федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

На правах рукописи

N.E.F

Дарвиш Футун

# СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МИШЕНЬ-СПЕЦИФИЧНЫМ МОДИФИКАЦИЯМ ДОРСОМОРФИНА

1.4.3. Органическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

> Научный руководитель: кандидат химических наук, Трибулович Вячеслав Генрихович

Санкт-Петербург – 2025

# оглавление

ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 10
1.1 Структура и регулирование каскадов фосфорилирования 10
1.1.1 Фосфорилирование как способ передачи сигнала в клетке 10
1.1.2 Разнообразие ферментов, осуществляющих фосфорилирование 13
1.1.3 Ингибиторы киназ и проблема селективного ингибирования 18
1.2 АМФ-активируемая протеинкиназа
1.2.1 Строение и функции АМФК
1.2.2 Заболевания, связанные с нарушением функционирования АМФК 29
1.2.3 Известные модуляторы активности АМФК
1.3 Пиразоло[1,5-а]пиримидин как основа для создания киназных ингибиторов. 38
1.3.1 Лекарства на основе пиразоло[1,5-а]пиримидина
1.3.2 Активность пиразоло[1,5-а]пиримидинов в отношении киназ
1.3.3 Способы построения пиразоло[1,5-а]пиримидинового ядра 46
ГЛАВА 2 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 53
2.1 Выбор объекта исследования 53
2.2 Литературные схемы синтеза дорсоморфина 56
2.3 Разработка схемы синтеза дорсоморфина на основе линейной стратегии 57
2.3.1 Синтез пиридил-замещенной аминопиразольной компоненты 58
2.3.2 Формирование пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда и введение
арильного фрагмента 60
2.3.3 Синтез циклоаминового фрагмента и получение конечного соединения 62
2.4 Синтез дорсоморфина и его производных с использованием конвергентной
стратегии 64
2.4.1 Основные точки модификации структуры дорсоморфина
2.4.2 Синтез производных, обеспечивающих варьирование положения атома азота
и разворот фенильного фрагмента66

2.4.3 Синтез производных, обеспечивающих варьирование состава и ориентаци	И
аминоалкильного фрагмента6	7
2.4.4 Сборка конечных соединений из синтезированных фрагментов 7	1
2.5 Компьютерное моделирование дорсоморфина и его аналогов	3
2.5.1 Создание виртуальной библиотеки соединений7	4
2.5.2 Скрининг соединений по АТФ-связывающему сайту 7	4
2.6 Исследование структура-активность7	6
ГЛАВА З ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 7	8
3.1 Химический синтез7	8
3.1.1 Реактивы и оборудование7	8
3.1.2 Синтез дорсоморфина и его производных по линейной схеме7	8
3.1.3 Синтез аналогов дорсоморфина по конвергентной схеме	0
3.2 Расчетные методы	7
3.3 Биологические исследования9	9
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 10	0
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 10	1
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ10	2

## введение

#### Актуальность темы

Сложность разработки киназных ингибиторов обусловлена тем, что АТФсвязывающая область, на которую нацелены классические ингибиторы, демонстрирует высокую консервативность среди ферментов данной группы. Поэтому наиболее остро проблема селективности стоит именно для ингибиторов киназ, что существенно ограничивает их практическое применение.

При создании новых ингибиторов киназ чаще всего проводят скрининг уже известных АТФ-конкурентных ингибиторов, а затем структурную оптимизацию для реализации принципа «подобное сродство, но более высокая селективность». Один ингибиторов, дорсоморфин, ингибирующую проявляет ИЗ таких способность по отношению ко многим киназам, но до сих пор применяется в ингибитора качестве «селективного» АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК). В его основе лежит пиразоло[1,5-а]пиримидиновое ядро, которое считается привилегированным гетероциклом в медицинской химии и обладает структурным сходством с азотистым основанием молекулы АТФ.

Дорсоморфин является одним из трех общепризнанных ингибиторов АМФК, идентифицированных в результате высокопроизводительных скринингов. Для него не проводилась разработка доступных методов синтеза, а также работы по исследованию зависимости «структура–активность» по отношению к АМФК. При этом его структура предполагает возможность модификации и введения новых связывающих фрагментов. Учитывая потребность в ингибиторах АМФК, создание серии аналогов дорсоморфина с последующей оценкой вклада определенных структурных фрагментов в целевую активность является актуальным направлением исследований по выявлению высокоселективных ингибиторов.

## Степень разработанности темы

АМФК была идентифицирована более 30 лет назад как основной регуляторный элемент энергетического сигнального каскада. В отличие от

большинства киназ, при многих патологических состояниях ее активность подавляется, в связи с чем основное внимание было уделено разработке соединений, способных оказывать активирующее действие. Тем не менее, в последние годы возникла потребность в ингибиторах АМФК как для исследовательских целей, так и для терапевтического применения. Однако выбор низкомолекулярных агентов, способных достаточно селективно ингибировать активность киназы, в настоящее ограничен тремя структурами, выявленными в ходе скринингов больших библиотек соединений: дорсоморфин (Compound C), SBI-0206965 и BAY-3827. Каждая из этих структур обладает определенными недостатками, которые не позволяют использовать их в терапевтической практике.

заинтересованность исследователей и клиницистов Несмотря на В ингибиторах АМФК, в литературе представлено ограниченное количество работ по ингибированию АМФК, и лишь единичные посвящены ингибированию соединениями, отличными известных. Исследование ОТ уже процессов ингибирования АМФК является достаточно новым и мало разработанным направлением, а поиском и созданием ингибиторов АМФК занимается небольшое число научных групп, при этом устойчивых и значимых результатов в этой области к настоящему моменту достигнуто не было. Такое положение дел предоставляет широкие возможности для получения новых результатов.

#### Цели и задачи диссертационного исследования

Целью диссертационного исследования является разработка подходов к синтезу структурных аналогов дорсоморфина для рационального дизайна ингибиторов киназ, в том числе АМФ-активируемой протеинкиназы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

• разработка метода получения дорсоморфина на основе оптимальной стратегии синтеза;

- определение значимых точек для модификации дорсоморфина с целью первичного исследования зависимости «структура–активность»;
- проверка возможности реализации предложенных модификаций с учетом разработанной синтетической схемы;
- создание серии структурных аналогов дорсоморфина;
- выявление ключевых структурных элементов дорсоморфина, определяющих активность по отношению к АМФК, на основании сопоставления расчетных и экспериментальных данных.

#### Научная новизна

Предложена оптимальная синтетическая схема на основе конвергентной стратегии, позволяющая получать как дорсоморфин, так и его близкие структурные аналоги. Учитывая отсутствие исследований по разработке методов дорсоморфина, обусловленное было синтеза тем, что соелинение идентифицировано в ходе высокопроизводительного скрининга, предложенная схема обладает определенной степенью новизны.

Впервые синтезирована серия пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных, являющихся близкими структурными аналогами дорсоморфина. Все синтезированные аналоги являются оригинальными соединениями и впервые охарактеризованы методами ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии.

Получены данные по взаимосвязи «структура–активность» для производных дорсоморфина, а также установлена корреляция между расчетной активностью соединений и экспериментальными данными, полученными в экспериментах *in vitro*. Показана возможность использования компьютерного моделирования для поиска новых и повышения селективности известных соединений, обладающих ингибирующей активностью по отношению к АМФК.

## Теоретическая и практическая значимость

В ходе работы была синтезирована серия пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных, обладающих различным ингибирующим потенциалом по отношению к АМФК. Синтезированные соединения могут быть использованы как

для изучения процесса ингибирования, так и для исследования эффектов, вызываемых ингибированием АМФК, на клеточных и животных моделях. Полученная серия производных может быть включена в библиотеки АТФконкурентных ингибиторов для проведения скрининговых исследований по иным киназам.

Разработанная схема получения дорсоморфина и его близких аналогов на основе конвергентной стратегии не только обеспечивает быстрый синтез библиотеки модифицированных соединений и их препаративную наработку для обеспечения биологических экспериментов, но также предполагает возможность получения новых структурных вариантов исходных молекул-ингибиторов.

Виртуальная библиотека производных 3-пиридил-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов, сконструированная на основе возможных комбинаций заместителей, может быть использована для скрининга по АТФ-связывающему сайту киназ, отличных от АМФК.

В целом, рациональный дизайн может быть применен к разработке ингибиторов АМФК, нацеленных на АТФ-связывающую область, а результаты данного исследования позволят приблизиться к созданию высокоселективного ингибитора АМФК.

#### Методология и методы исследования

Определение строения и подтверждение чистоты синтезированных в работе соединений и полупродуктов осуществлялось с использованием комплекса современных физико-химических методов исследования, включая хромато-массспектрометрию и спектроскопию ЯМР на ядрах <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С. Очистку полупродуктов и целевых соединений проводили с использованием флэш-хроматографии. Помимо этого, в работе были также использованы расчетные методы исследования (молекулярный докинг, виртуальный скрининг) и *in vitr*о методы исследования биологической активности.

