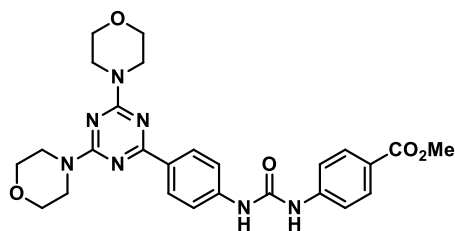
В колбу Шленка, содержащую *n*-аминобензойную кислоту **17** (100 мг, 0.73 ммоль, 1 экв.), добавили метанол (1.7 мл), перегнанный под аргоном. Затем к раствору по каплям прибавили серную кислоту (117 мкл, 2.19 ммоль, 3 экв.). Полученную смесь перемешивали при температуре 80°C сутки. После окончания реакции непрореагировавшую кислоту нейтрализовали содой до прекращения выделения газа. Далее экстрагировали этилацетатом (3 раза по 50.0 мл).

Объединенный органический слой осушили над Na_2SO_4 , затем отогнали растворитель. Полученный продукт – белое кристаллическое вещество, выход составил 89% (98 мг).

^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6): δ 7.63 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 6.56 (д, $J = 8.8$ Гц, 2H), 5.96 (с, 2H), 3.73 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ 167.31, 150.92, 131.74, 119.89, 113.94, 51.75.

Синтез N-(метилбензоатил-4)-N'-(4-(4,6-диморфолинил-1,3,5-триазинил-2)фенил)мочевины **19**



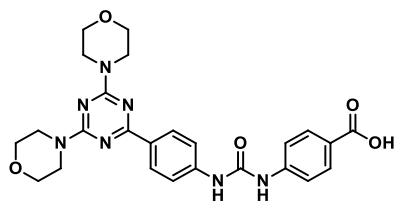
В колбе Шленка, заполненной аргоном, растворили трифосген (63 мг, 0.21 ммоль, 0.37 экв.) в 4.0 мл CHCl_3 . В другой колбе, заполненной аргоном, получили смесь триазинсодержащего амина **6** (200 мг, 0.58 ммоль, 1 экв.) и Et_3N (175 мкл, 1.27 ммоль, 2.2 экв.) в 4.0 мл CHCl_3 и добавили ее по каплям к раствору трифосгена при 0°C . Полученную смесь перемешивали при 0°C 30 минут, затем кипятили при 65°C в течение 12 ч. Далее добавили раствор метилового эфира *n*-аминобензойной кислоты **18** (91 мг, 0.58 ммоль, 1 экв.) в 2.0 мл CHCl_3 и продолжали перемешивать реакционную смесь при 65°C еще 12 ч. После завершения реакции отогнали хлороформ на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент PE:EA 1:1, PE:EA 1:2, EA 100%, EA:EtOH 1:1; ТСХ PE:EA:EtOH 3:1:1. Полученный продукт – твёрдое вещество светло-бежевого цвета, выход 87% (259 мг).

^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6): δ 9.13 (д, $J = 14.2$ Гц, 2H), 8.29 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.90 (д, $J = 8.6$ Гц, 2H), 7.58 (дд, $J = 14.1, 8.7$ Гц, 4H), 3.82 (с, 11H), 3.65 (с, 8H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, DMCO-d_6): δ 168.94, 165.91, 164.59, 151.93, 144.13, 142.52, 130.35 (д, $J = 15.7$ Гц), 129.05, 122.66, 117.44, 66.04, 51.81, 43.28.

Масс-спектр: 520.09 (100%), 521.13 (28%).

Синтез *para*-замещенной бензойной кислоты **7**



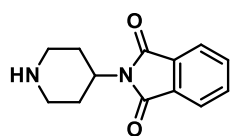
Суспензировали метиловый эфир **19** (150 мг, 0.29 ммоль, 1 экв.) в 7.0 мл 25% раствора метилата натрия в метаноле в круглодонной колбе. Полученную смесь кипятили в течение 20 ч. После завершения реакции довели pH до 6 добавлением соляной кислоты, затем отогнали метанол и воду на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент PE:EA:EtOH 4:1:1 + 1% CH₃COOH, ТСХ PE:EA:EtOH 3:1:1. Полученный продукт – желтоватое твердое вещество, выход 76% (111 мг).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 12.51 (с, 1H), 9.21 (д, J = 30.9 Гц, 2H), 8.29 (д, J = 8.6 Гц, 2H), 7.88 (д, J = 8.6 Гц, 2H), 7.58 (д, J = 7.2 Гц, 2H), 3.82 (с, 8H), 3.66 (с, 8H).

¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆): δ 169.42, 165.03, 152.63, 143.26, 130.92, 130.44, 129.47, 117.64, 117.56, 66.48, 43.69.

Масс-спектр: 506.08 (100%), 520.11 (8%), 440.91 (8%), 212.11 (22%).

Получение 4-(N-фталоллил)аминопиперидина **8**



Поместили в колбу Шленка 4-аминопиперидин **20** (500 мг, 5.00 ммоль, 1.1 экв.), фталевый ангидрид **21** (673 мг, 4.55 ммоль, 1 экв.), заполнили ее аргоном, добавили 20.0 мл толуола. К полученному раствору добавили *n*-толуолсульфонокислоту (43 мг, 0.23 ммоль, 0.05 экв.). Перемешивали реакционную смесь при кипячении (125°C) с обратным холодильником в течении 5 ч. После завершения реакции отогнали толуол, растворили остаток в DCM (100.0 мл), промыли раствором содой (2 раза по 15.0 мл), соли (2 раза по 10.0 мл), затем экстрагировали водный слой DCM (2 раза по 50.0 мл). Объединенный

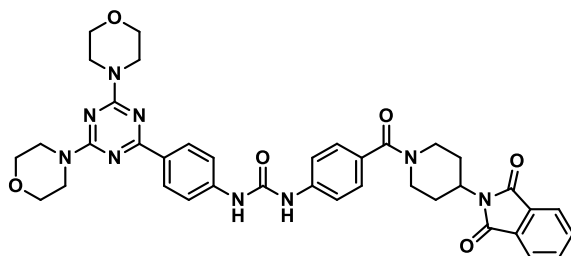
органический слой осушили над Na_2SO_4 , затем отфильтровали и отогнали дихлорметан на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 4:1, затем 3:1; ТСХ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 3:1. Полученный продукт – белое твердое вещество, выход 20% (224 мг).

^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6): δ 7.87 – 7.80 (м, 4H), 4.13 – 4.04 (м, 1H), 2.59 (тд, $J = 12.4, 2.0$ Гц, 4H), 2.29 – 2.15 (м, 4H), 1.64 (дд, $J = 11.8, 2.0$ Гц, 2H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, DMCO-d_6): δ 167.76, 134.40, 131.41, 122.95, 48.51, 45.26, 29.24.

Синтез *para*-замещенного 4-(*N*-фталолиламинопиперидинил)бензоамида

24

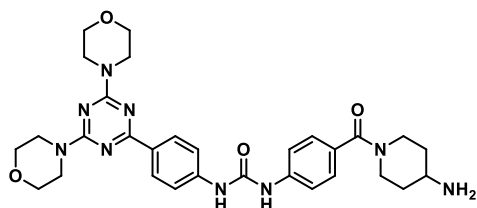


В колбе Шленка, заполненной аргоном, растворили кислоту **7** (150 мг, 0.30 ммоль, 1 экв.) в 8.0 мл DCM, к раствору добавили DIPEA (205 мкл, 1.19 ммоль, 4 экв.) и охладили полученную смесь до 0°C , затем добавили HATU (225 мг, 0.59 ммоль, 2 экв.) и перемешивали смесь 30 минут при 0°C . Затем добавили и амин **8** (72 мг, 0.30 ммоль, 1 экв.), растворенный в 4.0 мл DCM и продолжали перемешивание при комнатной температуре 20 ч. После завершения реакции отогнали растворитель и прилили к остатку 40.0 мл этилацетата. Органическую фазу промыли 15.0 мл дистиллированной воды и 15.0 мл раствора хлорида натрия. Водную фазу проэкстрагировали этилацетатом (3 раза по 40.0 мл). Объединенный органический слой осушили над Na_2SO_4 , затем отфильтровали и отогнали этилацетат на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 15:1 и 1% Et_3N ; ТСХ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 10:1 и 1% Et_3N . Полученный продукт – твердое вещество желтоватого цвета, выход 85% (185 мг).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9.01 (д, J = 37.0 Гц, 2H), 8.28 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.93 – 7.79 (м, 4H), 7.56 (дд, J = 8.7, 3.5 Гц, 4H), 7.37 (д, J = 8.5 Гц, 2H), 3.79 (д, J = 26.8 Гц, 8H), 3.70 – 3.45 (м, 9H), 3.22 – 2.74 (м, 4H), 2.22 (д, J = 9.5 Гц, 2H), 1.77 (м, 2H).

¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆): δ 171.96, 168.95, 167.71, 164.58, 152.12, 142.73, 140.79, 134.43, 131.41, 130.04, 129.14, 129.04, 127.99, 122.98, 117.73, 117.29, 66.02, 48.15, 48.13, 43.27, 21.05.

