

На правах рукописи



Калинин Станислав Алексеевич

**Дизайн и синтез изоформно-селективных ингибиторов карбоангидразы
человека для биомедицинских приложений**

02.00.16 – Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Черноголовка – 2019

Диссертация выполнена в Лаборатории химической фармакологии Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель:

Красавин Михаил Юрьевич

доктор химических наук, Профессор РАН, заведующий Лабораторией химической фармакологии Института химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Официальные оппоненты:

Яровая Ольга Ивановна

доктор химических наук, Ведущий научный сотрудник Лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения РАН

Навроцкий Максим Борисович

доктор химических наук, Профессор, заведующий кафедрой органической химии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный технический университет»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова**»

Защита состоится 24 декабря 2019 года в 15 час. 30 мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.102.02 на базе Федерального государственного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1, зал Ученого совета. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФАВ РАН по адресу: http://www.ipac.ac.ru/diss_sovet/

Автореферат разослан « __ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.102.02
кандидат химических наук

Афанасьева С.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Металлофермент карбоангидраза человека (КАЧ), катализирующий фундаментальную реакцию конверсии диоксида углерода в бикарбонат анион, играет ключевую роль во многих физиологических и патологических процессах. В частности, активность наиболее значимых изоформ данного белка обеспечивает регуляцию внутри- и внешнеклеточного рН, секреции внутриглазной жидкости, кислотности желудочного сока, а также обуславливает адаптацию раковых клеток к гипоксическим условиям в структуре опухоли. В настоящий момент активно изучается роль отдельных типов КАЧ в заболеваниях ЦНС, механизмах активации подвижности сперматозоидов, ожирении и в других значимых терапевтических областях.

Основным вызовом при создании ингибиторов КАЧ является достижение изоформной селективности, т.к. неизбирательно действующие вещества неоптимальны для успешного решения биомедицинских задач. Сложность дизайна соединений с необходимым ингибиторным профилем обусловлена очень высокой схожестью первичной структуры и пространственного строения каталитических сайтов разных изоформ.

Известно, что снижение активности нецелевых изоформ КАЧ, с которым сопряжено применение неселективных агентов в клинике, приводит к возникновению ряда нежелательных эффектов и снижает терапевтическое значение препаратов. Кроме того, использование неизбирательных ингибиторов в физиологических исследованиях серьезно ограничивает возможности установления роли отдельных изоформ фермента в механизмах заболеваний и затрудняет процесс валидации новых терапевтических подходов.

Скрининг обширных библиотек малых молекул сегодня является единственным источником изоформно-селективных соединений. Высокие временные и материальные затраты на проведение кинетических экспериментов, низкая предсказуемость результатов – важнейшие факторы, сдерживающие развитие данной области медицинской химии.

В настоящей работе предложены новые эффективные подходы к созданию изоформно-селективных ингибиторов КАЧ, включающие использование многокомпонентной химии и рационального дизайна соединений. Кроме того, в работе уделено внимание созданию селективных ингибиторов сравнительно малоизученных изоформ фермента (IV, VII), необходимых для изучения потенциала данных типов КАЧ как терапевтических мишеней.

Степень разработанности темы исследования. Значительное количество работ описывает синтез и скрининг новых соединений в отношении ряда изоформ КАЧ. В редких случаях исследуемые вещества демонстрируют привлекательный ингибиторный профиль, проявляя селективность в отношении терапевтически значимого типа фермента и низкую активность в отношении нецелевых (*off-target*) изоформ. Кроме того,

были предприняты немногочисленные попытки рационального предсказания активности соединений в отношении той или иной изоформы. В то же время успешных примеров целенаправленного рационального дизайна селективных ингибиторов КАЧ в литературе не обнаружено.

Применение такого современного и эффективного медицинско-химического инструмента как многокомпонентные реакции оказалось крайне ограниченным в области создания ингибиторов КАЧ.

Цель и задачи работы. Цель данной работы: продемонстрировать возможность применения рациональных подходов к созданию изоформно-селективных ингибиторов КАЧ для биомедицинских приложений.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

- Провести дизайн и синтез скрининговых серий сульфонамидсодержащих соединений для поиска изоформно-селективных ингибиторов КАЧ на основе современных эффективных стратегий синтеза лекарственно-подобных соединений (в том числе с использованием многокомпонентной химии).
- Осуществить анализ наиболее значимых особенностей взаимосвязи «структура-активность» при помощи компьютерного моделирования.
- Провести рациональный дизайн и синтез улучшенных серий сульфонамидсодержащих соединений на основании гипотезы о взаимосвязях «структура-активность», выдвинутой по результатам компьютерного моделирования.
- Изучить биологическую активность полученных соединений на релевантных моделях.

Научная новизна работы. Впервые успешно использованы инструменты рационального дизайна для создания селективных ингибиторов КАЧ. Раскрыт потенциал многокомпонентных подходов для дизайна, синтеза и оптимизации изоформно-селективных ингибиторов КАЧ. Получен и охарактеризован ряд ранее неописанных соединений, установлен их ингибиторный профиль в отношении терапевтически значимых изоформ КАЧ, определены вероятные позы связывания с ферментом, показана *in vitro* противораковая активность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы являются основой для развития более эффективных и предсказуемых с точки зрения результата подходов к созданию изоформно-селективных ингибиторов КАЧ. В ходе работы собрана и обобщена обширная информация о взаимосвязях «структура-активность» для синтезированных соединений. Получен ряд изоформно-селективных ингибиторов для терапевтически релевантных типов фермента, данные соединения протестированы на клеточных моделях заболеваний, выявлены соединения, являющиеся перспективными с точки зрения биомедицинских приложений.

Методология и методы. При выполнении диссертационного исследования применялись физико-химические методы идентификации и анализа чистоты полученных соединений, в частности ЯМР – спектроскопия на ядрах ^1H и ^{13}C , методы

масс-спектрометрии. Для разделения и очистки полученных соединений использовались методы высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Установление ингибиторного профиля полученных соединений проводилось кинетическим методом остановленной струи с использованием рекомбинантных белков. Анализ экспрессии м-РНК отдельных изоформ КАЧ в клеточных культурах осуществлялся посредством проведения полимеразной цепной реакции. Анализ выживаемости клеток в присутствии ингибиторов КАЧ проводился с использованием стандартного МТТ-теста. Докинг соединений в активный сайт лиганда проводился с помощью программного обеспечения GOLD, Schrödinger.

Степень достоверности и апробация научных результатов. Достоверность положений, выносимых на защиту, а также выводов диссертации подтверждена выполнением экспериментов в контролируемых и воспроизводимых условиях, с использованием необходимого числа повторений. Проведение докинга и симуляции молекулярной динамики осуществлено с применением широко используемого программного обеспечения. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: IV Междисциплинарный Симпозиум по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике (Новый Свет, 23-26 сентября 2018); 2 Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург. 15-17 ноября – 2018); XXVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019» (Москва 8-12 апреля 2019).

Положения, выносимые на защиту.

- Подход к созданию изоформно-селективных ингибиторов КАЧ с использованием многокомпонентной химии и рационального дизайна
- Синтез серий сульфонамидсодержащих соединений
- Определение ингибиторного профиля полученных соединений
- Анализ взаимосвязей «структура-активность» для полученных ингибиторов КАЧ
- Исследование потенциала полученных соединений для биомедицинских приложений

Соответствие паспорту специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 02.00.16 – Медицинская химия – согласно пунктам:

1 (а, б, в), 3, 6, 8.

Публикации По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 13 статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ и 3 тезисов докладов.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке целей и задач исследования. Самостоятельно выполнил синтез соединений, содержащихся в скрининговых сериях, произвел изучение ингибиторного профиля полученных веществ.

Биологическое тестирование полученных соединений на клеточных линиях проведено автором собственноручно. Автор самостоятельно интерпретировал закономерности взаимосвязи «структура-активность» для полученных ингибиторов КАЧ. Автор принимал участие в проведении докинга и симуляции молекулярной динамики для полученных соединений в активном сайте фермента, а также в подготовке публикаций и апробации результатов исследования на научных конференциях различного уровня.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 200 страницах машинописного текста, содержат 44 рисунка, 29 схем, 8 таблиц, 1 приложение и 218 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертация посвящена подходам к созданию изоформно-селективных ингибиторов КАЧ для биомедицинских приложений, дизайну, синтезу и изучению биологической активности новых ингибиторов данного фермента. Во **Введении** обоснована актуальность темы работы, сформулированы цель и задачи, отражены научная новизна, практическая и теоретическая значимость исследования. В **Главе 1** приведен обзор научной литературы по строению, разнообразию и распространению в организме изоформ КАЧ, проблеме избирательного ингибирования и перспективам биомедицинских приложений селективных ингибиторов отдельных изоформ. Проанализированы случаи применения многокомпонентных реакций для синтеза ингибиторов данного фермента. Рассмотрены попытки рационального дизайна соединений, активных и/или селективных в отношении отдельных изоформ КАЧ. В **Главе 2** приведены результаты работы по дизайну, синтезу, и изучению биологической активности новых изоформно-селективных ингибиторов КАЧ. В **Главе 3** описаны методы синтеза, *in silico* анализа поз связывания и изучения *in vitro* биологической активности полученных ингибиторов КАЧ.