## Положения, выносимые на защиту

- схема синтеза дорсоморфина и его структурных аналогов на основе конвергентной стратегии;

- способ образования С–С связи для построения углеродного скелета стерически затрудненных 5,7-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов;

- метод синтеза алкиламиновых фрагментов с использованием реакции Мицунобу;

- серия 3-пиридил-замещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов, обладающих ингибирующей активностью по отношению к АМФК;

- метод идентификации ингибиторов АМФК на основе моделирования *in silico* с последующим подтверждением биологической активности *in vitro*.

## Степень достоверности результатов исследований

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных методов и подходов синтетической и медицинской химии. Экспериментальные результаты выводы, И сделанные на ИХ основе, между собой подтверждаются согласующимися данными, полученными различными методами. Выводы, сформулированные в результате выполнения работы, являются научно обоснованными и соответствуют современным научным представлениям.

#### Апробация результатов исследования

работы Основные положения диссертационной представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных 2022), XII «Ломоносов-2022» (Москва, научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Неделя науки-2022» (Санкт-Петербург, 2022), XIII научной конференции «Традиции и инновации», 194-й образования Санкт-Петербургского посвяшенной годовщине государственного технологического института (технического университета) (Санкт-Петербург, 2022), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Москва, 2023), XIII научнотехнической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Неделя науки-2023» (Санкт-Петербург, 2023), XIV научной конференции «Традиции и инновации», посвященной 195-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)

(Санкт-Петербург, 2023), XIV научно-технической конференции студентов, аспирантов, молодых учёных «Неделя науки-2024. Творчество молодежи – будущему России» (Санкт-Петербург, 2024). По материалам конференций опубликованы сборники тезисов докладов.

По теме диссертации опубликовано 2 работы в изданиях, рекомендуемых ВАК и индексируемых Scopus и Web of Science, а также тезисы 7 докладов на конференциях 2022–2024 года.

Диссертация состоит из введения, трёх глав (литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальная часть), заключения, списка сокращений, списка использованной литературы. Материал изложен на 124 страницах, содержит 2 таблицы, 28 рисунков, 20 схем. Список литературы включает 203 ссылки.

Автор выражает особую благодарность к.х.н. Новиковой Дарье Сергеевне за всестороннюю помощь, терпение и ценные рекомендации при написании рукописи.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ №21-73-00296 и №24-73-10221.

## ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Структура и регулирование каскадов фосфорилирования

Успешное функционирование многоклеточного организма требует четкой координации биохимических процессов, протекающих в каждой отдельной клетке. Для этой цели служат межклеточная коммуникация и внутриклеточная сигнализация [1].

Сигнализация, или передача (трансдукция) сигнала – это процесс, при котором химический или физический сигнал передается через клетку в виде серии молекулярных событий [2]. Внутриклеточная сигнализация обычно представляет собой последовательность биохимических реакций, катализируемых специальными ферментами, которые в свою очередь активируются вторичными посредниками. Последовательность реакций, приводящую к определенному исходу, называют сигнальным каскадом.

Каскад фосфорилирования – это последовательность событий сигнального пути, при которой один фермент фосфорилирует другой, вызывая цепную реакцию, приводящую к фосфорилированию многих белков. Фосфорилирование белков является важной посттрансляционной модификацией, затрагивающей многие пути внутриклеточной передачи сигнала [3]. В связи с этим ферменты, участвующие в каскадах фосфорилирования, рассматриваются в качестве терапевтических мишеней для лечения заболеваний.

## 1.1.1 Фосфорилирование как способ передачи сигнала в клетке

Фосфорилирование – это замещение атома водорода в молекулах химических соединений остатком фосфорной кислоты. В клеточном контексте катализируемое соответствующими ферментами фосфорилирование представляет собой процесс переноса остатка фосфорной кислоты от фосфорилирующего донорного соединения к субстрату, [4]. В качестве донорного соединения выступает молекула АТФ. В результате этого процесса происходит образование сложного эфира фосфорной кислоты субстрата (R):

$$AT\Phi + ROH \rightarrow AД\Phi + RO - PO_3H_2$$

Передача сигнала в клетке с помощью фосфорилирования позволяет контролировать многие процессы жизнедеятельности клетки. Фосфорилирование играет важную роль в регуляции клеточного цикла и клеточного деления, адаптации к изменениям окружающей среды. Фосфорилирование позволяет оперативно реагировать на различные сигнальные молекулы, такие как гормоны и факторы роста, и является важной частью многих биологических механизмов [5]. Таким образом, фосфорилирование является важным способом передачи сигнала, а каскады фосфорилирования – фундаментальным сигнальными путями в клетке.

Ведение в молекулу белка остатка фосфорной кислоты приводит к изменению её свойств. Фосфатная группа по своей химической природе может водородные связи и электростатические взаимодействия с образовывать В аминокислотными взаимодействий остатками. результате таких пространственная структура белка может перестраиваться [6], что в конечном итоге приводит к изменению его характеристик. Фосфорилирование может активировать или дезактивировать ферменты; реакция фосфорилирования может происходить не по одному, а по нескольким положениям в молекуле белка. Конечным результатом фосфорилирования может быть изменение уровня экспрессии определенного белка, его локализации, активности, а также способности взаимодействовать с другими белками [7].

Фосфорилирование является динамическим процессом, и клетки постоянно регулируют его для адаптации к изменениям внешней среды и внутренних потребностей. Обратный процесс, дефосфорилирование, представляет собой удаление фосфатной группы из субстрата путем гидролиза. Нарушения в протекании фосфорилирования/дефосфорилирования часто приводят к развитию различных заболеваний, включая рак, диабет и нейродегенеративные расстройства [8–10].

Ключевым и самым изученным сигнальным каскадом, основанном на фосфорилировании, является ERK путь. Этот путь активируется в ответ на сигналы, полученные клеткой через рецепторные киназы или рецепторы, сопряжённые с G-белками, и представляет собой цепь последовательно взаимодействующих белков, которые передают сигнал с поверхности клетки от клеточного рецептора внутрь ядра клетки к ДНК [11]. Механизм передачи сигнала заключается в формировании сигнального комплекса из ряда белков около таких рецепторов со стороны цитоплазмы, что в конечном итоге активирует фермент RAS. RAS связывает и активирует фермент RAF, который фосфорилирует и активирует MEK, который в свою очередь также фосфорилирует и активирует ERK (Рисунок 1.1). RAS-RAF-MEK-ERK каскад является консервативным путем передачи сигнала во всех эукариотических клетках, регулирующим различные нормальные клеточные функции, такие как пролиферация, дифференцировка, выживание и апоптоз клеток [12].



Рисунок 1.1 – Передача сигнала по каскаду фосфорилирования на примере сигнального пути ERK [12]

Сигнал по каскаду фосфорилирования передается путем последовательного фосфорилирования каждого нижестоящего компонента. Когда передача сигнала прекращается, компоненты возвращаются в основное состояние в основном за счет дефосфорилирования. При патологических состояниях в клетке часто происходит нарушение сигнализации, которое может заключаться как в непрерывной передаче сигнала за счет усиленного фосфорилирования, так и обрыва сигнального каскада за счет подавления фосфорилирования. Поэтому одним из способов борьбы с подобными патологиями является ингибирующее стимулирующее воздействие на ферменты, реализующие или процесс фосфорилирования.

#### 1.1.2 Разнообразие ферментов, осуществляющих фосфорилирование

Ферменты – это вещества биологического происхождения, которые ускоряют химические реакции в живых организмах. Чаще все ферменты представлены белками, однако каталитическая активность была также обнаружена у некоторых нуклеиновых кислот – «рибозимов». К настоящему моменту идентифицировано более 2000 ферментов, различающихся реакционной и субстратной специфичности. Все ферменты подразделяются на шесть классов в зависимости от типа катализируемой реакции:

- оксидоредуктазы катализируют окислительно-восстановительные реакции;
- трансферазы осуществляют перенос функциональных групп от носителя на субстрат;
- гидролазы расщепляют связи с участием воды;
- лиазы (синтазы) катализируют расщепление субстратов или обратные реакции присоединения;
- изомеразы перемещают функциональные группы в пределах одной молекулы;

 лигазы (синтетазы) – катализируют энергозависимые реакции присоединения друг к другу двух белковых молекул.

Так как реакция фосфорилирования – это перенос фосфатной группы с молекулы АТФ на субстрат, киназы, осуществляющие данную реакцию, относятся к классу трансфераз. Киназы представляют собой огромный подкласс эволюционно структурно родственных ферментов, И которые путем фосфорилирования определенных аминокислот, первую очередь В серина/треонина и тирозина, активируют множество белков, опосредуя передачу сигналов при росте и дифференцировке клеток [13].

Киназы подразделяются на обширные группы в зависимости от субстрата, на который они переносят фосфатную группу (Рисунок 1.2), поскольку они осуществляют фосфорилирование не только белковых субстратов, но также липидов, углеводов, нуклеиновых кислот, а также таких молекул, как креатин, фосфоглицерат, рибофлавин и многих других [14]. Тем не менее, протеинкиназы составляют наиболее большую группу. Считается, что геном человека содержит более 500 протеинкиназ [15].