Синтез *para*-замещенного (4-аминопиперидинил)бензоамида **9**



Суспензировали фталоилзащищенное производное **24** (173 мг, 0.24 ммоль, 1 экв.) в 10.0 мл этанола и добавили этилендиамин (64 мкл, 0.95 ммоль, 4 экв.), перемешивали полученную реакционную смесь при комнатной температуре в течение 20 ч. После завершения реакция отогнали этанол на роторном испарителе, остаток растворили в ЕА (50.0 мл), промыли водным раствором NaCl (2 раза по 25.0 мл), затем экстрагировали водный слой этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой осушили над Na₂SO₄ и отогнали растворитель на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент CHCl₃:MeOH 20:1 → CHCl₃:MeOH 1:1; ТСХ CHCl₃:MeOH 3:1. Полученный продукт – бежевое твердое вещество, выход 54% (75 мг).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9.92 (д, J = 14.9 Гц, 2H), 8.27 (д, J = 8.7 Гц, 2H), 7.58 (дд, J = 9.9, 8.8 Гц, 4H), 7.31 (д, J = 8.6 Гц, 2H), 3.82 (с, 8H), 3.66 (с, 8H), 3.51 (д, J = 7.0 Гц, 1H), 3.15 (д, J = 6.4 Гц, 4H), 1.85 (д, J = 14.0 Гц, 2H), 1.66 – 1.54 (м, 2H), 1.46 (s, 2H).

¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆): δ 169.03, 169.00, 164.58, 152.58, 143.37, 141.16, 129.61, 128.98, 127.86, 117.25, 116.97, 66.03, 47.91, 45.45, 43.28, 30.69.

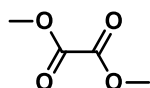
MALDI (DCTB, положит. режим): 588.2 (100%), 610.2 (M+Na⁺, 58%), 628.2 (M+K⁺, 27%)

Получение ингибитора МСТ1/МСТ4

Получение метилового эфира 5-(3-метоксифенил)пиразол-3-карбоновой кислоты **25**

Способ 1

Получение диметилксалата **31**

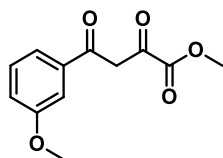


В колбу, снабженную обратным холодильником, поместили щавелевую кислоту **37** (4.500 г, 0.05 моль, 1 экв.) и добавили метанол (5.0 мл, 0.12 моль, 2.5 экв.), начали нагревать смесь и затем добавили концентрированную серную кислоту (2.0 мл, 0.04 моль, 0.75 экв.). Нагревали смесь до 67°C в течение 30 минут. После завершения реакции отфильтровали через подогретый фильтр Шота и поставили фильтрат в холодильник. На следующий день отфильтровали выпавший осадок на фильтре Шота, высушили осадок. Полученный продукт – бесцветное кристаллическое вещество. Выход составил 29% (1.700 г).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 3.91 (с, 6H).

¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): δ 158.07, 53.78.

Синтез метилового эфира 4-(3-метоксифенил)-2,4-диоксобутановой кислоты **33**.



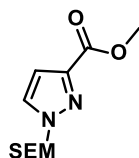
В колбу Шленка, заполненную аргоном, добавили перегнанный под аргоном THF (10.0 мл) и перегнанный над гидридом кальция диизопропиламин (204 мкл, 1.46 ммоль, 1.1 экв.), охладили смесь до -78°C. Затем прибавляли по каплям *n*-бутиллитий (0.8 мл, 1.73 ммоль, 1.3 экв.), перемешивали смесь 20 минут. Далее растворили *m*-метоксиацетофенон **32** (182 мкл, 1.3 ммоль, 1 экв.) в 1.0 мл

THF и прикапали раствор в колбу с полученным литийдиизопропиламидом, перемешивали смесь 20 минут. Растворили диметилксалат **31** (236 мг, 2.00 ммоль, 1.5 экв.) в 2.0 мл THF, добавили в колбу. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре ночь. После завершения реакции добавили раствор хлорида аммония для нейтрализации, затем экстрагировали этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой осушили над Na₂SO₄, отфильтровали, отогнали растворитель. Выделение продукта проводили методом колоночной хроматографии, элюент PE:EA 10:1 → PE:EA 5:1, ТСХ 3:1. Получили желтое кристаллическое вещество в смеси с исходным кетоном.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7.58 (д, J = 6.5 Гц, 1H), 7.52 (с, 1H), 7.41 (т, J = 8.0 Гц, 1H), 7.16 (д, J = 4.8 Гц, 1H), 4.88 (с, 2H), 3.95 (с, 3H), 3.88 (с, 3H).

¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): δ 191.05, 168.98, 162.82, 160.18, 130.05, 120.66, 120.46, 117.81, 112.38, 55.67, 53.39.

Синтез метилового эфира 1-((2-триметилсилилэтокси)метил)-1H-пиразолкарбоновой кислоты **35**

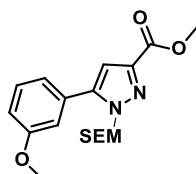


В колбу А, содержащую суспензию гидрида натрия (285 мг – 60% в минеральном масле, 7.14 ммоль, 1.5 экв.) в THF в атмосфере аргона, добавили 1H-пиразол **34** (600 мг, 4.76 ммоль, 1 экв.) при 0°C, затем перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение двух часов. Далее снова охладили до 0°C. В колбе Б к перегнанному THF по каплям добавили SEM-Cl (928 мкл, 5.24 ммоль, 1.1 экв.). Затем прибавили раствор из колбы Б в А и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 10 часов. После окончания реакции добавили дистиллированной воды и экстрагировали водную фазу с этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой высушили над Na₂SO₄. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент PE:EA 4:1, ТСХ 3:1. Полученный продукт – бесцветная жидкость, выход составил 75% (909 мг).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7.60 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H), 6.87 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H), 5.48 (с, 2H), 3.91 (с, 3H), 3.58 – 3.51 (м, 2H), 0.91 – 0.85 (м, 2H), -0.05 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ 162.80, 143.74, 130.59, 110.05, 81.18, 67.31, 52.18, 17.93, -1.36.

Синтез метилового эфира 5-(3-метоксифенил)-1-((2-триметилсилилэтокс)метил)-1H-пиразолкарбоновой кислоты **25a**

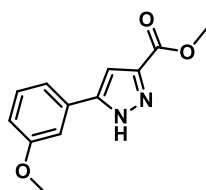


Поместили в виалу $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (8 мг, 0.02 ммоль, 0.1 экв.), *n*-BuAd₂P (22 мг, 0.06 ммоль, 0.2 экв.), пивалевую кислоту (9 мг, 0.09 ммоль, 0.3 экв.), фосфат калия (192 мг, 0.90 ммоль, 3 экв.), заполнили аргоном. 3-броманизол **36** (46 мкл, 0.36 ммоль, 1.2 экв), замещенный пиразол **35** (100 мг, 0.30 ммоль, 1 экв.), откачали воздух добавили растворитель – безводный DMF (3.0 мл). Реакционную смесь нагревали при температуре 130°C в течение 20 часов. После окончания реакции отогнали DMF под вакуумом. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент PE:EA 6:1, ТСХ 5:1. Полученный продукт – коричневая жидкость (15 мг), выход составил 34%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7.38 (т, $J = 8.1$ Гц, 1H), 7.23 – 7.20 (м, 2H), 6.94 (с, 1H), 6.90 (д, $J = 2.4$ Гц, 1H), 5.51 (с, 2H), 3.94 (с, 3H), 3.85 (с, 3H), 3.57 (м, 2H), 0.80 – 0.78 (м, 2H), 0.02 (с, 9H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3): δ 162.98, 143.80, 130.59, 130.07, 121.40, 115.17, 114.46, 110.12, 109.44, 78.95, 67.34, 55.50, 52.27, 1.29.

Синтез метилового эфира 5-(3-метоксифенил)-1H-пиразолкарбоновой кислоты **25**

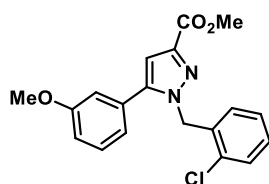


В колбе Шленка растворили SEM-защищенный пиразол **25a** (541 мг, 1.24 ммоль, 1 экв.) в этаноле (64.0 мл) и добавили 16.0 мл 3 н. соляной кислоты. Реакционную смесь кипятили в течение 5 ч. После завершения реакции нейтрализовали соляную кислоту добавлением водного раствора Na₂CO₃ до pH=7. Затем экстрагировали водную фазу этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой осушили над Na₂SO₄, затем отогнали растворитель на роторном испарителе. Полученный продукт – желтоватое твердое вещество (353 мг), выход составил 93%.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 13.97 (с, 1H), 7.42 (дд, J = 2.4, 1.5 Гц, 2H), 7.35 (т, J = 8.0 Гц, 1H), 7.28 (с, 1H), 6.92 (д, J = 7.6 Гц, 1H), 3.84 (с, 3H), 3.81 (с, 3H).

¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО-d₆): δ 162.07, 159.68, 143.32, 143.03, 132.59, 130.06, 117.61, 114.19, 110.52, 108.78, 55.20, 51.65.

Синтез производного 1-(2-хлорбензил)пиразола **27**



В колбе Шленке, заполненной аргоном, суспензировали 1H-пиразол **25** (114 мг, 0.37 ммоль, 1 экв.) в толуоле (5.0 мл), затем добавили NaN (90 мг, 2.24 ммоль, 6 экв.) и перемешивали полученную смесь 30 минут при комнатной температуре. Затем нагрели смесь до 60°C и добавили по каплям 2-хлорбензилбромид **26** (144 мкл, 1.12 ммоль, 3 экв.), растворенном в 0.5 мл толуола. Реакционную смесь перемешивали 15 ч при температуре 110°C. После окончания реакции прилили 50.0 мл водного раствора NH₄Cl и экстрагировали этилацетатом (3 раза по 50.0 мл). Объединенный органический слой осушили над Na₂SO₄, затем отогнали растворитель на роторном испарителе. Для выделения продукта реакции использовали метод колоночной хроматографии, элюент PE:EA 20:1 → PE:EA 8:1, ТСХ 3:1. Полученный продукт – светло-коричневая жидкость, выход составил 25% (39 мг).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7.44 – 7.38 (m, 1H), 7.37 (dd, J = 3.0, 1.3 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.29 – 7.22 (m, 1H), 7.19 (dd, J = 10.6, 4.7 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 10.7, 4.5 Hz, 1H), 6.89 (dd, J = 6.1, 4.9 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H).

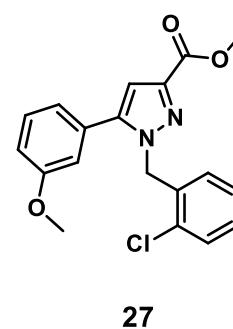
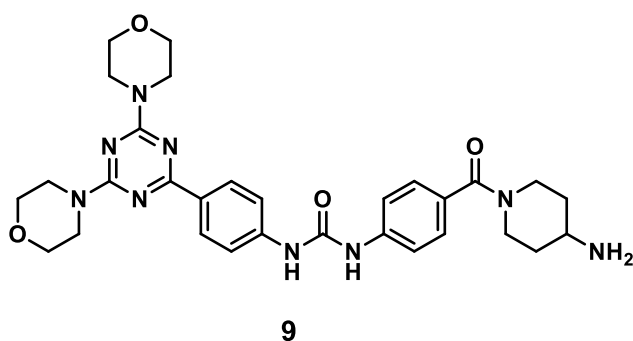
¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃): δ 160.15, 159.02, 150.86, 150.71, 135.50, 134.48, 133.93, 130.11, 129.92, 129.44, 128.65, 127.11, 118.36, 114.45, 110.99, 109.27, 55.51, 55.51.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован способ синтеза ингибитора сигнального пути PI3K/mTOR **9**. В качестве ключевых трансформаций выступают реакция нуклеофильного присоединения дициандиамида **13** к *n*-нитробензинитрилу **12** для формирования 1,3,5-триазинового цикла, как главного каркаса соединения, и алкилирование аминогрупп в **8** для создания морфолиновых групп, как важной функциональной части, позволяющей данному ингибитору проявлять активность. Для формирования участка, соответствующего замещенной мочеvine, была использована реакция сочетания двух аминов **6** и **18** в присутствии трифосгена.

2. Разработан метод синтеза ключевого интермедиата – арилированного по «5» положению пиразола **25** для получения ингибитора MST1/2 **30**. В качестве ключевой стадии использована реакция C-N активации замещенного пиразола **35**. На данном этапе работы было получено соединение **27**, являющееся предшественником целевого продукта.

3. Предложен дизайн потенциального гибридного ингибитора метаболизма молочной кислоты на основе соединений **9** и **30**, соединенных рН-чувствительным линкером.