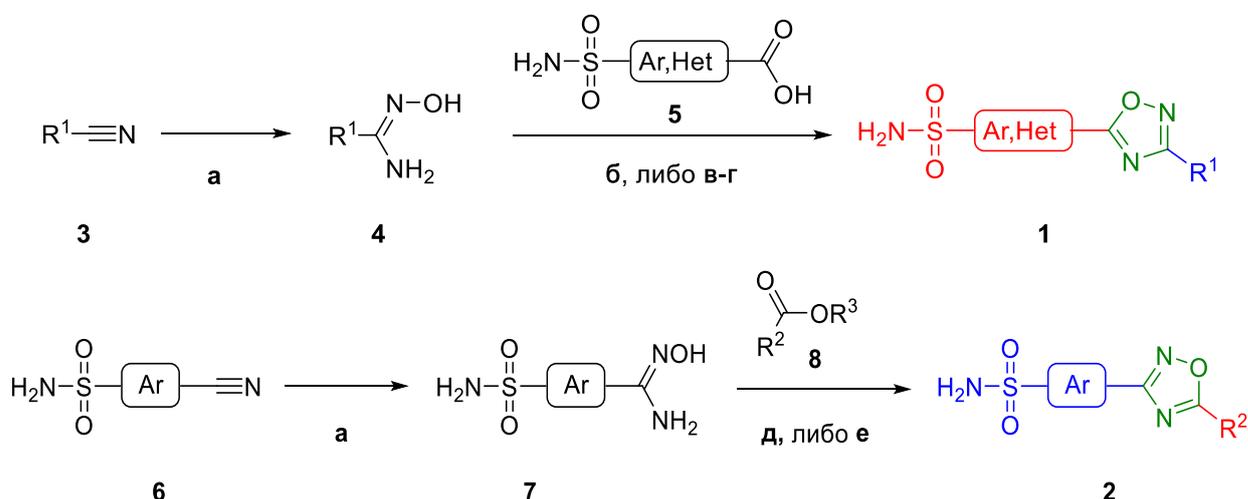
Результаты и обсуждение

1. Скрининг ингибиторной активности производных 1,2,4-оксадиазола

Традиционно поиск ингибиторов КАЧ основан на скрининге серий сульфонамидсодержащих соединений. Скрининговые серии при этом, как правило, создают вокруг выбранного скаффолда за счет варьирования молекулярной периферии («tail approach»). В удачных случаях такой подход позволяет идентифицировать высокопотентные и в том числе селективные ингибиторы той или иной изоформы КАЧ. В ходе работы в рамках данного подхода нами были синтезированы и изучены две серии производных 1,2,4-оксадиазола **1,2**.

Синтез соединений был проведен, в том числе с использованием предложенной нами методики одnoreакторного получения 1,2,4-оксадиазолов из амидоксимов и сложных эфиров/карбоновых кислот (схема 1).

Схема 1



Условия: а. $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ (1,5 экв.), NaHCO_3 (2,0 экв.), EtOH, 80 °С, 2-6 ч.; б. КДИ (1,0 экв.), ДМАА, 25 °С, 12 ч., 100 °С, 6 часов; в. ЭДКИ (1,1 экв.), ацетон, 25 °С, 12 ч.; г. КОН (1 экв.), ДМСО, 25 °С, 0,5 ч.; д. КДИ (1,2 экв.), ДМСО, 25 °С, 18 ч., NaOH (1,2 экв.), 25 °С, 2 ч.; е. NaOH (1,5 экв.), ДМСО, 25 °С, 2-4 ч.

Две серии полученных таким образом производных 1,2,4-оксадиазола **1** и **2** (всего 55 соединений) содержали арил(гетероарил)сульфонамидный фрагмент в положении 5 либо 3 гетероциклического ядра соответственно.

Синтезированные соединения были протестированы на панели ферментов, включающей мембранносвязанную изоформу КАЧ IX (мишень для противораковых препаратов нового типа), а также цитозольные КАЧ II (валидированная мишень в терапии глаукомы) и КАЧ I (связана с рядом нежелательных эффектов). Исследование ингибиторной активности веществ **1**, **2** позволило идентифицировать ингибиторы терапевтически релевантных изоформ КАЧ II и КАЧ IX, активные на уровне 10^{-9} - 10^{-10} М (таблицы 1, 2).

Таблица 1. Выходы и ингибиторный профиль производных 1,2,4-оксадиазола **1**, содержащих арил(гетероарил)сульфонамидный фрагмент в положении 5 гетероциклического ядра (избранные результаты).

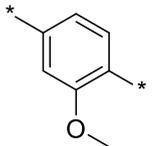
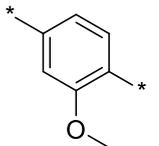
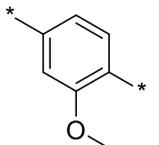
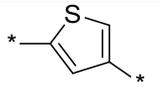
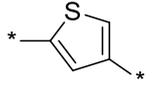
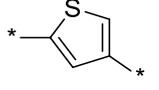
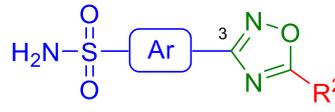
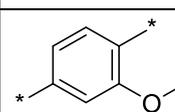
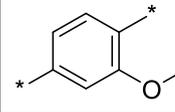
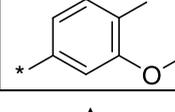
Соединение	 1					
	—Ar, Het—	R ¹	ВЫХОД, %	K _i , M		
				КАЧ I	КАЧ II	КАЧ IX
1a	<i>n</i> -Фенилен	2-ClC ₆ H ₄	57	$(6,3 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-10}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-8}$
1б	<i>n</i> -Фенилен	2-MeOC ₆ H ₄	58	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(5,1 \pm 0,5) \times 10^{-10}$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
1в	<i>n</i> -Фенилен	3-MeOC ₆ H ₄	45	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-10}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
1г	<i>n</i> -Фенилен	3-ClC ₆ H ₄	59	$(6,5 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(7,1 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
1д		2-ClC ₆ H ₄	30	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-9}$
1е		3-(EtCONH)C ₆ H ₄	34	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	$(8,6 \pm 0,8) \times 10^{-10}$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
1ж		3-Py	43	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	$(7,4 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^{-7}$
1з	<i>m</i> -Фенилен	3-Py	54	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(7,7 \pm 0,8) \times 10^{-10}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-9}$
1и	<i>m</i> -Фенилен	<i>i</i> -Pr	63	$(7,7 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(7,1 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-9}$
1к	<i>n</i> -Фенилен	4-Py	70	$(8,5 \pm 0,8) \times 10^{-8}$	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^{-10}$	$(2,7 \pm 0,5) \times 10^{-9}$
1л	<i>n</i> -Фенилен	4-FC ₆ H ₄	77	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$2,7 \pm 0,3) \times 10^{-9}$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
1м		Ph	59	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^{-8}$	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-9}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-10}$
1н		<i>c</i> -Pr	75	$(9,3 \pm 0,9) \times 10^{-8}$	$(7,5 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^{-11}$
1м		3-MeOC ₆ H ₄	66	$(5,4 \pm 0,5) \times 10^{-9}$	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^{-10}$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-9}$
Ацетазоламид				$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-8}$

Таблица 2. Выходы и ингибиторный профиль производных 1,2,4-оксадиазола **2**, содержащих арилсульфонамидный фрагмент в положении 3 гетероциклического ядра (избранные результаты).

Соединение	 2					
	-Ar-	R	Выход, %	K _i , M		
				КАЧ I	КАЧ II	КАЧ IX
2а	<i>n</i> -Фенилен	3-Тиенил	51	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^9$	$(5,9 \pm 0,6) \times 10^{-10}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^9$
2б	<i>n</i> -Фенилен	<i>c</i> -Pr	87	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^9$	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^9$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^9$
2в	<i>n</i> -Фенилен	Ph	89	$(6,5 \pm 0,6) \times 10^8$	$(7,4 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	$(7,7 \pm 0,8) \times 10^{-10}$
2г	<i>n</i> -Фенилен	2-Пу	79	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^8$	$(9,3 \pm 0,9) \times 10^{-10}$	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^{-10}$
2д	<i>m</i> -Фенилен	3-Тиенил	63	$(8,3 \pm 0,8) \times 10^8$	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^{-10}$	$(8,8 \pm 0,9) \times 10^{-10}$
2е	<i>m</i> -Фенилен	<i>c</i> -Pr	57	$(7,6 \pm 0,8) \times 10^7$	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^9$	$(9,2 \pm 0,9) \times 10^8$
2ж		3-Пу	42	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^8$
2з		Ph	77	$(4,6 \pm 0,5) \times 10^7$	$(8,8 \pm 0,9) \times 10^9$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^8$
2и		2-Тиенил	63	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^6$	$(9,2 \pm 0,9) \times 10^8$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^8$
Ацетазоламид				$(2,5 \pm 0,2) \times 10^7$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^8$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^8$

Из результатов тестирования можно видеть, что некоторые полученные соединения **1** и **2** проявляют избирательную активность по отношению к мембранно-связанной КАЧ IX, в сравнении с цитозольными КАЧ I и II. Изученные серии включали в себя ряд веществ, являющихся изомерами и различающихся взаимным расположением заместителей относительно гетероциклического скаффолда. В ряде случаев (например **1ж/2ж**) мы отмечаем существенное изменение и обращение селективности ингибиторного действия таких веществ.

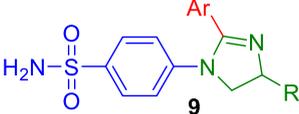
Нами был сделан вывод о целесообразности дизайна скрининговых серий включающих группы соединений, изомерных с точки зрения взаимного расположения заместителей вокруг базовой структуры. Использование такого рода изменения структуры (*scaffold hopping*) в ходе дизайна скрининговых серий может способствовать получению ценной информации о взаимосвязи «структура-активность», а также наиболее полной реализации потенциала того или иного скаффолда в области создания изоформно-селективных ингибиторов КАЧ.

2. Дизайн и синтез изоформно-селективных ингибиторов КАЧ VII

В продолжение поиска изоформно-селективных ингибиторов КАЧ, нами была изучена серия полученных ранее в нашей группе производных 2-арилимидазолина, содержащих 4-сульфамойлфенильный заместитель при атоме азота **9**.