Рисунок 1.2 – Классификация киназ по субстратной специфичности

Поверхность каждого белка представляет собой набор боковых цепей аминокислот, которые являются потенциальными акцепторными фосфатной группы. Подходящие функциональные группы боковой цепи включают в себя гидроксильные группы серина, треонина и тирозина, имидазольное кольцо гистидина и карбоксильную группу аспарагиновой кислоты. Для узнавания этих сайтов протеинкиназами, ответственными за катализ переноса фосфатной группы, требуются дополнительные детерминанты. Обычно они состоят из коротких консенсусных последовательностей, легко встраиваемых в структуру белка [16]. Киназы, осуществляющие фосфорилирование гистидина, обнаружены лишь у прокариот и низших эукариот, таких как дрожжи и растения [17]. Перенос фосфатной группы на остаток аспартата происходит тоже только У растений [18]. Для микроорганизмов И животных, включая человека, протеинкиназы используют лишь три аминокислотных остатка: серин, треонин и тирозин.

В зависимости от того, какие сайты могут распознавать и фосфорилировать протеинкиназы, их подразделяют на серин/треониновые, тирозиновые и протеинкиназы двойной специфичности.

Серин/треонин-специфичные протеинкиназы (СТПК) представляют собой группу протеинкиназ, которые катализируют фосфорилирование остатков серина и треонина в белках-мишенях. Они участвуют в регуляции широкого спектра клеточных процессов, включая рост клеток, пролиферацию, дифференцировку и Эти [19]. ферменты подразделяются СТПК, апоптоз на классические обнаруживаемые во всех эукариотических клетках, и атипичные СТПК, обнаруживаемые только в определенных типах клеток [20]. Наиболее известными и изученными представителями серин/треониновых протеинкиназ (Рисунок 1.3) являются цАМФ-зависимая протеинкиназа (protein kinase A; PKA), протеинкиназа С (protein kinase C, PKC), киназы семейства митоген-активируемых протеинкиназ Са<sup>2+</sup>/кальмолулин-зависимые MAPK), (mitogen-activated protein kinase. (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein протеинкиназы kinases. CAMK) И циклинзависимые киназы (cyclin-dependent kinases, CDK).



Рисунок 1.3 – Примеры серин/треонин-специфичных протеинкиназ

Тирозин-специфичные протеинкиназы, или тирозинкиназы (ТК), являются катализаторами переноса фосфатной группы с молекулы АТФ на остатки тирозина в белковых субстратах. Они регулируют внутриклеточные пути передачи сигналов, опосредующих развитие и коммуникацию клеток между собой у многоклеточных организмов. Нарушение передачи сигналов через ТК изза мутаций и других генетических изменений приводит к нарушению регуляции киназной активности и злокачественной трансформации клеток [21]. Примеры протеинкиназ этой группы (Рисунок 1.4): семейство рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR), инсулиновый рецептор (insulin receptor, IR), рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), семейство Src-киназ янусные киназы (Janus kinase, JAK).



Рисунок 1.4 – Примеры тирозин-специфичных протеинкиназ

Протеинкиназы двойной специфичности (ДСПК), как следует из названия, обладают способностью фосфорилировать как остатки серина/треонина, так и тирозина. Они проявляют универсальную субстратную специфичность и участвуют в сложных клеточных процессах, таких как регуляция клеточного цикла, реакция на повреждение ДНК и передача сигналов клеточного стресса. Эти ферменты подразделяются на протеинкиназы типа I, типа II и атипичные ДСПК. Наиболее известные представители этой группы (Рисунок 1.5) – киназа митогенактивируемой протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase kinase, MKK), киназа гликогенсинтазы 3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) и киназы семейства DYRK (dual-specificity tyrosine (Y) phosphorylation-regulated kinases) [22].



Рисунок 1.5 – Примеры протеинкиназ двойной специфичности

В зависимости от расположения внутри клетки и способа действия киназы также делятся на рецепторные и цитоплазматические. Рецепторные киназы представляют собой трансмембранные белки, пронизывающие мембрану клетки или ее органелл. Несмотря на то, что под рецепторными киназами чаще все подразумевают тирозинкиназы, которые насчитывают 58 типов [23], существуют также серин/треониновые киназные рецепторы. Представители таких киназ объединены в семейство рецепторов трансформирующего ростового фактора  $\beta$  (transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) receptors) и вовлечены в консервативный сигнальный путь TGF $\beta$  [24].

Протеинкиназы можно также классифицировать в зависимости от исполняемых ими функций. Существует три основные категории: сигнальные протеинкиназы, метаболические протеинкиназы и протеинкиназы домашнего хозяйства. Сигнальные протеинкиназы играют важную роль в процессе передачи сигналов внутри клетки, в то время как метаболические протеинкиназы регулируют обмен веществ. Протеинкиназы «домашнего хозяйства», аналогично генам домашнего хозяйства, выполняют важные клеточные функции, необходимые для поддержания жизнедеятельности организма.

Фосфорилирование/дефосфорилирование белков долгое время считалось эволюционно недавним дополнением к регуляторному арсеналу природы. Ранние этот молекулярный регуляторный механизм исследования показали, что существует эукариот, предполагая, только У высших ЧТО фосфорилирование/дефосфорилирование белков возникло для удовлетворения особых потребностей в передаче сигналов многоклеточных организмов [25]. Более сложный тип клеток эволюционировал, чтобы реагировать на более широкий спектр сигналов, что обусловило возникновение такого типа ферментов, как киназ.

## 1.1.3 Ингибиторы киназ и проблема селективного ингибирования

Вопрос о возможности ингибирования киназной активности с помощью низкомолекулярных соединений возник вскоре после идентификации первого фермента, обладающего киназной активностью, в 1978 году [26]. Исследование тирозинкиназы v-Src, положившее начало волне открытий киназ, одновременно позволило выявить значительный вклад фосфорилирования белков в онкогенез и заложило основы киномики. Таким образом, терапевтический потенциал ингибирования киназ был признан на ранних этапах изучения этой группы ферментов.

В настоящее время существует четкая классификация ингибиторов киназ в зависимости от механизма их взаимодействия с ферментом (Рисунок 1.6). Все типы ингибиторов подразделяются на две группы в зависимости от того,

осуществляют ли они конкуренцию за сайт связывания с АТФ. Эффективность киназных ингибиторов, которые конкурируют с АТФ, снижается с увеличением концентрации АТФ. В эту группу входят ингибиторы типа I и II. Основной особенностью данных типов ингибиторов является взаимодействие с АТФ-связывающим карманом за счет образования водородных связей [27].



Рисунок 1.6 – Типы киназных ингибиторов

Протеинкиназы очень динамичны и могут принимать множество конформаций, которые влияют на каталитическую активность этих ферментов. Определяющую роль играет активный центр, который состоит из нескольких структурных элементов. Одним из таких элементов является активационная петля (Рисунок 1.7). Обычно она имеет длину от 20 до 30 аминокислотных остатков, начиная с консервативной последовательности Asp-Phe-Gly (DFG-мотив) и заканчивая последовательностью Ala-Pro-Glu (APE-мотив). В активных киназных структурах эта петля обеспечивает связывание субстрата фосфорилирования [28].



Рисунок 1.7 – Структура типичного домена протеинкиназы с сайтом связывания АТФ и консервативными элементами вокруг него (киназа INSR, PDB ID 1GAG) [28]

DFG-мотив протеинкиназ принимает две основные конформации, которые в литературе называются DFG-in и DFG-out, определяющие активное или неактивное состояние соответственно, а также различные промежуточные конформации. В DFG-in конформации мотива остаток фенилаланина направлен в сторону гидрофобного канала, в то время как остаток аспарагиновой кислоты обращен наружу, чтобы координировать ион магния при связывании АТФ. В неактивном состоянии, или конформации DFG-out, остаток аспарагиновой кислоты переворачивается, а остаток фенилаланина выходит из кармана связывания АТФ. Переход из состояния DFG-in в DFG-out, называемый в литературе DFG-флип, вызывает изменения в расположении элементов вторичной структуры, образующих каталитическую область, тем самым деформируя и блокируя часть сайта связывания АТФ [29].

Таким образом, конкурентные ингибиторы, к которым относятся ингибиторы типов I и II связываются с АТФ-связывающим сайтом киназы, конкурируя с АТФ за этот сайт. Эти ингибиторы блокируют доступ АТФ к активному центру киназы, тем самым предотвращая фосфорилирование субстратов. Различия заключаются в том, что ингибиторы типа I связываются с киназой в активном состоянии, тогда как ингибиторы типа II взаимодействуют с неактивной конформацией киназы, которая не может связывать АТФ [30]. К представителям типа I относятся такие ингибиторы, как сунитиниб, эрлотиниб и гефитиниб [31]. В то же время ингибиторы типа II не только занимают АТФсвязывающий карман, но и дополнительно взаимодействуют с соседними участками киназы. К ингибиторам типа II относят иматиниб, сорафениб, нилотиниб [32].