БЛАГОДАРНОСТИ

Автор работы выражает благодарность к.х.н. Малышевой Ю.Б. за регистрацию ЯМР-спектров, д.х.н. Гришину И.Д. и асс. Григорьевой А.О. за регистрацию масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. National Cancer Institute: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. (Дата обращения: 11.05.2020).
2. Pavlova, N.N. The emerging hallmarks of cancer metabolism / N.N. Pavlova, C.B. Thompson // *Cell Metab.* – **2016.** - № 23. – С. 27–47.
3. Tekade, R.K. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. / R.K. Tekade, X. Sun // *Drug Discov. Today.* – **2017.** – № 22. – С. 1637–1653.
4. Hayflick, L. The serial cultivation of human diploid cell strains / L. Hayflick, P.S. Moorhead // *Exp. Cell Res.* – **1961.** – № 25. – С. 585–621.
5. Riedl, S.J. The apoptosome: signalling platform of cell death / S.J. Riedl, G.S. Salvesen // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – **2007.** – № 8. – С. 405–413.
6. Широкова, Л.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки / Л.В. Широкова // *Цитология.* – **2007.** – № 49. – С. 385–395.
7. Канцерогенез / под ред. Д.Г. Заридзе. – М.: Медицина, **2004.** – С. 576.
8. Vander Heiden, M.G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M.G. Vander Heiden, Cantley L.C., Thompson C.B. // *Science.* – **2009.** – № 324. – С. 1029–1033.
9. Warburg, O. The metabolism of tumors in the body / O. Warburg, F. Wind, E. Negelein // *J. Gen. Physiol.* – **1927.** – №8. – С. 519–530.
10. Lopez-Lazaro, M. The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? / M. Lopez-Lazaro // *Anticancer Agents Med. Chem.* – **2008.** – № 8. – С. 305–312.
11. Liberti, M.V. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? / M.V. Liberti, J.W. Locasale // *Trends Biochem. Sci.* – **2016.** – № 41. – С. 211–218.
12. Основы биохимии Лениджера: в 3 т. Т. 2: Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Коукс; пер. с англ. под ред. А.А. Богданова, С.Н. Кочеткова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, **2014.** – С. 636.

13. Shestov, A.A. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step / A.A. Shestov et al. // *Elife*. – **2014**. – № 3. – e03342.
14. Locasale, J.W. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth / J.W. Locasale, L.C. Cantley // *Cell. Metab.* – **2011**. – № 14. – C. 443–451.
15. Wellen, K.E. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess / K.E. Wellen, C.B. Thompson // *Mol. Cell.* – **2010**. – № 40. – C. 323–332.
16. Sena, L.A. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species / L.A. Sena, N.S. Chandel // *Mol. Cell.* – **2012**. – № 48. – C. 158–167.
17. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion / V. Estrella et al. // *Cancer Res.* – **2013**. – № 73. – C. 1524–1535.
18. Possible therapeutic targets among the molecules involved in the warburg effect in tumor cells / S.O. Nam et al. // *Anticancer Res.* – **2013**. – № 33. – C. 2855–2860.
19. Lee, J.J. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer / J.J. Lee, K. Loh, Y.S. Yap // *Cancer Biol. Med.* – **2015**. – № 12. – C. 342–354.
20. Bis(morpholino-1,3,5-triazine) derivatives: potent adenosine 5'-triphosphate competitive phosphatidylinositol-3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors: discovery of compound 26 (PKI-587), a highly efficacious dual inhibitor / A.M. Venkatesan et al. // *J. Med. Chem.* – **2010**. – № 53. – C. 2636–2645.
21. Beck, J.T. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: an emerging treatment strategy for squamous cell lung carcinoma / J.T. Beck, A. Ismail, C. Tolomeo // *Cancer Treat. Rev.* – **2014**. – № 40. – C. 980–989.
22. Sabatini, D.M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship / D.M. Sabatini // *Nat. Rev. Cancer.* – **2006**. – № 6. – C. 729–734.
23. Beauchamp, E.M. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer / E.M. Beauchamp, L.C. Plataniias // *Oncogene.* – **2013**. – № 32. – C. 3923–3932.
24. The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview / A.S. Strimpakos et al. // *Cancer Treat. Rev.* – **2009**. – № 2. – C. 148–159.