Выбранные соединения содержали первичную сульфонамидную группу, способную выступать в качестве цинк-связывающего фрагмента, а также два варьируемых гидрофобных заместителя в положениях 2 и 4 гетероциклического ядра. Выбранные соединения были протестированы на панели четырех изоформ КАЧ, включающей изоформы I и II, а также сравнительно малоизученные КАЧ IV и КАЧ VII, распространенные в головном мозге и ассоциированные с рядом заболеваний. Изучение производных **9** позволило идентифицировать высокопотентные ингибиторы II и VII изоформ фермента (таблица 3).

Таблица 3. Ингибиторный профиль производных имидазолина **9**, содержащих арилсульфонамидный фрагмент в положении 1 гетероциклического ядра.

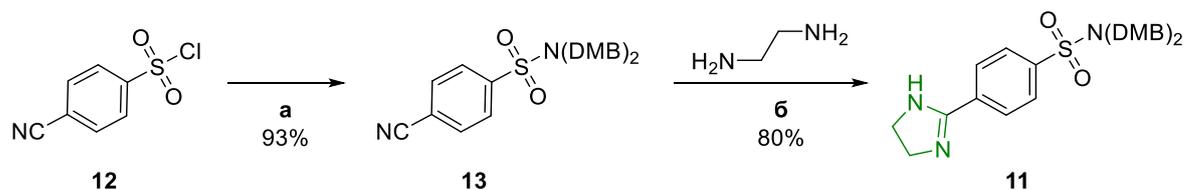
Соединение						
	Ar	R	K _i , M			
			КАЧ I	КАЧ II	КАЧ IV	КАЧ VII
9a	4-FC ₆ H ₄	H	(2,3±0,2) × 10 ⁶	(7,6±0,8) × 10 ⁸	(9,7±0,9) × 10 ⁶	(3,0±0,3) × 10 ⁷
9б	4-ClC ₆ H ₄	H	(9,6±0,9) × 10 ⁷	(4,7±0,5) × 10 ⁸	(8,1±0,8) × 10 ⁶	(2,7±0,3) × 10 ⁷
9в	4-FC ₆ H ₄	Me	(8,2±0,8) × 10 ⁷	(5,3±0,5) × 10 ⁸	(8,7±0,9) × 10 ⁶	(8,7±0,9) × 10 ⁸
9г	4-ClC ₆ H ₄	Me	(9,0±0,9) × 10 ⁷	(5,4±0,5) × 10 ⁸	(6,8±0,7) × 10 ⁶	(7,0±0,7) × 10 ⁷
9д	3-BrC ₆ H ₄	H	(1,8±0,2) × 10 ⁶	(5,3±0,5) × 10 ⁸	(5,0±0,5) × 10 ⁶	(2,1±0,2) × 10 ⁷
9е	3-BrC ₆ H ₄	Me	(1,3±0,1) × 10 ⁶	(5,5±0,5) × 10 ⁸	(5,2±0,5) × 10 ⁶	(4,6±0,5) × 10 ⁷
9з	3-MeC ₆ H ₄	H	(3,9±0,4) × 10 ⁶	(1,1±0,1) × 10 ⁷	(9,8±0,9) × 10 ⁶	(9,1±0,9) × 10 ⁷
9ж	3-FC ₆ H ₄	H	(3,2±0,3) × 10 ⁶	(7,6±0,8) × 10 ⁸	>10,0 × 10 ⁶	(3,1±0,3) × 10 ⁷
9и	3-ClC ₆ H ₄	H	(1,7±0,2) × 10 ⁶	(1,9±0,2) × 10 ⁷	(5,7±0,6) × 10 ⁶	(2,0±0,2) × 10 ⁷
9к	3-F-4-MeOC ₆ H ₃	H	(1,2±0,2) × 10 ⁶	(8,1±0,8) × 10 ⁸	(8,3±0,8) × 10 ⁶	(7,1±0,7) × 10 ⁷
9л	4-F-3-MeOC ₆ H ₃	H	(2,2±0,2) × 10 ⁶	(6,2±0,6) × 10 ⁸	(4,3±0,2) × 10 ⁶	(2,6±0,3) × 10 ⁷
9м	3-Cl-4-MeOC ₆ H ₃	H	(4,0±0,4) × 10 ⁶	(2,3±0,2) × 10 ⁷	>10,0 × 10 ⁶	(1,0±0,1) × 10 ⁶
9н	3,4-F ₂ C ₆ H ₃	H	(7,5±0,7) × 10 ⁷	(3,5±0,3) × 10 ⁸	(5,4±0,5) × 10 ⁶	(7,1±0,7) × 10 ⁸
9о	4-Cl-3-CF ₃ C ₆ H ₃	H	(3,7±0,2) × 10 ⁶	(8,4±0,8) × 10 ⁸	(3,9±0,4) × 10 ⁶	(3,3±0,3) × 10 ⁸
Ацетазоламид			(2,5±0,2) × 10 ⁷	(1,2±0,1) × 10 ⁸	(7,4±0,7) × 10 ⁸	(6,0±0,6) × 10 ⁹

Результаты тестирования свидетельствовали о сравнительно низкой активности в отношении изоформы I, считающейся нежелательной мишенью, связанной с рядом побочных эффектов, возникающих при применении ингибиторов КАЧ. Кроме того, низкая активность во всех случаях наблюдалась для КАЧ IV. В то же время, многие протестированные соединения продемонстрировали наномолярный уровень активности в отношении КАЧ II и VII, являясь, таким образом, неселективными ингибиторами этих двух цитозольных изоформ фермента.

Опираясь на выводы, сделанные нами в ходе изучения производных 1,2,4-оксадиазола, мы приняли решение получить выборку альтернативно замещенных производных имидазолина **10**, с целью исследования возможного изменения ингибиторного профиля соединений.

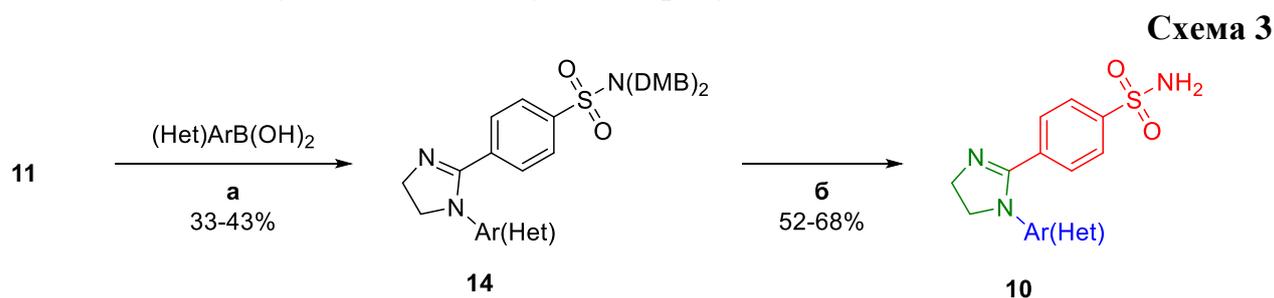
Для синтеза соединений типа **10**, в которых арилсульфонамидный фрагмент расположен в положении 2 гетероциклического ядра, был выбран недавно предложенный нашей группой метод *N*-арилирования имидазолинов бороновыми кислотами по Чену-Эвансу-Ламу.

Исходный имидазолин **11**, содержащий *N,N*-бис-диметоксибензил-сульфонамидную группу был получен в три стадии, согласно схеме 2.



Условия: а) $(DMB)_2NH$, CH_2Cl_2 , Et_3N , комнатная температура, 12ч.; б) CS_2 , 120 °С, 2ч.

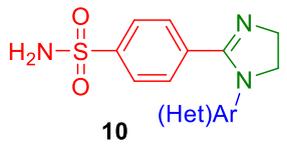
N-Арилирование имидазолина **11** различными арилбороновыми кислотами по Чену-Эвансу-Ламу с последующим снятием *N,N*-бис-диметоксибензильной защитной группы позволило получить соответствующие продукты **10** (схема 3).



Условия: а) $Cu(OAc)_2$ (1,5 экв), K_2CO_3 (2,5 экв.), ДМСО, комнатная температура, 24 ч. б) ТФУК, дихлорметан, 0 °С, 0,5ч.

Ингибиторный профиль полученных таким образом соединений **10** был изучен на панели четырех изоформ КАЧ (таблица 4).

Таблица 4. Выходы и ингибиторный профиль производных имидазолина **11**, содержащих арилсульфонамидный фрагмент в положении 2 гетероциклического ядра.

Соединение	 10 (Het)Ar					
	Ar(Het)	Выход, %	K _i , M			
			КАЧ I	КАЧ II	КАЧ IV	КАЧ VII
10a	4-FC ₆ H ₄	60	$(4,6 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(7,4 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(9,4 \pm 0,9) \times 10^{-9}$
10б	4-ClC ₆ H ₄	65	$(4,5 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(6,1 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(9,6 \pm 0,9) \times 10^{-10}$
10в	Ph	53	$(4,7 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	$(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-9}$
10г	4-MeOC ₆ H ₄	64	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$(5,4 \pm 0,5) \times 10^{-8}$	$(3,6 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	$(9,7 \pm 0,9) \times 10^{-10}$
10д	3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₄	68	$(8,5 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	$(7,2 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(8,3 \pm 0,8) \times 10^{-6}$	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-10}$
10е	2-MeC ₆ H ₄	63	$(7,1 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(6,2 \pm 0,6) \times 10^{-8}$	$(9,6 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(9,3 \pm 0,9) \times 10^{-10}$
10ж	2-EtOC ₆ H ₄	52	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(8,4 \pm 0,8) \times 10^{-10}$
10з	3-Py	58	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$(8,5 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(8,4 \pm 0,8) \times 10^{-10}$
10и	Пиримидин -5-ил	64	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$(7,0 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(8,3 \pm 0,8) \times 10^{-10}$
Ацетазоламид			$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$(7,4 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(6,0 \pm 0,6) \times 10^{-9}$

Полученные данные позволили обнаружить соединения, обладающие выраженной селективностью в отношении КАЧ VII (перспективной мишени для лечения ряда заболеваний ЦНС). Практически все синтезированные соединения **10** проявляли субнанолярную активность в отношении данной изоформы, в то время как понижение активности в отношении другой цитозольной изоформы – КАЧ II – составило в некоторых случаях почти два порядка. Ингибирование КАЧ I и IV осталось на достаточно низком уровне, обеспечивая избирательное действие полученных соединений в отношении КАЧ VII (рисунок 1).