Все остальные известные на сегодняшний день типы ингибиторов представляют собой группу АТФ-неконкурентных ингибиторов [33]. Ингибиторы типов III и IV связываются с так называемыми аллостерическими сайтами киназы, при этом эти сайты могут располагаться как вблизи АТФ-связывающего кармана (тип III), так и в области, значительно удаленной от него (тип IV). Конечным результатом взаимодействия ингибиторов обоих типов является изменение конформации киназы и предотвращение ее активации [34]. Ингибиторы типа V представляют собой особый класс ингибиторов, так называемые бивалентные ингибиторы, которые взаимодействуют одновременно с двумя различными сайтами киназы [35]. Такие ингибиторы могут связываться с активным центром фермента и дополнительным аллостерическим сайтом, что приводит к более стабильному и долговременному ингибированию активности киназы. К типу VI относятся ковалентные ингибиторы, которые обычно представляют собой α,βкарбонильное ненасыщенное соединение. Такие ингибиторы образуют ковалентную связь с цистеинами в активном центре фермента или рядом с ним, тем самым необратимо ингибируя киназу [36].

В историческом аспекте разработки киназных ингибиторов можно выделить три ключевых момента, повлиявших в целом на направление развития этой

области. В 1986 году было зафиксировано, что природный стауроспорин оказывает значительное ингибирующее действие на протеинкиназу С [37]. Это стало убедительным доказательством возможности воздействия на активность киназ с помощью низкомолекулярных соединений. Уже в 1989 году появились данные, что стауроспорин и родственные ему соединения не только ингибируют протеинкиназу С, но и проявляют ингибирующую активность в отношении нескольких других киназ [38]. Так стало понятно, что неселективные ингибиторы приносят определенную пользу, но с трудом могут быть использованы для изучения функции киназных мишеней. С этого момента основной курс при разработке киназных ингибиторов был взят на соединения с более высокой событием одобрение Управлением по селективностью. Ключевым стало контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) низкомолекулярного ингибитора иматиниба для лечения хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ) в 2001 году [39]. Одобрение иматиниба увеличило инвестиции и привело к резкому росту числа киназных ингибиторов, одобренных FDA (Рисунок 1.8). После иматиниба было одобрено в общей сложности 72 киназных ингибитора для лечения различных патологических состояний [40].



Рисунок 1.8 – Данные по регистрации международных непатентованных названий (МНН) низкомолекулярных киназных ингибиторов с 2001 по 2017 [41]

Сейчас очевидно, что киназы участвуют в развитии многих заболеваний. Раковые заболевания преимущественно были в центре внимания киназных исследований из-за повсеместного распространения оверэкспрессии и мутаций в генах киназ, присутствующих при раке [42]. Однако нарушения киназной активности наблюдаются также при других патологиях, включая сердечнососудистые, нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания. Это определило тот факт, что протеинкиназы стали второй по значимости группой мишеней для разработки лекарственных препаратов после рецепторов, связанных с Gбелком [43].

Следует отметить, что из 72 ингибиторов киназ, одобренных FDA, 64 соединений нацелены на сайт связывания АТФ (ингибиторы типа I и II), то есть АТФ-конкурентными [44]. Они являются основаны на разнообразных гетероциклических ядрах, которые в основном повторяют элементы аденинового ядра АТФ [45, 46]. Также среди одобренных ингибиторов киназ есть несколько представителей ингибиторов типа III и VI. Несмотря на все преимущества перед АТФ-конкурентными ингибиторами, ни одна структура, относящаяся к ингибиторам типа IV и V, не была выведена на фармацевтический рынок к настоящему времени.

Несомненно, разработка киназного ингибитора является достаточно сложной задачей. Это связано с тем, что при большом разнообразии киназных ферментов имеются весьма ограниченные структурные данные, поэтому для разработки ингибиторов исследователям рациональной доступен только классический АТФ-связывающий сайт. Учитывая высокую консервативность этого структурного элемента среди киназ, особенно остро встает вопрос о селективности воздействия. Высокая степень сходства между каталитическими доменами киназ зачастую приводит к нецелевому ингибированию, что затрудняет корректную интерпретацию эффекта воздействия существенно низкомолекулярного соединения на сигнальный каскад, а также вызывает нежелательные побочные эффекты при терапевтическом применении. В связи с существует постоянный интерес оценке селективности ЭТИМ К

низкомолекулярных киназных ингибиторов как для понимания функционирования киназ, так и для создания действительно селективных биологических зондов и терапевтических средств.

## 1.2 АМФ-активируемая протеинкиназа

Очевидным способом контролировать энергетический статус организма является наличие белков, чувствительных к внутриклеточному соотношению АМФ : АТФ и в организме человека действительно существуют такие ферменты. В мышцах присутствуют гликогенфосфорилаза и 6-фосфофрукто-1-киназа. При увеличении соотношения  $AM\Phi$  :  $AT\Phi$  они активируются и способствуют запуску двух катаболических путей, гликогенолиза и гликолиза, соответственно. В противоположность фруктозо-1,6-бисфосфатаза в печени ингибируется за счет соотношения ΑΤΦ. увеличения AMΦ : что приводит к выключения анаболического глюконеогенеза. Большинство пути, других процессов, чувствительных к клеточной энергии, модулируются опосредованно через систему АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) [47], которая регулируется не только АМФ и АТФ, но также молекулами АДФ, при этом играя ключевую роль в поддержании способности клетки к окислительному метаболизму.

## 1.2.1 Строение и функции АМФК

АМФК относится к серин/треонин-специфичным протеинкиназам и представляет собой гетеротримерный комплекс, состоящий из трех субъединиц, обозначаемых греческими буквами α, β и γ, в соотношении 1 : 1 : 1 (Рисунок 1.9) [48]. Субъединица α функционирует как каталитическая субъединица, определяя киназную активность всего белкового комплекса и влияя на метаболические пути на уровне белков и генов. [49]. Субъединицы β и γ являются регуляторными субъединицами, но они также участвуют в модуляции активности киназного комплекса [50].



Рисунок 1.9 – Трехмерная структура субъединичного комплекса АМФК, где каждая субъединица имеет свое цветовое обозначение: α – зеленый; β – красный; γ – синий

Каждая из субъединиц АМФК встречается в живых организмах в виде нескольких изоформ. Так для  $\alpha$ -субъединицы идентифицировано две изоформы ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2), для  $\beta$ -субъединицы также известно две изоформы ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2), тогда как  $\gamma$ -субъединица представлена тремя изоформами ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3). Все субъединичные изоформы кодируются отдельными генами, при этом гены *PRKAA1*, *PRKAB1*, *PRKAG1*, кодирующие субъединицы  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 и  $\gamma$ 1, соответственно, могут быть отнесены к генам домашнего хозяйства [51]. Семь генных продуктов могут образовывать до 12 изоформных комбинаций  $\alpha\beta\gamma$ , которые демонстрируют тонкие различия в регуляции и распределении в тканях и субклеточном пространстве [52].

Каталитическая α-субъединица (АМФКа) является основным функциональным компонентом киназного комплекса и включает в себя следующие структурные элементы: киназный домен (KD), автоингибиторный домен (AID) и участок, отвечающий за связывание с β-субъединицей (α-CTD). Консервативный киназный домен, определяющий киназную активность комплекса АМФК, расположен на *N*-конце белка [53].

Важным компонентом киназного домена является активационная петля, которая содержит основной сайт активации АМФК, содержащий остаток треонина. Фосфорилирование этого остатка активирует киназный комплекс, при этом для субъединицы α1 это аминокислотный остаток Thr-172, тогда как для субъединицы α2 сайтом фосфорилирования является Thr-183 [54]. За киназным доменом следует участок, называемый автоингибиторным доменом (AID), за которым идет С-концевой домен (α-CTD), образующий глобулярную структуру и взаимодействующий с С-концевым доменом β-субъединицы.

Принято считать, внутриклеточная локализация комплекса AMΦK определяется именно за счет определенной изоформы α-субъединицы. Было показано, что комплексы, в состав которых входит субъединица α1, локализуются во внеядерной фракции, тогда как комплексы с субъединицей α2 могут находиться как в ядре, так и в цитоплазме [55]. При этом распределение киназного комплекса между ядром и цитоплазмой может меняться в зависимости от условий, что обусловлено наличием специальных последовательностей для экспорта в составе каталитической субъединицы [56].

Регуляторная β-субъединица является остовом киназного комплекса ΑМΦК [57]. Регуляторная функция заключается в непосредственной вовлеченности β-субъединицы в углеводный метаболизм. В своем составе β-субъединица имеет два функциональных участка: гликогенсвязывающий домен (GBD) и участок связывания с α- и γ-субъединицей (β-СТД). Наличие гликогенсвязывающего домена позволяет комплексу АМФК взаимодействовать с олигосахаридами и гликогеном, при этом сила взаимодействия варьируется в зависимости от изоформы, входящей комплекса [58, 59]. С-концевой В состав домен β-субъединицы взаимодействует с С-концевым доменом α-субъединицы и через концевую короткую последовательность связывает у-субъединицу, формируя основу комплекса [60].