25. Lv, X. Furthering the design and the discovery of small molecule ATP-competitive mTOR inhibitors / X. Lv, X. Ma, Y. Hu. // *Expert Opin. Drug Discov.* – **2013.** – № 8. – C. 991–1012.
26. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma / F.R. Ayala et al. // *Molecules.* – **2010.** – № 14. – C. 2374–2387.
27. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor / S.M. Maira et al. // *Mol. Cancer Ther.* – **2012.** – № 11. – C. 317–328.
28. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors / J.C. Bendell et al. // *J. Clin. Oncol.* – **2012.** – № 30. – C. 282–290.
29. Buparlisib, an oral pan-PI3K inhibitor for the treatment of breast cancer / E. Geuna et al. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – **2015.** – № 24. – C. 421–431.
30. Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor / S. Yaguchi et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – **2006.** – № 98. – C. 545–556.
31. Antitumor profile of the PI3K inhibitor ZSTK474 in human sarcoma cell lines / N. Namatame et al. // *Oncotarget.* – **2018.** – № 9. – C. 35141–3516.
32. Discovery of NVP-BYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation / P. Furet et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – **2013.** – № 23. – C. 3741–3748.
33. Design, synthesis and biological evaluation of C-42 hydroxyesters of rapamycin: The identification of CCI-779 / J.S. Skotnicki et al. // *Clin. Cancer Res.* – **2001.** – № 7. – C. 3749–3750.
34. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt / K.E. O'Reilly et al. // *Cancer Res.* – **2006.** – № 66. – C. 1500–1508.
35. INK128 is a potent and selective TORC1/2 inhibitor with broad oral antitumor activity / K. Jessen et al // *Mol. Cancer Ther.* – **2009.** – № 8. – C. B148.
36. AZD2014, an inhibitor of mTORC1 and mTORC2, is highly effective in ER+ breast cancer when administered using intermittent or continuous schedules / S.M. Guichard et al. // *Mol. Cancer Ther.* – **2018.** – № 14. – C. 2508–2518.

37. The dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 restricts the growth of lung cancer tumors regardless of EGFR status, as a potent accompanist in combined therapeutic regimens / Y. Wu et al. // *J. Exp Clin. Cancer Res.* – **2019.** – № 38.
38. First-in-human phase I study of Pictilisib (GDC-0941), a potent Pan-Class I Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors / D. Sarker et al // *Clin. Cancer Res.* – **2015.** – № 21. – C. 77–86.
39. Fisel, P. Clinical and functional relevance of the monocarboxylate transporter family in disease pathophysiology and drug therapy / P. Fisel, E. Schaeffeler, M. Schwab // *Clin. Transl. Sci.* – **2018.** – № 11. – C. 352–364.
40. Fishbein, W.N. Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle / W.N. Fishbein, N. Merezhinskaya, J.W. Foellmer // *Muscle Nerve.* – **2012.** – № 26. – C. 101–112.
41. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma / C. Pinheiro et al. // *Histopathology.* – **2010.** – № 56. – C. 860–867.
42. Synthesis and structure–activity relationships of pteridine dione and trione monocarboxylate transporter 1 inhibitors / H. Wang et al. // *J. Med. Chem.* – **2014.** – № 57. – C. 7317–7324.
43. Monocarboxylate transporter 1 inhibitors as potential anti-cancer agents / S. Gurrupu et al // *ACS Med. Chem. Lett.* – **2015.** – № 6. – C. 558–561.
44. MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors / K. Birsoy et al // *Nat. Genet.* – **2013.** – № 45. – C. 104–108.
45. Jones, R.S. Quercetin, morin, luteolin, and phloretin are dietary flavonoid inhibitors of monocarboxylate transporter 6 / R.S. Jones, M.D. Parker, M.E. Morris // *Mol. Pharm.* – **2017.** – № 14. – C. 2930–2936.
46. Inhibitory effects of statins on human monocarboxylate transporter 4 / M Kobayashi et al. // *Int. J. Pharm.* – **2006.** – № 317. – C. 19–25.
47. Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells / A. Floridi et al. // *J. Natl. Cancer. Inst.* – **1981.** – № 66. – C. 497–499.

48. «A phase II clinical and pharmacokinetic study of Lonidamine in patients with advanced breast cancer / J.L. Mansi et al. // *Br. J. Cancer.* – **1991.** – № 64. – C. 593–597.
49. Paclitaxel, cisplatin and lonidamine in advanced ovarian cancer. A phase II study / M. De Lena et al. // *Eur. J. Cancer.* – **2001.** – № 37. – C. 364–368.
50. Targeting lonidamine to mitochondria mitigates lung tumorigenesis and brain metastasis / G. Cheng et al // *Nat. Commun.* – **2019.** – № 37. – C. 2205.
51. The specific monocarboxylate transporter (MCT1) inhibitor, AR-C117977, a novel immunosuppressant, prolongs allograft survival in the mouse / V. Bueno et al. // *Transplantation.* – **2007.** – № 84. – C. 1204–1207.
52. A small synthetic molecule capable of preferentially inhibiting the production of the CC chemokine monocyte chemoattractant protein-1 / M. Sironi et al. // *Eur. Cytokine. Netw.* – **1999.** – № 10. – C. 437–442.
53. Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate / Y. Futagi et al // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – **2018.** – № 495. – C. 427–432.
54. Parnell, K.M. Mc-Call J.M. MCT4 inhibitors for treating disease / K.M. Parnell, J.M. Mc-Call // Patent WO 2016/201426A1 USA. **2016.**
55. Preparation of multifunctional drug carrier for tumor-specific uptake and enhanced intracellular delivery through the conjugation of weak acid labile linker / C. Ding et al. // *Bioconjugate Chem.* – **2009.** – № 20. – C. 1163–1170.
56. From solution to in-cell study of the chemical reactivity of acid sensitive functional groups: a rational approach towards improved cleavable linkers for biospecific endosomal release / S.A. Jacques et al. // *Org. Biomol. Chem.* – **2016.** – № 14. – C. 4794–4803.
57. Tunable pH-sensitive linker for controlled release / C.J. Choy et al. // *Bioconjug. Chem.* – **2016.** – № 27. – C. 824–830.
58. New and practical synthesis of gedatolisib / X. Liu et al. // *Org. Process Res.* – **2018.** – № 22. – C. 62–66.