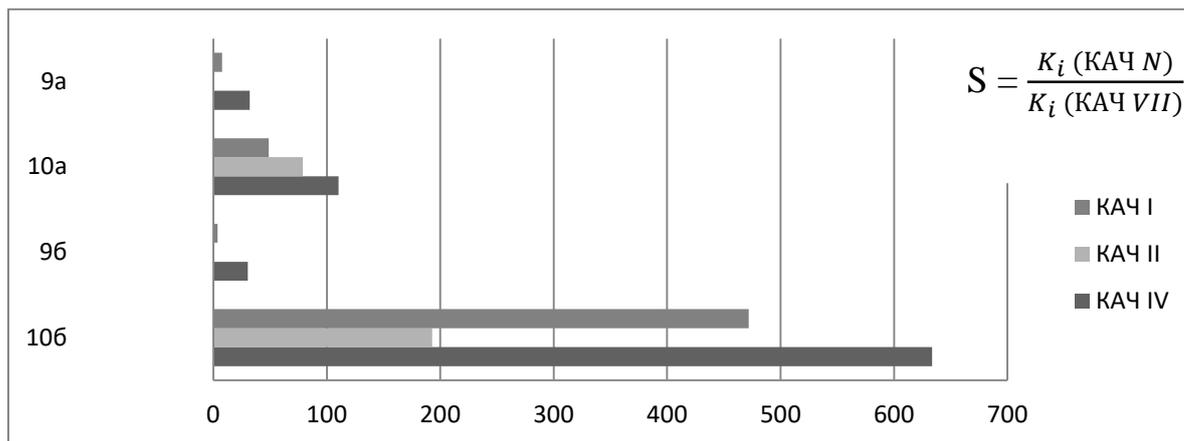


Рисунок 1. Индексы селективности S в отношении КАЧ VII для некоторых производных **9** и **10**.

Привлекает внимание факт обращения селективности между соединениями, характеризующимися изомерным расположением заместителей вокруг имидазолинового ядра. В частности, для соединений **9a,б** и альтернативно замещенных **10a,б** наблюдается существенное изменение профиля селективности (рисунок 1).

С целью объяснить влияние смены положения заместителей на ингибиторный профиль соединений, нами был проведен докинг молекул **9б** и **10б** в активные сайты соответствующих изоформ КАЧ. Исследование показало, что соединение **9б** ориентировано в активных сайтах четырех изоформ примерно одинаковым образом (Комплексы с КАЧ II и VII показаны на рисунок 2А, Б).

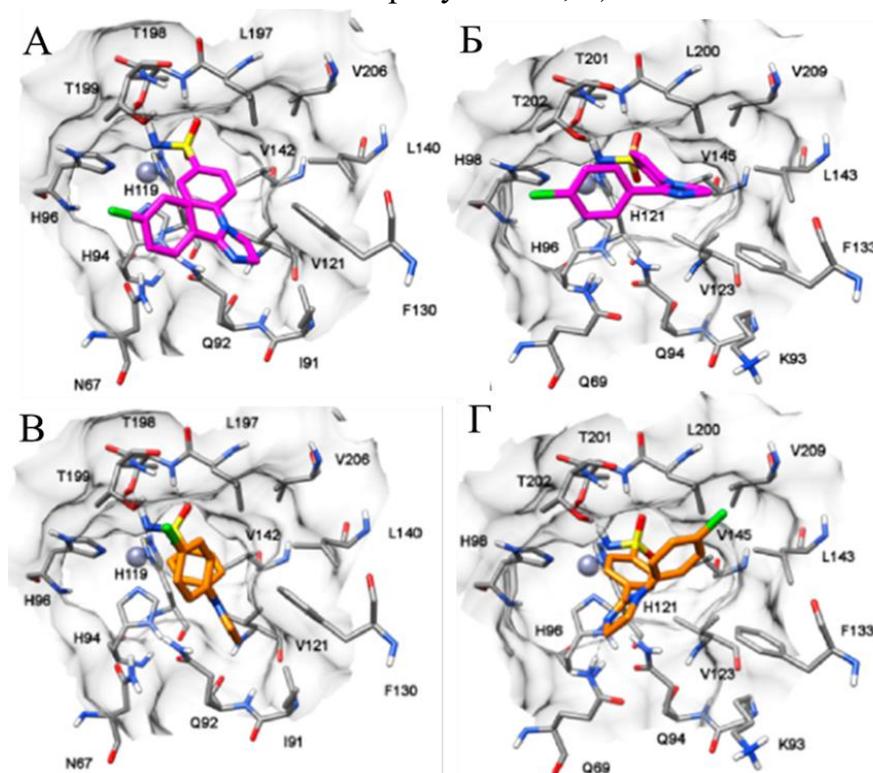


Рисунок 2. Полученные в результате докинга структуры комплексов А) КАЧ II-**9б**, Б) КАЧ VII-**9б**, В) КАЧ II-**10б**, Г) КАЧ VII-**10б**.

При этом сульфонамидная группа соединения **9б** координирована с цинком, а также образует водородные связи с остатком Thr; имидазолиновый цикл вовлечен в

гидрофобные взаимодействия с остатками, образующими липофильную поверхность, общую для всех изоформ; 4-хлорфенильный заместитель ориентирован в объем растворителя и не участвует в стабилизации комплекса ингибитора с ферментом (рисунок 2А, Б).

Аналогичная ориентация наблюдается для комплексов **106** с КАЧ II (рисунок 2В), а также КАЧ I и IV (не показано). Однако в случае КАЧ VII (рисунок 2Г) вероятная поза связывания **106** в активном сайте отличается кардинальным образом. Это объясняется доступностью атома азота N(3) имидазолинового ядра для образования водородной связи с неконсервативным остатком Gln69. Следствием такого дополнительного взаимодействия с поверхностью белка является переориентация 4-хлорфенильного остатка в направлении липофильной полости в структуре активного центра, образованной остатками Leu143, Leu200 и Phe133.

Справедливость данного суждения была подтверждена при помощи симуляции молекулярной динамики для комплекса КАЧ VII-**106**. Эксперимент показал, что структура комплекса оказалась стабильной в пределах отклонений 0.2 – 0.5 Å в течение 11 нсек, при этом водородная связь между атомом азота имидазолинового цикла и остатком Gln69 сохранялась в течение более 90% периода симуляции (рисунок 3).

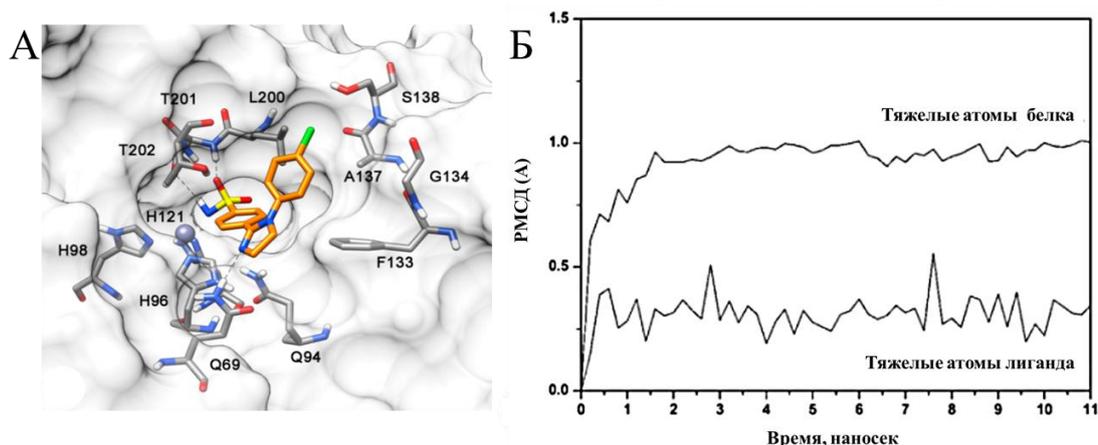


Рисунок 3. Результаты симуляции молекулярной динамики комплекса КАЧ VII-**106**. А) структура комплекса КАЧ VII-**106** с минимальной энергией. Б) Анализ молекулярной динамики тяжёлых атомов рецептора и лиганда в ходе симуляции.

Таким образом, изменение расположения заместителей относительно базовой структуры позволило соединению **106** занять внутри активного сайта целевой изоформы положение, при котором атом азота N(3) способен связываться с неконсервативным аминокислотным остатком, отличающим данный тип КАЧ. В совокупности с переориентацией гидрофобного арильного заместителя в направлении липофильной полости, это привело к повышению селективности в отношении КАЧ VII на несколько порядков.

Результат предпринятого дизайна и синтеза альтернативно замещенной серии сульфонамидсодержащих производных имидазолина представляется весьма ценным, поскольку в подавляющем большинстве случаев ингибирование КАЧ VII малыми молекулами при субнанолярных и нанолярных концентрациях сопровождается

побочным действием на I и II изоформы фермента. Высокая избирательность соединений **10** подтвердила целесообразность использованного подхода к дизайну скрининговых серий для поиска изоформно-селективных ингибиторов КАЧ.