Субъединица γ представляет особый интерес, поскольку она содержит регуляторные сайты связывания адениновых нуклеотидов и определяет функцию белка в качестве сенсора уровня АМФ в клетке [61]. У всех видов γ-субъединицы имеются четыре тандемных повтора последовательности примерно из 60 аминокислот, известного как цистатионин-β-синтазный (CBS) домен. Четыре CBS повтора в каждой субъединице образуют два модуля Бейтмана [62], которые собираются «голова к голове», образуя плоский диск с сайтами связывания адениновых нуклеотидов, расположенными близко друг к другу в центре субъединицы [63]. Модули Бейтмана обычно связывают регуляторные лиганды, содержащие аденозин, такие как АМФ, АТФ, S-аденозилметионин, НАД и диаденозинполифосфаты [64]. Таким образом, CBS повторы в γ-субъединице АМФК обеспечивают сайты связывания для регуляторных нуклеотидов АМФ, АДФ и АТФ [65]. Перед первым повтором CBS в последовательности γсубъединицы находится небольшой участок, отвечающий за взаимодействие с βсубъединицей [66].

АМФК является ключевым регулятором энергетического баланса как на клеточном уровне, так и на уровне всего организма. Основная функция ее заключается в том, что в условиях энергетического дефицита АМФК ингибирует процессы, протекающие с потреблением АТФ, и стимулирует процессы, направленные на производство АТФ, тем самым оперативно восстанавливая нарушенный энергетический баланс. Активация АМФК происходит при энергопотребления значительном увеличении организма (например, при интенсивной физической нагрузке), а также в стрессовых условиях, таких как гипоксия, ишемия или оксидативный стресс, сопровождающихся увеличением AMΦ, который внутриклеточной концентрации является эндогенным низкомолекулярным активатором АМФК [67].

Способность оперативно реагировать на изменившиеся энергетические потребности определяет вовлеченность АМФК в основные сигнальные каскады, отвечающие за регуляцию липидного, углеводного, белкового метаболизма и других не метаболических, но жизненно важных процессов. Основными процессами в рамках глюкозного метаболизма, на которые направлена активность АМФК, это усвоение глюкозы за счет активации глюкозных транспортеров на клеточной мембране [68], повышение интенсивности гликолиза в целом [69], ингибирование синтеза гликогена [70], а также подавление глюконеогенеза посредством инактивации транскрипционных коактиваторов и факторов транскрипции, отвечающих за экспрессию ферментов глюконеогенеза [71].

Активированная АМФК стимулирует процесс окисления жирных кислот за счет фосфорилирования одной из наиболее значимых мишеней, относящихся к липидному метаболизму, митохондриально ассоциированной изоформы ацетил-КоА карбоксилазы (АСС2) [72]. Также стимулируется захват жирных кислот митохондриями [73]. В то же время, АМФК подавляет транскрипцию генов, контролирующих весь путь синтеза жирных кислот [74], ингибирует синтез изопреноидов, в частности холестерина [75], а также триглицеридов и фосфолипидов [76]. АМФК участвует в регуляции белкового метаболизма, оказывая ингибирующее действие на синтез белков через несколько механизмов транскрипционных [77, 78], активирует два главных регулятора митохондриального биогенеза [79], участвует в процессе митофагии [80], фосфорилирует основные белки р53 и р27, отвечающие за арест клеточного цикла и аутофагию [81, 82], активирует транскрипцию генов, участвующих в процессе ответа на окислительный стресс [83].

АМФК напрямую или опосредованно вовлечена в огромное количество процессов, осуществляя фосфорилирование различных белковых мишеней. Многие субстраты АМФК уже были установлены и охарактеризованы, тем не менее некоторые еще предстоит идентифицировать [84]. Основные белковые АМФК, мишени через которые осуществляется регуляция важнейших метаболических и неметаболических процессов, представлены на Рисунке 1.10. Bce АМФК ЭТИ функции делают ключевым регулятором клеточного энергетического гомеостаза, помогая клеткам адаптироваться к изменениям в энергетическом состоянии и обеспечивая выживание в условиях стресса.



Рисунок 1.10 – Участие АМФК в различных биохимических процессах. Разрыв линии указывает на неизвестный механизм действия

## 1.2.2 Заболевания, связанные с нарушением функционирования АМФК

АМФК является важным элементом на пересечении основных метаболических путей, а повсеместная экспрессия фермента и его вовлеченность в регуляцию углеводного, липидного и белкового метаболизма позволяют АМФК осуществлять функцию поддержания энергетического гомеостаза организма. Нарушения нормального функционирования АМФК и ее сигнальных каскадов могут иметь устойчивые негативные последствия на системном уровне, в связи с этим АМФК рассматривается в качестве мишени при разработке лекарственных препаратов для лечения заболеваний, прямо или косвенно связанных с нарушением энергетического баланса.

К настоящему моменту накопилось огромное количество свидетельств о том, что избыточное питание и ожирение являются критическими факторами

заболеваний, риска при развитии хронических том В числе инсулинорезистентности, сахарного диабета и рака. Было показано, ЧТО избыточное накопление трех таких основных питательных веществ, как глюкоза, жирные кислоты и аминокислоты, вызывает ингибирование активности АМФК и способствует развитию резистентности к инсулину [85]. Высокие уровни глюкозы ингибируют АМФК посредством механизмов, которые не влияют на соотношение АМФ : АТФ [86]. Высокие уровни аминокислот, особенно аминокислот с разветвленной цепью, ингибируют АМФК за счет повышения уровня АТФ [87]. Избыток насыщенных жирных кислот ингибирует АМФК, индуцируя накопление диацилглицеринов И церамидов [88]. И гиперинсулинемия, наконец сопровождающаяся избыточным накоплением питательных веществ, ингибирует АМФК и стимулирует сигнальный каскад киназы АКТ, который вызывает ингибирующее фосфорилирование по α-субъединице АМФК [89].

Наиболее заметным и исследованным является нарушение регуляции активности АМФК при диабете и ожирении. Было показано, что на фоне данных патологических состояний базальный уровень активности АМФК существенно снижен за счет ингибирующего действия высоких концентраций сигнальных молекул [90, 91], что не позволяет АМФК в полной мере реализовывать свои функции и ведет к дальнейшему усугублению метаболических расстройств на системном уровне. Особое внимание было уделено исследованию воздействия повышенного уровня глюкозы на функционирование АМФК и механизмов, опосредующих ингибирующий эффект, что напрямую связано с патогенетической картиной диабета 2-ого типа. Недавно было показано, что высокий уровень глюкозы не просто угнетает активность АМФК за счет взаимодействия с киназой AKT, но И способствует диссоциации комплекса АМФК и основной активирующей ее киназы LKB1, а также убиквитин-зависимой деградации каталитической субъединицы [92].

Любые метаболические нарушения, возникающие в организме, так или иначе влияют на функционирование АМФК, что сказывается на ее регуляторной способности и в итоге может приводить к катастрофическим для организма

последствиям. В настоящее время все больше подтверждений находит гипотеза, полагающая, что снижение активности АМФК обуславливает метаболический синдром и развитие осложнений, как часто называют сопутствующие заболевания, такие как диабет 2-ого типа, атеросклероз, сердечно-сосудистые патологии, инфаркт, инсульт [93]. Одним из наиболее неблагоприятных осложнений метаболического синдрома является атеросклероз, который ведет к развитию ишемической болезни сердца и является наиболее частой причиной инфаркта и инсульта [94].

В настоящее время считается, что АМФК является важным игроком и в контексте раковых заболеваний. Функционирование АМФК неразрывно связано с процессами клеточного роста и выживания. Стимуляция активности АМФК представляется действенной терапевтической стратегией при некоторых типах опухолей, что находит подтверждение в клинической практике [95, 96]. Препараты, вызывающие активацию АМФК, применяются в настоящее время в комбинации с агентами, проявляющими основной противоопухолевый эффект.

АМФК имеет решающее значение для регуляции метаболизма миокарда во время ишемии/реперфузии и предотвращения ишемического повреждения и постишемической реперфузии. Было показано, потеря функциональной активности АМФК приводит к нарушению усвоения глюкозы и процесса гликолиза, плохому восстановлению постишемической функции и усилению некроза и апоптоза миоцитов [97]. Нарушение функции АМФК также связывают с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний из-за ее ключевой роли в регулировании энергетического обмена в сердце [98].

Хроническая болезнь почек (ХБП) представляет собой серьезную проблему здравоохранения и связана с такими физиологическими и метаболическими нарушениями, как гипертония, ожирение, резистентность к инсулину, сердечнососудистые заболевания и старение. Эти нарушения также являются факторами риска патогенеза и прогрессирования ХБП. Клетки почек активно экспрессируют АМФК, при этом заболевания почек, вызванные метаболическими нарушениями, демонстрируют дисрегуляцию активности АМФК [99, 100].