59. Novel gemini micelles from dimeric surfactants with oxyethylene spacer chain. Small angle neutron scattering and fluorescence studies / S. De et al. // *J. Phys. Chem.* – **1998**. – № 102. – С. 6152–6160.
60. Tuning of 4,6-bisphenyl-2-(3-alkoxyanilino)pyrimidine focusing on the activity-sensitive aminoalkoxy moiety for a therapeutically useful inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE) / Y.T. Han et al. // *Bioorg. Med. Chem.* – **2015**. – № 23. – С. 579–587.
61. Synthesis and properties of poly(norbornene)s with lateral aramid groups / P. Kong et al. // *Polym. Chem.* – **2019**. – № 10. – С. 2057–2063.
62. Unprecedented “in water” imidazole carbonylation: paradigm shift for preparation of urea and carbamate / K.J. Padiya et al. // *Org. Lett.* – **2012**. – № 11. – С. 2814–2817.
63. Majer, P. A safe and efficient method for preparation of N,N'-unsymmetrically disubstituted ureas utilizing triphosgene / P. Majer, R. S. Randad // *J. Org. Chem.* – **1994**. – № 7. – С. 1937–1938.
64. Bis(trichloromethyl) carbonate in organic synthesis / L. Cotarca et al. // *Synthesis*. – **1996**. – № 5 – С. 553-576.
65. N-bis-silylation of α -amino acids: “benzostabases” as amino protecting group / F.Cavelier-Frontin et al. // *Tetrahedron*. – **1991**. – № 47. – Т. 47. – С. 9807-9822.
66. Bandyopadhyay, D. Novel synthesis of 3-pyrrole substituted β -lactams via microwave-induced bismuth nitrate-catalyzed reaction / D. Bandyopadhyay, J. Cruz, B.K.Banik // *Tetrahedron*. – **2012**. – № 52. – С. 10686-10695.
67. Голодников, Г.В. Практические работы по органическому синтезу / Г.В. Голодников. – Ленинград: ИЛУ, **1966**. – С. 312
68. Non-peptide-based new class of platelet aggregation inhibitors: Design, synthesis, bioevaluation, SAR, and in silico studies / P.K. Jaiswal et al. // *Arch. Pharm.* – **2018**. – № 351. – С. e1700349.
69. Palladium-catalyzed phosphorylation of pyrazoles substituted by electron-withdrawing groups / Q. Huang et al. // *Tetrahedron*. – **2015**. – № 71. – С. 7250–7259.

70. Goikhman, R. C–H bonds as ubiquitous functionality: a general approach to complex arylated pyrazoles via sequential regioselective C-arylation and N-alkylation enabled by sem-group transposition / Roman Goikhman, Teresa L. Jacques, Dalibor Sames // *J. Am. Chem. Soc.* – **2009**. – №8. – C. 3042–3048.
71. Alberico, D. Aryl–aryl bond formation by transition-metal-catalyzed direct arylation / Dino Alberico, Mark E. Scott, Mark Lautens // *Chem. Rev.* – **2007**. – №1. – C. 174–238
72. Lafrance, M. Palladium-catalyzed benzene arylation: incorporation of catalytic pivalic acid as a proton shuttle and a key element in catalyst design / M. Lafrance, K. Fagnou // *J. Am. Chem. Soc.* – **2006**. – №128. – C. 16496–16497.
73. Catalytic direct arylation with aryl chlorides, bromides, and iodides: intramolecular studies leading to new intermolecular reactions / L.-C. Campeau et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – **2006**. – №2. – C. 581–590.
74. Kim, J. Ligand-promoted direct C–H arylation of simple arenes: evidence for a cooperative bimetallic mechanism / J. Kim, S. H. Hong // *ACS Catal.* – **2017**. – №7. – C. 3336–3343.