3. Дизайн и синтез изоформно-селективных ингибиторов КАЧ IV

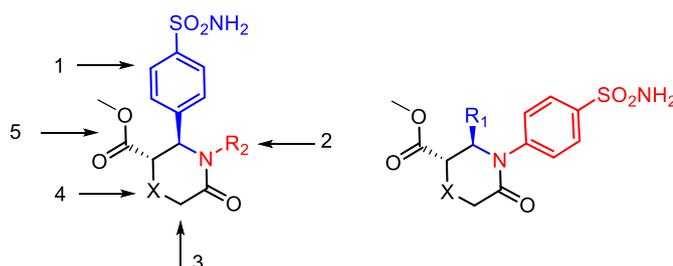
Приведенные выше, а также описанные в литературе данные свидетельствуют о наличии характерных для ингибиторов КАЧ сложных взаимосвязей «структура-активность», которые затруднительно проанализировать *a priori*. С другой стороны, низкая прогнозируемость результатов при применении подхода к созданию ингибиторов КАЧ, базирующегося на скрининге серий сульфонамидсодержащих соединений, является весьма существенным фактором, сдерживающим развитие данной области медицинской химии. Таким образом, весьма актуальной остается проблема применения инструментов рационального дизайна изоформно-селективных ингибиторов КАЧ.

Очевидно, что наиболее надежные результаты рационального дизайна могут быть получены в пределах хемотипа, для которого уже накоплены данные о взаимосвязи «структура-активность» в отношении целевой изоформы. Информация такого рода может быть собрана в результате исследования даже весьма ограниченной серии соединений и использована для моделирования производных, взаимодействующих с неконсервативными аминокислотными остатками в активном сайте соответствующего типа фермента. Необходимые для улучшения целевых свойств структурные модификации в таком случае могут быть определены на основе докинг-анализа поз связывания наиболее активных соединений. При этом следует помнить, что после определения направления желательных модификаций неизбежно возникает проблема их синтетической реализуемости.

Многие типы структур, включая рассмотренные выше производные 1,2,4-оксадиазола (**1**, **2**) и имидазолина (**9**, **10**), предоставляют весьма ограниченное пространство для видоизменения молекулы с целью улучшения заданных свойств. Существенно более привлекательными с этой точки зрения, по нашему мнению являются продукты многокомпонентных реакций, т.к. синтетические подходы, используемые для их получения, позволяют независимо варьировать различные элементы, как молекулярной периферии, так и самой базовой структуры.

Руководствуясь данными соображениями, мы рассмотрели возможность создания новых серий соединений на основе реакции Кастаньоли-Кушмана, представляющей собой взаимодействие аминов и альдегидов (часто, в составе основания Шиффа) с циклическими ангидридами дикарбоновых кислот, приводящее к соответствующим лактамам. На схеме 4 приведен возможный дизайн двух изомерных серий сульфонамидсодержащих лактамов, для одной из базовых структур показано разнообразие точек, доступных для структурной модификации.

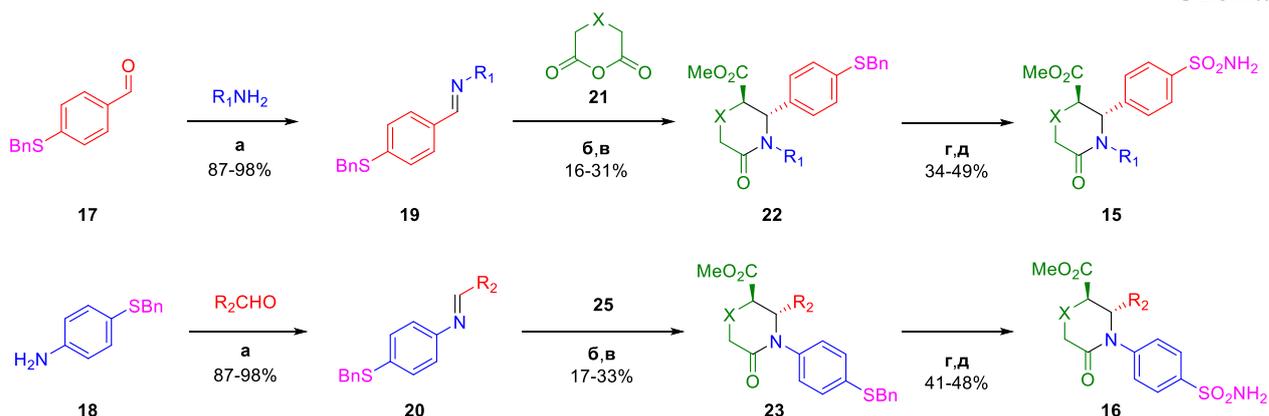
Схема 4



Очевидно, что дизайн скрининговой серии на основе данного синтетического подхода с учетом доступности альтернативно замещенных структур, позволил бы получить два типа соединений, в каждом из которых возможно независимо варьировать не менее 5 элементов, включая размер лактамного цикла, природу гетероатомов, и заместителей. Структуры, обладающие столь обширными возможностями для вариации, способны предоставить существенную свободу для рационального конструирования изоформно-селективных ингибиторов и по этой причине были выбраны нами для создания новой серии, целью которой стало получение информации о взаимосвязи структура активность в отношении мембранно-связанной КАЧ IV.

Прямое введение сульфонамидсодержащих аминов или альдегидов в составе оснований Шиффа в реакцию с циклическими ангидридами дикарбоновых кислот оказалось нереализуемо, по-видимому, в связи с выраженными электронакцепторными свойствами сульфонамидного заместителя, неблагоприятными для протекания процесса. По этой причине получение целевых сульфонамидсодержащих структур **15**, **16** было осуществлено за счет постконденсационного введения сульфонамидной группы в соответствии со схемой 5.

Схема 5



Условия: а) *i*-PrOH, TsOH, 60 °С, 4ч.; б) расплав, 150 °С, 16ч.; в) SOCl₂ (2,5 экв.), MeOH, 0→60 °С, 12ч.; г) *N*-хлорсукцинимид (3,0 экв.), AcOH, комнатная температура, 1ч.; д) NH₃ (водный), MeCN, комнатная температура, 1ч.

Полученные таким образом серии соединений **15** и **16**, выделенных в виде рацемической смеси *транс*-изомеров, были протестированы на панели релевантных изоформ КАЧ (таблица 5).

Таблица 5. Выходы и ингибиторный профиль сульфонамидсодержащих лактамов **15** и **16**, полученных по реакции Кастаньоли Кушмана.

Соединение	X	R ₁	R ₂	Выход, %	K _i , M			
					КАЧ I	КАЧ II	КАЧ IV	КАЧ VII
15a	*	4-MeOC ₆ H ₄	-	43	$(4,4 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-8}$	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-8}$
15б	*	4-ClC ₆ H ₄	-	49	$(5,0 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$(2,9 \pm 0,3) \times 10^{-8}$
15в	*	4-BrC ₆ H ₄	-	37	$(8,0 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(9,7 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^{-8}$
15г	*	Et	-	39	$(7,6 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(5,4 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
15д	*	<i>i</i> -Pr	-	46	$(7,3 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(5,6 \pm 0,6) \times 10^{-8}$
15е	NMs	<i>i</i> -Pr	-	44	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(9,4 \pm 0,9) \times 10^{-8}$	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(8,5 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
15ж	NMs	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	-	46	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^{-9}$	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(8,5 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
15з	O	<i>i</i> -Pr	-	34	$(6,2 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(9,1 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$(9,7 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$(5,5 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
16a	*	-	4-MeC ₆ H ₄	44	$(5,1 \pm 0,5) \times 10^{-8}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-9}$	$(7,2 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(4,9 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
16б	*	-	Ph	41	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^{-8}$	$(6,1 \pm 0,6) \times 10^{-8}$	$(9,6 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(7,9 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
16в	*	-	4-MeOC ₆ H ₄	43	$(9,1 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(4,9 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(4,4 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
16г	*	-	4-ClC ₆ H ₄	48	$(9,2 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(3,7 \pm 0,4) \times 10^{-9}$	$(9,6 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^{-8}$
16д	*	-	4-FC ₆ H ₄	45	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^{-9}$	$(8,1 \pm 0,8) \times 10^{-8}$	$(8,6 \pm 0,9) \times 10^{-8}$
16е	NMs	-	3,4-Cl ₂ C ₆ H ₃	44	$(5,1 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(6,5 \pm 0,6) \times 10^{-8}$	$(7,1 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(6,5 \pm 0,6) \times 10^{-8}$
16ж	NMs	-	4-MeC ₆ H ₄	42	$(9,1 \pm 0,9) \times 10^{-8}$	$(5,6 \pm 0,6) \times 10^{-8}$	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	$(7,9 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
16з	O	-	4-MeC ₆ H ₄	42	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^{-9}$	$(6,1 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(7,9 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
Ацетазоламид					$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$(7,4 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(6,0 \pm 0,6) \times 10^{-9}$

*отсутствует

Из таблицы 5 видно, что полученные соединения продемонстрировали разнообразный профиль активности. Так, структуры **15a-з** проявили выраженное ингибиторное действие против II и VII изоформ КАЧ. В частности соединения **15в** и **15е**

обнаружили ингибиторную активность против II изоформы КАЧ в области 10^{-9} М. К_i КАЧ VII соединений **15a-з** оказались на уровне 10^{-8} М. Активность против I и IV изоформ для соединений данного типа лежала в пределах 10^{-6} - 10^{-7} М.

Соединения **16a-з**, продемонстрировали более высокую активность против всех четырех изоформ. Среди них были идентифицированы наномолярные ингибиторы КАЧ I (**16в**, **16г**, **16з**), и КАЧ II (**16а**, **16д**, **16з**) изоформ КАЧ. Активность против VII изоформы, как и для соединений **16** оказалась на уровне 10^{-8} М. Наконец, особенно выделяется соединение **16г**, обладающее наномолярной ингибиторной активностью в отношении целевой IV изоформы КАЧ. Данное соединение мы сочли привлекательным для применения в качестве структуры-прототипа в ходе рационального дизайна ингибиторов КАЧ, обладающих селективностью по отношению к данному типу фермента.