Все больше появляется свидетельств того, что активация АМФК при нейродегенеративных заболеваниях может иметь широкий спектр нейропротекторных эффектов [101]. Нарушение регуляции АМФК было отмечено при таких заболеваниях, как боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и других нейропатиях [102]. В частности, было показано, что многие основные механизмы, лежащие в основе патогенеза болезни Паркинсона, можно регулировать, по крайней мере частично, посредством активации АМФК [103].

Существуют также патологии, при которых наблюдается повышенная активность АМФК. Изучение неоднозначной роли АМФК в контексте раковых заболеваний привело ряде к предположению, случаев ЧТО В именно ингибирование, а не активация киназы, будет производить наибольший терапевтический эффект [104]. Было установлено, что активная форма АМФК может выступать не только в роли опухолевого супрессора, но и способствовать опухоли при определенных типах рака [105]. В развитию частности, ингибирование АМФК совместно с химиотерапией показало существенное увеличение антипролиферативного потенциала препарата против рака желчного пузыря, что позволило предложить данную синергическую стратегию в качестве способа повышения эффективности противораковой терапии [106].

В последние годы появляется все больше свидетельств эффективности ингибирования АМФК для терапии различных сердечно-сосудистых патологий. Ингибирование АМФК способствует нарушению агрегации тромбоцитов, что представляет собой одну из стратегий защиты артерий от тромбоза [107]. Подавление активности АМФК рассматривается в качестве комплексной легочной артериальной гипертензии, стратегии лечения что позволяет регулировать ремоделирование сосудов [108]. Также было показано, что гиперактивность АМФК связана с патогенезом ряда нейродегенеративных нарушений [109]. Несмотря на то, что активация АМФК позволяет восстановить нарушенный метаболизм после ишемических поражений, ингибирование АМФК

в момент острой ишемии позволяет уменьшить размер поражения и улучшить неврологический исход состояния за счет нейропротекторного эффекта [110, 111].

Таким образом, АМФК является перспективной мишенью для терапии широкого круга заболеваний, характеризующихся различными метаболическими расстройствами. Терапевтическая значимость фармакологической модуляции активности АМФК остается высокой не только для лечения диабета, ожирения и метаболического синдрома, но также для ряда других социально значимых заболеваний, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, а также рак.

## 1.2.3 Известные модуляторы активности АМФК

Среди известных активаторов АМФК на сегодняшний день значительную группу составляют соединения натурального происхождения. Структурное разнообразие природных активаторов позволяет предположить, что данные соединения не всегда взаимодействуют с АМФК напрямую, а активируют киназный комплекс опосредованно [112].

Первые исследования АМФК как киназы печени, регулирующей биосинтез жирных кислот, показали стимулирующее действие АМФ на функционирование данного фермента, что обусловило его название [113]. Таким образом, АМФ является наиболее важной активирующей молекулой, которая связывается непосредственно с ү-субъединицей, вызывая аллостерическую активацию. Отличительной особенностью АМФК разработки как мишени ДЛЯ низкомолекулярных агентов является то, что активированное состояние киназы обуславливает сигнальных каскадов, позволяющих запуск поддерживать гомеостаз организма на определенном уровне. В то же время для большинства киназ основным способом воздействия на их активность является ингибирование, так как при их активации запускаются многие паталогические процессы. В связи с этим основные усилия академических исследователей и фармацевтических фирм с момента идентификации киназы были направлены на поиск путей стимуляции

активности АМФК и разработку селективных активирующих агентов (Рисунок 1.11).



Рисунок 1.11 – Структуры наиболее значимых активаторов АМФК

Одним из типов соединений, способных вызвать активацию АМФК, являются АМФ миметики. Для связывания по АМФ-связывающим сайтам, соединение-активатор должно воспроизводить свойства молекулы АМФ. В 1994 году было продемонстрировано, что такой аденозиновый аналог, как рибозид 5-аминоимидазол-4-карбоксамида (AICAR, Рисунок 1.11), во многом воспроизводящим структуру АМФ, активирует АМФК человека *in vitro* и *in vivo*, а его эффект не зависит от величины соотношения АМФ:АТФ [114–116]. Еще одной значимой структурой стала разработка тиенопиридонового производного

А-769662 (Рисунок 1.11) компанией Abbott [117]. Данное соединение стало результатом высокопроизводительного скрининга библиотеки из 700000 структур и последующей оптимизации выявленных соединений-хитов. Было показано, что применение А-769662 на мышиной модели диабета способствовало снижению уровня глюкозы и триглицеридов в плазме крови, снижению интенсивности экспрессии ферментов глюконеогенеза и уменьшению веса животных по сравнению с контролем [118].

Интересной структурой является соединение РТ-1 (Рисунок 1.11), которое было идентифицировано в 2008 году в ходе скрининга библиотеки из 3600 соединений на способность активировать вариант α-субъединицы, содержащей киназный и автоингибиторный домены (α1: 1–394) [119]. Было выдвинуто активирующего действия предположение, что механизм заключается предотвращении контакта автоингибиторного домена с киназным доменом, то есть РТ-1 является ингибиторов автоингибиторного домена. К сожалению, в условиях *in vivo* оно оказалось малоэффективным из-за низкой биодоступности и недостаточной активности. Неожиданной структурой можно назвать соединение Compound 2 (Рисунок 1.11), обнаруженное компанией Metabasis Therapeutics в результате скрининга сфокусированной библиотеки миметиков АМФ из 1200 соединений. Несмотря на умеренное структурное сходство с  $AM\Phi$ , Compound 2 проявило на порядок лучший активирующий потенциал, реализуемый по механизму аналогично АМФ, а низкая клеточная проницаемость соединения была преодолена путем разработки фосфонатных пролекарственных форм [120].

Еще в 2010 году компания Betagenon анонсировала создание нового перспективного соединения О-304 (Рисунок 1.11) для терапии диабета 2-го типа, которое впоследствии было названо first-in-class пан-активатор АМФК. В последовавших за этим клинических испытаниях О304 вводили молодым здоровым людям и людям среднего возраста с избыточным весом, а также пациентам с диабетом 2-ого типа, при этом препарат не вызывал каких-либо значительных побочных эффектов, хорошо переносился и показал соответствующие метаболические и сосудистые эффекты [121]. Недавние

исследования показывают, что O-304 обладает потенциалом замедлять старческое повреждения почек посредством регулирования множественных путей, индуцированных АМФК, тем самым защищая почки от фиброза [122].

Дальнейшее появление новых активаторов АМФК стало лавинообразным. Исследовательская группа из фирмы GlaxoSmithKline заявила о создании серии пирролопиридоновых соединений на основе А-769662 в качестве нового класса A-769662 обладал активаторов АМФК. Так как низкой пероральной доступностью и активировал только β1-содержащие комплексы АМФК, специалисты заменили тиофеновое кольцо на пиррольное, выявили соединениелидер, провели его оптимизацию и представили GSK621 (Рисунок 1.11) как агонист АМФК, обладающий терапевтическим потенциалом при остром миелолейкозе (ОМЛ) [123]. В свою очередь ученые из Hoffmann-La Roche провели структурную оптимизацию активатора PT-1 и предложили новый активатор С24 (Рисунок 1.11) [124]. Хотя механизм действия за счет блокирования автоингибиторного домена так и не был подтвержден для этого соединения, было показано, что С24 облегчает состояние гиперлипидемии и является перспективным для разработки гиполипидемического препарата на его основе [125]. Компания Merck еще в 2010 году подала серию патентных заявок, в которых производные бензимидазолов были заявлены в качестве терапевтически значимых активаторов АМФК для лечения и профилактики заболеваний, восприимчивых к ее активации. Среди заявленных соединений в дальнейшие исследования пошло соединение Ex229 (compound 991) (Рисунок 1.11). Для этого соединения была продемонстрирована значительно более высокая АМФКстимулирующая активность по сравнению с А-769662, селективность действия по β1-содержащим комплексам [126], а отношению к также получена И расшифрована сокристаллизованная структура с полноразмерной АМФК [63]. В то же время, ученые из Mercury Pharmaceuticals провели скрининг и предложили соединение МТ 63-78 (Рисунок 1.11), которое аллостерически активирует АМФК дозозависимым образом, в качестве нового активатора АМФК для ингибирования роста клеток рака простаты [127].
К наиболее значимым активаторам АМФК, предложенным в последние годы, можно отнести разработки фармацевтических компаний Pfizer и Poxel. Исследователи компании Pfizer провели масштабные исследования и предложили целый ряд кандидатных структур, включая PF-249, PF-739, PF-06409577, PF-06679142, PF-06685249 [128-130]. Наиболее успешный лекарственный кандидат, PF-06409577 (Рисунок 1.11), продемонстрировал множество полезных эффектов, в том числе снижение развития атеросклеротических бляшек, что может найти применение при терапии атеросклероза [131]. При этом исследователи компании Poxel не просто разработали структуру PXL770 (Рисунок 1.11) с помощью оптимизации одного исходного соединения, идентифицированного в ходе классического высокопроизводительного скрининга, но также предложили первый активатор АМФК, успешно дошедший до стадии II клинических испытаний [132]. Таким образом, к настоящему моменту было разработано низкомолекулярных большое количество соединений. оказывающих АМФК и обладающих необходимыми активирующее действие на ЛЛЯ лекарственных кандидатов характеристиками.