Для определения направлений структурной модификации неизбирательного прототипа **16г** с целью повышения селективности и активности в отношении КАЧ IV, был предпринят докинг *R,R*- и *S,S*-энантиомеров **16г** в активный сайт данного фермента. Результаты исследования показали, что вблизи сайтов связывания обоих энантиомеров **16г** располагается гидрофильная область поверхности каталитической полости, сложенная остатками Lys91, Glu132, Glu140, Lys206, Asp204 и Thr202. Данный полярный регион характерен именно для целевой IV изоформы КАЧ и не встречается в других изоформах (рисунок 4).

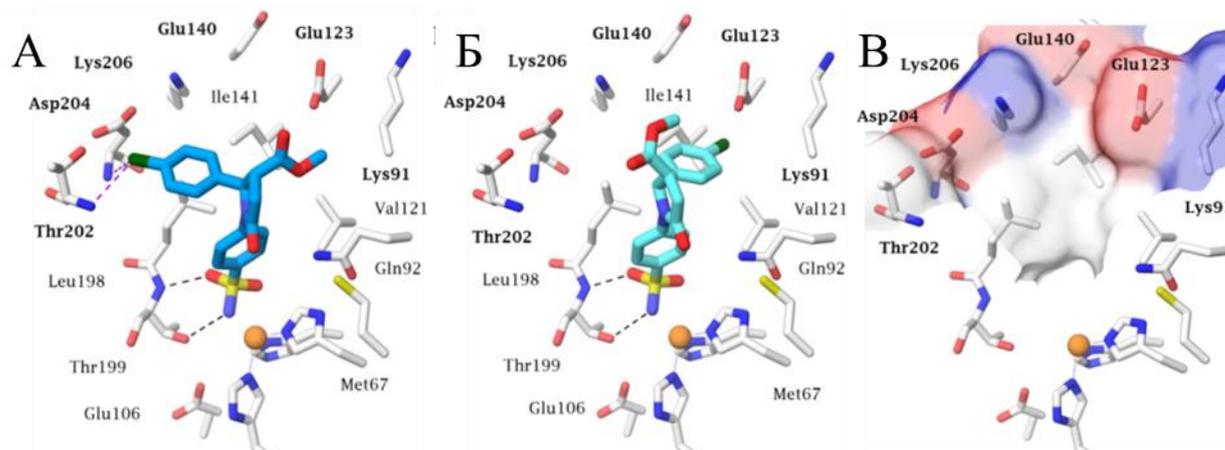
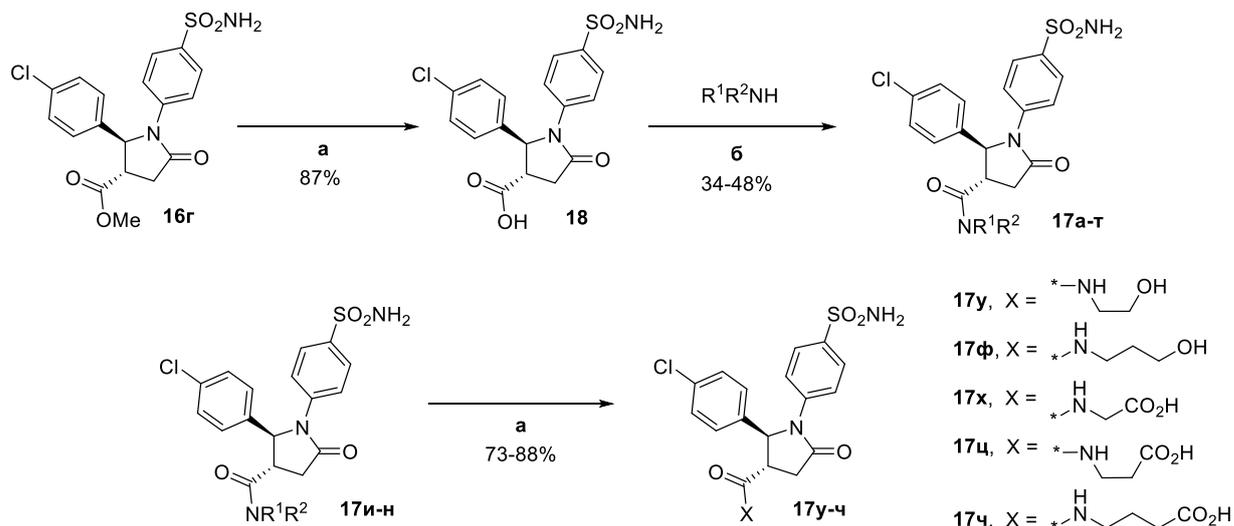


Рисунок 4. Позиция связывания внутри активного сайта КАЧ IV А) *R,R*-**16г**, Б) *S,S*-**16г**; В) характерная гидрофильная область поверхности активного сайта КАЧ IV.

Было определено, что введение в структуру хит-соединения дополнительных полярных либо ионизирующихся центров может привести к образованию дополнительных связей с указанным регионом активного сайта. В качестве точки вариации для проведения данной модификации была выбрана сложноэфирная группа. Замена последней на карбоксамидную функцию позволяла сориентировать вводимые заместители в направлении целевого региона поверхности белка в случае как *R,R*-, так и *S,S*-энантиомера **16г**.

Для получения амидных производных **17а-ч**, была получена кислота **18**, сочетание которой с различными аминами приводило к получению амидов **17а-у**. Щелочной гидролиз некоторых веществ **17и-н** позволил получить структуры **17ф-ч**, также содержащие гидрофильные и ионизирующиеся функциональные группы (схема б).

Схема б

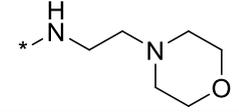
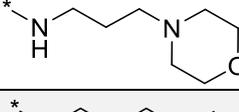
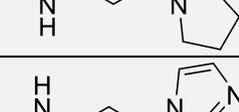
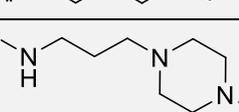
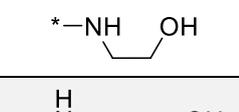
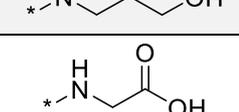
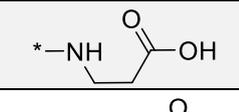
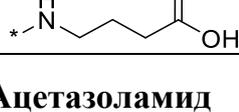
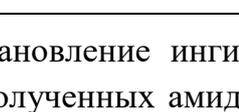
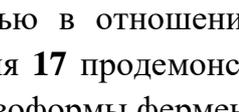


Условия: а) LiOH × H₂O (3,0 экв.), MeOH, 50 °С, 5ч. б) CDI (1,15 экв.), ДМФА, комнатная температура, 12 ч.

Результаты тестирования полученных соединений **17а-ч** против панели изоформ КАЧ приведены в таблице б.

Таблица б. Выходы и ингибиторный профиль соединений **17а-ч** (избранные результаты).

Соединение	NR ₁ R ₂	Выход, %	K _i , М			
			КАЧ I	КАЧ II	КАЧ IV	КАЧ VII
17а		42	$(2,9 \pm 0,3) \times 10^{-7}$	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^{-8}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
17б		64	$(9,6 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(8,9 \pm 0,7) \times 10^{-9}$	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^{-10}$	$(9,5 \pm 0,9) \times 10^{-9}$
17в		66	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$(5,9 \pm 0,6) \times 10^{-10}$	$(4,7 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
17г		66	$(5,1 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	$(8,5 \pm 0,8) \times 10^{-9}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-9}$	$(8,6 \pm 0,9) \times 10^{-8}$
17д		54	$(5,0 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^{-9}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-9}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-9}$
17е		54	$(6,5 \pm 0,6) \times 10^{-7}$	$(7,5 \pm 0,7) \times 10^{-9}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	$(4,6 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
17ж		49	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(6,5 \pm 0,7) \times 10^{-9}$	$(6,9 \pm 0,7) \times 10^{-8}$

17з		64	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^{-7}$	$(5,9 \pm 0,6) \times 10^{-9}$	$(6,1 \pm 0,6) \times 10^{-10}$	$(5,6 \pm 0,6) \times 10^{-9}$
17и		58	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(6,7 \pm 0,7) \times 10^{-9}$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-9}$	$(7,0 \pm 0,7) \times 10^{-8}$
17к		60	$(7,2 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^{-10}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-7}$
17л		63	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-6}$	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(6,6 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^{-7}$
17м		58	$(7,5 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(9,5 \pm 0,9) \times 10^{-9}$	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^{-10}$	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^{-8}$
17н		88	$(3,7 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-9}$	$(9,0 \pm 0,9) \times 10^{-10}$	$(6,3 \pm 0,6) \times 10^{-8}$
17о		81	$(6,1 \pm 0,6) \times 10^{-6}$	$(7,9 \pm 0,8) \times 10^{-9}$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-10}$	$(8,1 \pm 0,8) \times 10^{-8}$
17п		73	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-8}$	$(5,8 \pm 0,6) \times 10^{-9}$	$(6,5 \pm 0,6) \times 10^{-10}$	$(3,0 \pm 0,3) \times 10^{-9}$
17р		81	$(8,9 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^{-10}$	$(4,1 \pm 0,4) \times 10^{-8}$
17с		87	$(7,4 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$(3,7 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-9}$	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
Ацетазоламид			$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$(7,5 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-9}$

Установление ингибиторного профиля синтезированных соединений показало, что ряд полученных амидных производных обладает более высокой, субнаномолярной активностью в отношении КАЧ IV, превосходя прототип **16г**. Более того, многие соединения **17** продемонстрировали весьма существенную селективность в отношении целевой изоформы фермента (рисунок 5).