Вопрос о необходимости исследования процесса ингибирования АМФК, а также разработки селективных ингибиторов был поставлен первооткрывателем киназы лишь после 25 лет интенсивных исследований процесса активации АМФК за счет естественных или искусственных стимулов. В настоящий момент лишь три соединения признаны научным сообществом в качестве ингибиторов АМФК. Исторически первым ингибитором стал дорсоморфин (Compound C) (Рисунок 1.12), идентифицированный в результате скрининговых исследований двумя независимыми научными группами [133, 134]. Вторым является соединение SBI-0206965 (Рисунок 1.12), изначально идентифицированное при скрининге сфокусированной библиотеки пиримидиновых аналогов как селективный ингибитор киназы ULK1, приводящий к блокированию аутофагии [135]. Последняя структура, ВАҮ-3827 (Рисунок 1.12), была идентифицирована силами нескольких отделений фармацевтической компании Bayer в ходе скрининга около 4 миллионов соединений и последующей оптимизации [136].

37



Рисунок 1.12 – Соединения-ингибиторы АМФК

Следует отметить, что работы по исследованию зависимости структураактивность ни для одного из трех перечисленных соединений не проводились, что можно объяснить обстоятельствами их идентификации в качестве ингибиторов АМФК. Таким образом, задача поиска и разработки активных соединений, вызывающих селективное ингибирование активности АМФК, становится актуальной, принимая во внимание возрастающую потребность в ингибировании АМФК как в исследовательских, так и терапевтических целях.

# 1.3 Пиразоло[1,5-а]пиримидин как основа для создания киназных ингибиторов

пиразоло[1,5-а]пиримидина собой Производные представляют значительную группу *N*-гетероциклических соединений, которая привлекла удобный билдинг-блок внимание исследователей как построения для лекарственных кандидатов. Широкий спектр биологической активности, проявляемый соединениями, противораковое, такими В том числе противоинфекционное, противовоспалительное действие, позволяет отнести пиразоло[1,5-а]пиримидиновый каркас к привилегированных гетероциклам. В то же время структурное сходство пиразоло[1,5-а]пиримидина с аденином позволяет создавать на его основе миметики аденозиновых нуклеотидов.

#### 1.3.1 Лекарства на основе пиразоло[1,5-а]пиримидина

Азотсодержащие гетероциклы широко распространены в природе. Они необходимы для жизни и играют решающую роль в метаболизме всех живых Пиразоло[1,5-а]пиримидиновый организмов. каркас является одним ИЗ нескольких азотсодержащих гетероциклов, обнаруживаемых BO многих биологически активных молекулах. Способность этих соединений имитировать особенности биогенных пуринов делает их перспективными структурные кандидатами для разработки лекарств [137]. В то же время пиразоло[1,5а]пиримидины являются биоизостерами соединений. таких как триазолотиенопиримидины, имидазохиназолины, пиримидохиназолины И имидазохинолиноны. В настоящее время пиразолопиримидины и родственные гетероциклические соединения находят широкое применение в медицине и сельском хозяйстве. Ряд лекарственных препаратов основе на пиразоло[1,5-а]пиримидина был одобрен для применения в клинике.

Залеплон (Рисунок 1.13), один из первых препаратов на основе пиразоло[1,5-а]пиримидина, одобренный для медицинского применения в США в 1999 году, представляет собой успокаивающее и снотворное средство для лечения бессонницы [138]. Он относится к небензодиазепиновым препаратам, действуя через бензодиазепиновые рецепторы GABA<sub>A</sub>. В отличие от золпидема или зопиклона, залеплон проявляет селективное связывание с субъединицами α2 и α3 [139]. Близкий ему препарат индиплон (Рисунок 1.13), разрабатываемый для лечения бессонницы, наоборот связывается с α1-субъединицами рецепторов GABA<sub>A</sub> в мозге [140]. Учитывая тот факт, что FDA одобрила лишь малые дозировки этого препарата, компания-разработчик отказалась от дальнейших клинических исследований и маркетинговых продвижений индиплона. В свою очередь оцинаплон (Рисунок 1.13) имеет схожий фармакологический профиль с препаратами группы бензодиазепинов, но обладает также анксиолитическим действием [141]. Разработка этого препарата была прекращена из-за выявленных побочных эффектов в печени на стадии III клинических испытаний. Лоредиплон (Рисунок 1.13) также относится к небензодиазепиновым препаратам из семейства пиразолопиримидинов для лечения бессонницы, но его разработка еще не завершена [142].



Рисунок 1.13 – Лекарственные препараты, содержащие в своей структуре фрагмент пиразоло[1,5-а]пиримидина

Среди противодиабетических препаратов следует отметить пиразолопиримидин-содержащий анаглиптин (Рисунок 1.13). Анаглиптин. фармацевтический препарат для лечения сахарного диабета 2 типа, относится к классу глиптинов. Он был разработан как эффективный и селективный ингибитор дипептидилпептидазы-4 японскими учеными [143] и впоследствии одобрен для использования в Японии. Другой препарат, реверсан (Рисунок 1.13), является сильным и нетоксичный ингибитором белка, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью (MRP1), а также ингибитором Р-гликопротеина.

Несмотря на то, что он является коммерчески доступным препаратом, в шестьвосемь более эффективным, чем известные ингибиторы белков-транспортеров, он так и не поступил в клинические испытания [144].

В качестве противовирусного препарата пиразолопиримидинового ряда необходимо упомянуть пресатовир (Рисунок 1.13). Было показано, что этот пероральный ингибитор белка слияния респираторно-синцитиального вируса человека проявляет хорошую биодоступность и мощный противовирусный эффект, позволяя существенно снижать пиковую вирусную нагрузку и тяжесть заболевания [145]. Такие хорошие показатели были получены в результате скрининговых исследований и серьезной работы по оптимизации как пероральной абсорбции, так и физико-химических свойств изначально идентифицированного соединения-кандидата. В настоящий момент пресатовир получил статус FDA «Исследовательский новый препарат» и проходит клинические испытания [146].

### 1.3.2 Активность пиразоло[1,5-а]пиримидинов в отношении киназ

Способность пиразолопиримидинового ядра имитировать адениновое основание АТФ при взаимодействии с нуклеотид-связывающим сайтом определило его использование для разработки ингибиторов различных киназ. Только за последние 10 лет появилось большое количество работ, которые посвящены модификациям известных пиразоло[1,5-а]пиримидинов и разработке новых пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных для ингибирования киназ, играющих ключевую роль в процессе канцерогенеза и метастазировании различных типов рака. Так производные пиразоло[1,5-а]пиримидина заслуженно привлекли к себе внимание исследователей в качестве противоопухолевых агентов, а анализ зависимости структура-активность в отношении этих соединений признан одним из способов разработать более эффективные препараты [147].

Геном человека кодирует 21 циклин-зависимую киназу (cyclin-dependent kinases, CDK), и часть этих ферментов непосредственно регулируют клеточный цикл. В частности, CDK1 контролирует продвижение по клеточному циклу через

41

стадии G2 и митоз, CDK2 запускает S-фазу репликации или синтеза ДНК, а CDK4 и CDK6 отвечают за продвижение по клеточному циклу через фазу роста G1 [148]. Наибольшее число пиразолопиримидиновых производных можно найти среди ингибиторов CDK. К настоящему моменту были разработаны не только селективные ингибиторы CDK (Рисунок 1.14, а) [149], CDK7 (Рисунок 1.14, б) [150], CDK9 (Рисунок 1.14, в и г) [151], но и так называемые мультикиназные ингибиторы, например, динациклиб (Рисунок 1.14, д), который получил статус исследовательского препарата и дошел до стадии III клинических испытаний [152].



Рисунок 1.14 – Примеры ингибиторов циклин-зависимых киназ на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда

Киназа контрольной точки 1 (checkpoint kinase 1, CHK1) является серин/треониновой киназой, которая контролирует клеточный ответ на повреждение ДНК. Активированная киназа способна вызвать остановку клеточного цикла в различных контрольных точках (G1, S и G2) для того, чтобы инициировать процесс репарации ДНК. В случае раковых клеток, ингибирование СНК1 должно препятствовать прогрессированию рака. При скрининговых исследованиях было показано, что пиразолопиримидиновые ингибиторы CDK1 обладают существенным ингибирующим потенциалом по отношению к СНК1,

поэтому одной из стратегий разработки новых ингибиторов стала оптимизация уже известных структур [153]. С помощью данного подхода было создано две серии соединений, среди которых были отмечены высокоактивные и селективные ингибиторы СНК1 (Рисунок 1.15) [154].