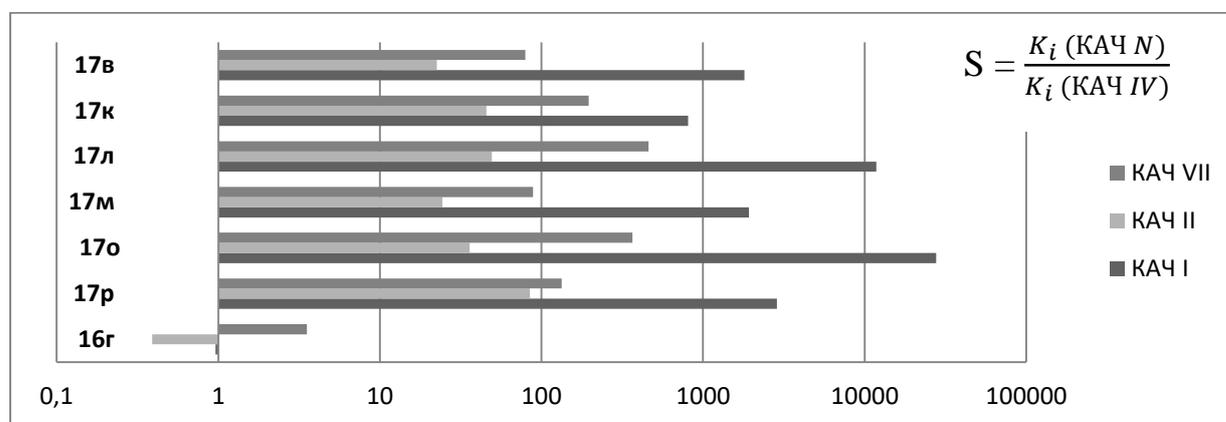


Рисунок 5. Индексы селективности S в отношении КАЧ IV для некоторых производных **17** в сравнении с **16г**.

Для рационального объяснения изменения ингибиторного профиля был проведен докинг некоторых наиболее селективных соединений в активный сайт КАЧ IV (рисунок 6).

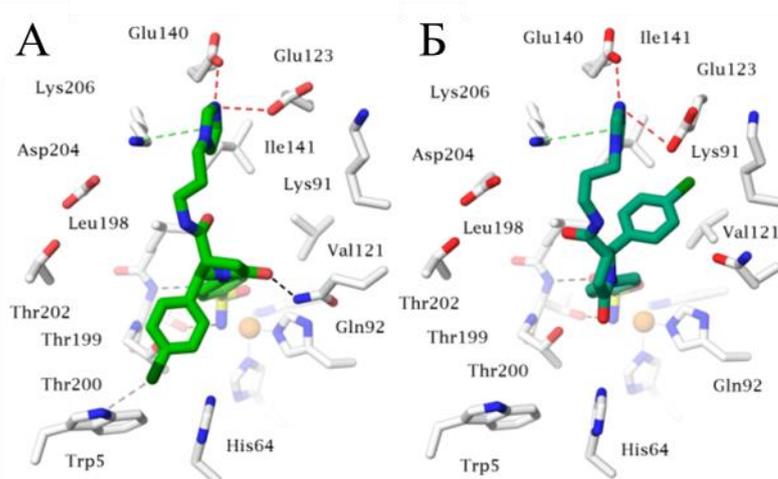


Рисунок 6. Докинг соединений А) *R,R*-17л, Б) *S,S*-17л в активный сайт КАЧ IV.

Было показано, что повышение активности и селективности в отношении КАЧ IV, вероятнее всего, действительно связано с возникновением дополнительных контактов между введенными полярными группами и выявленным в ходе рационального дизайна гидрофильным регионом поверхности активного сайта IV изоформы КАЧ.

Таким образом, был успешно реализован целенаправленный дизайн изоформно-селективных ингибиторов КАЧ с использованием рациональных подходов. Создание двух серий альтернативно замещенных лактамов, доступных по многокомпонентной реакции Кастаньоли-Кушмана, привело к получению обширных данных о взаимосвязи структура-активность, а также к идентификации перспективного соединения-прототипа, пригодного для множества модификаций с целью улучшения заданных свойств. Результатом рационального дизайна и последующего синтеза производных **17** стало получение соединений с редким ингибиторным профилем, характеризующимся избирательной активностью по отношению к КАЧ IV. Данная мембранно-связанная изоформа представляет собой сравнительно малоизученный тип фермента, вызывающий большой интерес в качестве биологической мишени для терапии ряда заболеваний.

4. Изучение потенциала полученных соединений для биомедицинских приложений

Из литературы известно, что ингибирование КАЧ IV, широко распространенной в мозге, легких и некоторых других органах, может быть использовано в терапевтических целях при ряде патологий. В числе прочего, существуют сообщения о возможной роли данной мембранно-связанной изоформы КАЧ в адаптации солидных опухолей к гипоксическим условиям.

С целью демонстрации потенциала полученных соединений для биомедицинских приложений, наиболее селективные ингибиторы КАЧ IV, обладающие K_i на уровне 10^{-10} М, были протестированы на предмет противораковой активности в отношении линии глиомы T98G в условиях химически индуцированной гипоксии. Клеточная линия

эпителия сетчатки ARPE-19 была использована в качестве контроля неспецифической токсичности.

Было установлено, что некоторые соединения проявляют избирательный дозозависимый эффект в отношении раковой линии (рисунок 7).

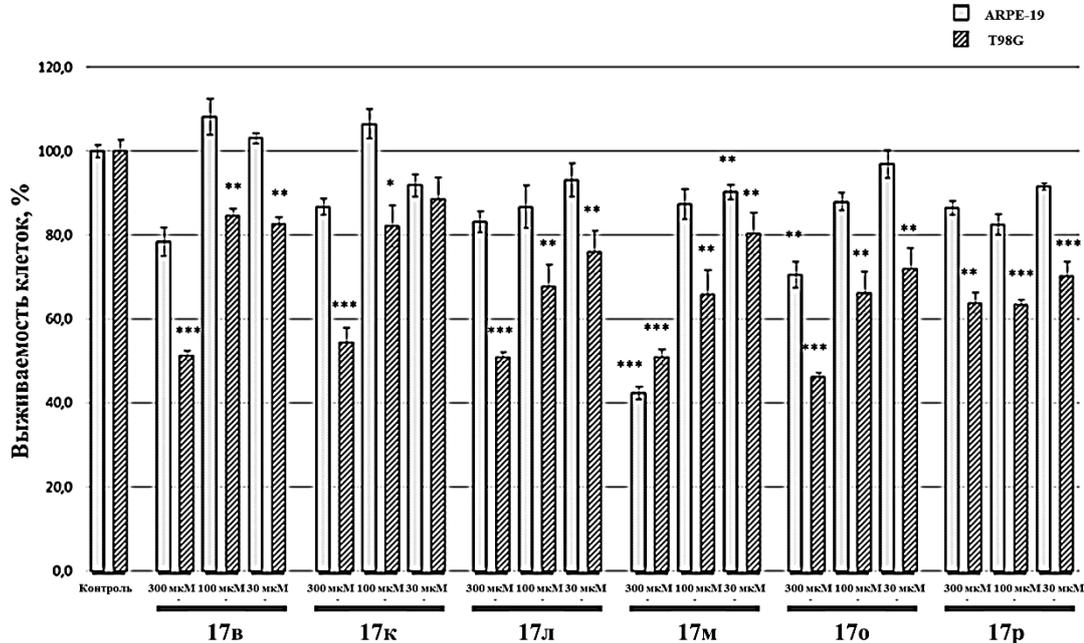


Рисунок 7. Антипролиферативное действие различных концентраций ингибиторов КАЧ IV в отношении раковых клеточных линий T98G в условиях гипоксии. (Показано среднее значение для трех экспериментов * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ относительно контроля (0 μM)).

Чтобы подтвердить релевантность ингибирования КАЧ IV в данной модели был оценен уровень экспрессии *m*-РНК гена, кодирующего данный белок, при помещении клеточной культуры в гипоксические условия. Было установлено, что экспрессия *m*-РНК КАЧ IV существенно повышается в условиях химически индуцированной гипоксии (рисунок 8).

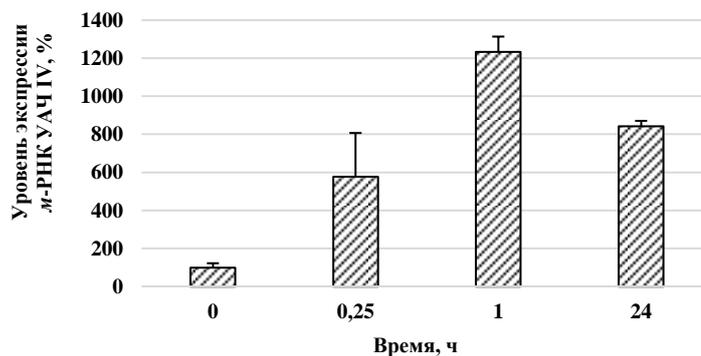


Рисунок 8. Изменение уровня экспрессии *m*-РНК КАЧ IV во времени после помещения клеточной культуры T98G в условия гипоксии (100 μM CoCl_2).

В свете представленных данных установление взаимосвязи наблюдаемого фенотипического ответа клеточной линии глиомы T98G с ингибированием представляется перспективным направлением дальнейшего развития данного исследования.

Механизм адаптации опухолей за счет повышения экспрессии другой мембранно-связанной изоформы – КАЧ IX – широко обсуждался в литературе. Противораковый препарат на основе ингибитора данной изоформы SLC-0111 находится во II фазе клинических испытаний. В связи с этим, высоко активные в отношении КАЧ IX соединения, полученные в ходе данного исследования, были протестированы в отношении раковых линий PANC-1 и SK-MEL в условиях химически-индуцированной гипоксии. Нормальная клеточная линия ARPE-19 была использована в качестве контроля неспецифической токсичности. Ряд ингибиторов проявил избирательное антипролиферативное действие в отношении раковых линий при концентрации 50 μM (данные не показаны). Для веществ, обнаруживших наиболее высокий терапевтический индекс были проведены дополнительные эксперименты, выявившие соединения-лидеры, обладающие доза-зависимым антипролиферативным эффектом в отношении опухолевых культур (рисунок 9А, Б).

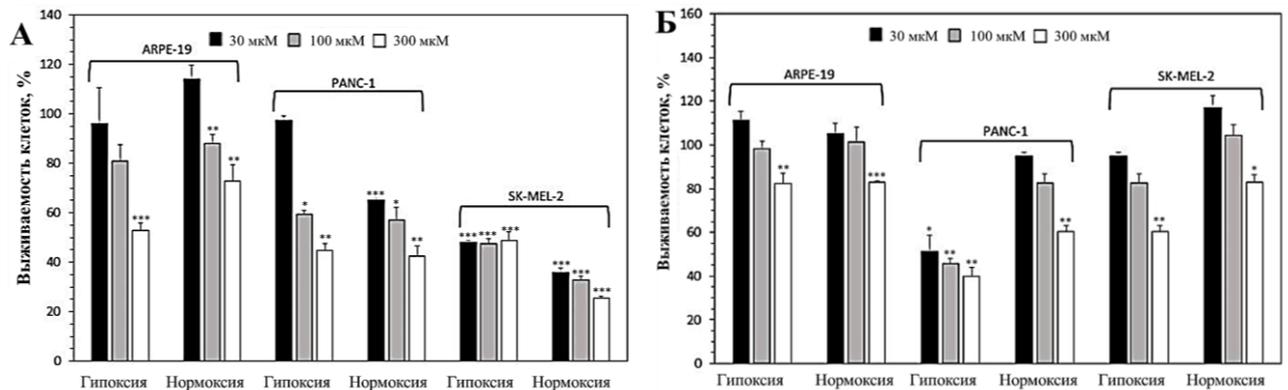


Рисунок 9. Антипролиферативное действие различных концентраций ингибиторов КАЧ IX в отношении раковых клеточных линий PANC-1 и SK-MEL-2 в условиях гипоксии и нормоксии: А) **1н**; Б) **2е** (Показано среднее значение для четырех экспериментов * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ относительно контроля (0 μM)).

Таким образом, на примере противораковой активности была показана привлекательность полученных ингибиторов терапевтически релевантных изоформ КАЧ с точки зрения биомедицинских приложений, в частности использования в качестве инструментов в физиологических исследованиях, а также создания противоопухолевых агентов, блокирующих важные механизмы адаптации новообразований к гипоксическим условиям.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированные сульфонамидсодержащие производные 1,2,4-оксадиазола активны в отношении II и IX изоформ карбоангидразы человека и проявляют избирательную антипролиферативную активность в отношении раковых клеточных линий PANC-1 и SK-MEL-2.
2. Полученные производные *N*-арил(гетероарил)-2-(4-сульфамоилфенил)-имидазолина проявляют селективное ингибиторное действие в отношении VII изоформы карбоангидразы человека, вероятно обусловленное возникновением дополнительной водородной связи с аминокислотным остатком Gln69.
3. Введение полярных/ионизирующихся групп в структуру метил (2*RS*,3*RS*)-5-оксо-1-(4-сульфамоилфенил)-2-(4-хлорфенил)пирролидин-3-карбоксилата позволяет получить селективные ингибиторы IV изоформы карбоангидразы человека, многие из которых проявляют избирательную антипролиферативную активность в отношении раковой клеточной линии T98G.
4. Многокомпонентные синтетические стратегии являются эффективным инструментом для решения задач, связанных с созданием изоформно-селективных ингибиторов карбоангидразы человека, позволяя охватывать широкое химическое пространство и предоставляя обширные возможности оптимизации структуры соединений для улучшения целевых свойств.
5. Априорный дизайн изоформно-селективных ингибиторов карбоангидразы человека практически не осуществим, однако сбор и анализ экспериментальных данных по ингибированию различных изоформ для представителей конкретного молекулярного скаффолда позволяет в дальнейшем использовать рациональные инструменты дизайна для повышения потентности и избирательности ингибиторного действия в отношении конкретной изоформы фермента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*Статьи в рецензируемых журналах*

1. **Kalinin S.**, Supuran C. T., Krasavin M. Multicomponent chemistry in the synthesis of carbonic anhydrase inhibitors // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 31. – P.185-199.
2. Supuran C.T., **Kalinin S.**, Tañç M., Sarnpitak P., Mujumdar P., Poulsen S.-A., Krasavin M. Isoform-selective inhibitory profile of 2-imidazoline-substituted benzenesulfonamides against a panel of human carbonic anhydrases // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 31. – P. 197-202.
3. **Kalinin S.**, Kopylov S., Tuccinardi T., Sapegin A., Dar'in D., Angeli A., Supuran C. T., Krasavin M. Lucky Switcheroo: Dramatic Potency and Selectivity Improvement of Imidazoline Inhibitors of Human Carbonic Anhydrase VII // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1105-1109.
4. Kuznetsov M. A., Shestakov A. N., Zibinsky M., Krasavin M., Supuran C. T., **Kalinin S.**, Tañç M. Synthesis, structure and properties of N-aminosaccharin - A selective inhibitor of human carbonic anhydrase I // *Tetrahedron Lett.* – 2017. – Vol. 58. P. 172-174.
5. Krasavin M., Korsakov M., Zvonaryova Z., Semyonychev E., Tuccinardi T., **Kalinin S.**, Tañç M., Supuran C. T. Human carbonic anhydrase inhibitory profile of mono- and bis-sulfonamides synthesized via a direct sulfochlorination of 3- and 4-(hetero)arylisoxazol-5-amine scaffolds // *Bioorg. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 25. – P. 1914–1925.
6. Krasavin M., Korsakov M., Ronzhina O., Tuccinardi T., **Kalinin S.**, Tañç M., Supuran C. T. Primary mono- and bis-sulfonamides obtained via regiospecific sulfochlorination of N-arylpyrazoles: inhibition profile against a panel of human carbonic anhydrases // *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 32. – P. 920–934.
7. Baykov S., Sharonova T., Shetnev A., Rozhkov S., **Kalinin S.**, Smirnov A. V. The first one-pot ambient-temperature synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from amidoximes and carboxylic acid esters // *Tetrahedron.* – 2017. – Vol. 73(7). – P. 945-951.
8. Krasavin M., Shetnev A., Sharonova T., Baykov S., Tuccinardi T., **Kalinin S.**, Angeli A., Supuran C. T. Heterocyclic Periphery in the Design of Carbonic Anhydrase Inhibitors: 1,2,4-Oxadiazol-5-yl Benzenesulfonamides as Potent and Selective Inhibitors of Cytosolic hCA II and Membrane-Bound hCA IX Isoforms // *Bioorg. Chem.* – 2018. – Vol. 76. – P. 88-97.
9. Sapegin A., **Kalinin S.**, Angeli A., Supuran C. T., Krasavin M. Unprotected primary sulfonamide group facilitates ring-forming cascade en route to polycyclic [1.4]oxazepine-based carbonic anhydrase inhibitors // *Bioorg. Chem.* 2018. – Vol. 76. – P. 140-146.
10. Krasavin M., Shetnev A., Sharonova T., Baykov S., **Kalinin S.**, Nocentini A., Sharoyko V., Poli G., Tuccinardi T., Presnukhina S., Tennikova T. B., Supuran C. T. Continued exploration of 1,2,4-oxadiazole periphery for carbonic anhydrase-targeting primary arene sulfonamides: discovery of subnanomolar inhibitors of membrane-bound hCA IX isoform that selectively kill cancer cells in hypoxic environment // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 164. – P. 92-105.

11. Krasavin M., Shetnev A., Baykov S., **Kalinin S.**, Nocentini A., Sharoyko V., Poli G., Tuccinardi T., Korsakov M., Tennikova T. B., Supuran C. T. Pyridazinone-substituted benzenesulfonamides display potent inhibition of membrane-bound human carbonic anhydrase IX and promising antiproliferative activity against cancer cell lines // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 168. – P. 301-314.
12. **Kalinin S.**, Nocentini A., Kovalenko A., Sharoyko V., Bonardi A., Angeli A., Gratteri P., Tennikova T.B., Supuran C.T., Krasavin M. From random to rational: A Discovery Approach to Selective Subnanomolar Inhibitors of Human Carbonic Anhydrase IV Based on the Castagnoli-Cushman Multicomponent Reaction // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019 – Vol. 182 – P. 111642.
13. **Kalinin S.**, Valtari A., Ruponen A., Toropainen E., Kovalenko A., Nocentini A., Gureev M., Dar'in D., Urtti A., Supuran C. T., Krasavin M. Highly Hydrophilic 1,3-Oxazol-5-yl Benzenesulfonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrase II for Reduction of Glaucoma-Related Intraocular Pressure // *Bioorg. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 27. – P. 115086.

Тезисы докладов конференций

14. Красавин М.Ю. / Новые аспекты и приложения реакции формального [2+4] циклоприсоединения иминов с ангидридами дикарбоновых кислот (реакции Кастаньоли-Кушмана)/Красавин М.Ю., Чупахин Е.Г., **Калинин С.А.**, Бакулина О.Ю., Дарьин Д.В. // Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике; Новый Свет, Крым, Российская Федерация 23-26 сентября 2018 года.
15. **Калинин С.А.** Создание селективных ингибиторов II изоформы угольной ангидразы человека для конъюгации с биополимерными наночастицами / Калинин С.А., Коваленко А.А.; Дарьин Д.В.; Красавин М.Ю. // Сборник тезисов докладов 2-й Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов». Екатеринбург. 15-17 ноября – 2018, СД-36.
16. Преснухина С.И. / Синтез и исследование противораковой активности сульфаниламидных производных класса 1,2,4-оксадиазолов / Преснухина С.И. Шаронова Т.В., **Калинин С.А.**, Байков С.В., Шетнев А.А., Красавин М.Ю.// Материалы XXVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2019.