Рисунок 1.15 – Примеры ингибиторов киназы контрольной точки 1 на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда

Перспективность 7-аминопиразоло[1,5-а]пиримидинов для ингибирования рецепторных тирозинкиназ была продемонстрирована еще в 2008 году, когда была предложена серия мочевина-содержащих производных (Рисунок 1.16, а) в качестве мультитаргетных ингибиторов [155]. Ha основе пиразолопиримидинового скаффолда были созданы стероидные производные (Рисунок 1.16, б), обладающие ингибирующей активностью по отношению к киназе анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, ALK) [156] и ингибиторы рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (Рисунок 1.16, в) [157]. С помощью оптимизационных процедур был получен высокоактивный и селективный ингибитор RET (REarranged during Transfection) киназы на основе пиразоло[1,5-а]пиримидина (Рисунок 1.16, г) [158].



Рисунок 1.16 – Примеры рецепторных тирозинкиназных ингибиторов на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда

Среди ингибиторов тропомиозинкиназных рецепторов TrkA, TrkB и TrkC также можно найти производные пиразолопиримидина. Ларотректиниб (Рисунок 1.16, а) был изначально разработан для лечения саркомы мягких тканей и в 2015 году получил статус орфанного препарата [159]. Его структура легла в основу разработки ингибиторов Trk второго поколения репотректиниба (TPX-0005, Рисунок 1.16, б) и селитректиниба (Loxo-195, Рисунок 1.16, в), которые наряду со многими другими ингибиторами в настоящее время проходят клинические испытания [160, 161].



Рисунок 1.17 – Примеры ингибиторов тропомиозинкиназных рецепторов на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда

К ингибиторам нерецепторных тирозинкиназ можно отнести производные пиразоло[1,5-а]пиримидинов, которые активны в отношении с-Src киназы (Рисунок 1.18, а). Такие соединения могут быть использованы для лечения острого ишемического инсульта без побочных эффектов со стороны сердечнососудистой системы [162]. Недавно был также разработан пероральный ингибитор химерной тирозинкиназы Bcr-Abl, которая является продуктом гибридного гена *BCR-ABL1* и отвечает за онкогенную трансформацию клеток (Рисунок 1.18, б). Его структура, содержащая пиразоло[1,5-а]пиримидиновый фрагмент, обеспечивает активность как в отношении нативной Bcr-Abl киназы, так и мутантной, позволяя преодолевать приобретенную устойчивость опухолей к иматинибу [163].



Рисунок 1.18 – Примеры нерецепторных киназных ингибиторов на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда

Среди киназых ингибиторов на основе пиразолопиримидинового ядра следует упомянуть структуры (Рисунок 1.19, а, б), обладающие ингибирующей активностью по отношению к киназам семейства Pim, оверэкспрессируемых в нескольких типах опухолей кроветворной системы и поддерживающих рост и выживание злокачественных клеток [164]. Кроме того, существуют также ингибиторы киназ двойной специфичности на основе пиразоло[1,5-а]пиримидина. Так последовательная оптимизация структуры активных пиразоло[1,5-а][1,3,5]-триазинов привела к разработке производного пиразолопиримидина (Рисунок 1.19, в) в качестве высокоселективного и перорального ингибитора

киназы TTK (threonine tyrosine kinase), которая является важным хромосомным регулятором [165].



Рисунок 1.19 – Примеры ингибиторов киназ Ріт и ТТК на основе пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда

Несмотря на то, что пиразоло[1,5-а]пиримидиновый скаффолд находит широкое применение при разработке разнообразных киназных ингибиторов, его структурные особенности позволяют добиться достаточно высокой селективности по отношению к рассматриваемой мишени. В связи с этим, пиразоло[1,5-а]пиримидин остается одной из основных отправных точек при создании новых ингибиторов киназ.

### 1.3.3 Способы построения пиразоло[1,5-а]пиримидинового ядра

Синтез пиразоло[1,5-а]пиримидинов хорошо изучен и осуществляется посредством классических реакций циклоконденсации между производными 5-аминопиразола с 1,3-бисэлектрофилльными соединениями. В качестве 1,3-бисэлектрофилов могут выступать β-дикарбонильные соединения, β-галоеноны, β-енаминоны, β-алкоксиеноны, еноны, иноны и β-кетонитрилы и другие карбонильные соединения.

Наиболее распространенным способом получения пиразоло[1,5-а]пиримидиновой системы является взаимодействие незамещенных и замещенных 5-аминопиразолов с различными β-дикарбонильными соединениями, начиная от малонового диальдегида и кончая разнообразными

β-дикетонами и производными малоновой кислоты. Такой способ синтеза производных пиразоло[1,5-а]пиримидина обеспечивает высокую толерантность к вводимым функциональным группам и позволяет использовать доступные условия при использовании коммерчески доступных реагентов. Чаще всего реакцию циклизации проводят в уксусной кислоте или этаноле, в качестве катализаторов выступают этилат натрия и аминовые основания. В случае использования симметричных β-дикетонов происходит образование 5,7-дизамещенных пиразоло[1,5-а]пиримидинов (Схема 1.1), тогда как при использовании несимметричных β-дикетонов, в принципе, могут быть получены Тем не менее, применение β-дикетонов показало два изомера. свою эффективность при введении фторированных заместителей в положение 7 (Схема 1.2), что было использовано для региоселективного получения негативных модуляторов GLI1 с заметной антипролиферативной активностью [166].



Схема 1.1 – Взаимодействие 5-аминопиразола с симметричным β-дикетоном



Схема 1.2 – Взаимодействие 5-аминопиразола с фторсодержащим несимметричным β-дикетоном

Конденсация 5-аминопиразолов с β-галоенонами происходит в тех же самых условиях, что и с β-дикарбонильными соединениями. Присутствие различных электронодонорных и электроноакцепторных функциональных групп в арильном фрагменте не оказывает существенного влияния на выход конечных пиразоло[1,5-а]пиримидинов, который согласно Goel и соавт. составляет около 70% [167]. Тем не менее, при изменении среды проведения реакции с кислой (уксусная кислота) на основную (гидроксид натрия) может быть получена иная гетероциклическая система – пиразоло[3,4-b]пиридин (Схема 1.3).



Схема 1.3 – Взаимодействие 5-аминопиразола с β-хлореноном

По 1,3-дикарбонильными более сравнению соединениями С реакционноспособной 1,3-бисэлектрофильной системой считается β-енаминоновый фрагмент. Взаимодействие 5-аминопиразолов с β-енаминонами позволяет региоселективно получать 7-замещенные продукты, также ЧТО контролируется с помощью уходящей диметиламиногруппы. На первой стадии реакция протекает по механизму присоединения-элиминирования (по типу азареакции Михаэля), при этом NH<sub>2</sub>-группа исходного аминопиразола связывается с β-углеродным Затем путем атомом. происходит циклоконденсация нуклеофильной атаки пиразольного атома азота по карбонильной группе (Схема 1.4). Последующее отщепление молекулы воды позволяет получить пиразоло[1,5-а]пиримидиновые производные с гетероарильным заместителем в положении 7 [168].



Схема 1.4 – Взаимодействие 5-аминопиразола с β-енаминоном

В противоположность β-енаминононам, использование β-алкоксиенонов позволяет получить 5- и 7-замещенные пиразоло[1,5-а]пиримидины. Так при серии селективных ингибиторов циклооксигеназы-2 на синтезе основе пиразоло[1,5-а]пиримидина было показано, что при взаимодействии этоксибутеноном изомерные 5-метил- 7-метилдифениламинопиразола с замещенный пиразоло[1,5-а]пиримидин образуются в виде смеси в соотношении 1:4 (Схема 1.5) [169]. В случае использования β-алкоксиенонов для введения галоген-насышенного заместителя  $(CCl_3)$ CF<sub>3</sub>) или В пиразоло[1,5-а]пиримидиновое ядро, реакция циклоприсоединения проходит региоселективно и 7-замещенные пиразоло[1,5-а]пиримидины образуются в качестве единственных продуктов (Схема 1.6) [170].



Схема 1.5 – Взаимодействие 5-аминопиразола с β-алкоксиеноном



Схема 1.6 – Взаимодействие 5-аминопиразола с галоген-насыщенным β-алкоксиенонами

Описанные выше примеры представляют 1,3-бисэлектрофильные системы, которые содержат уходящую группу в β-положении. Тем не менее, образование пиразоло[1,5-а]пиримидинового ядра возможно также при использовании простых енонов, таких как производные халкона. Такая реакция идет в жестких условиях, образующийся дигидрированный продукт требует дальнейшего окисления для формирования ароматической пиразолопиримидиновой структуры 1.7). Несмотря на (Схема сложности, ЭТОТ метод имеет несомненное преимущество в виде высокой доступности исходных реагентов и позволяет получать хорошие результаты при введении арильных групп в положения 5 и 7 [171].



Схема 1.7 – Взаимодействие 5-аминопиразола с енонами

В качестве 1,3-бисэлектрофильной системы при формировании пиразоло[1,5-а]пиримидинового ядра могут быть использованы также иноны. В частности, использование активированного этилпропиолата позволяет получать гидрокси/еноновые заместители в положении 5 конденсированного пиразола, а также электрофильные группы в положении 7 (Схема 1.8) [172].



Схема 1.8 – Взаимодействие 5-аминопиразола с инонами

Еще одним реагентом, при взаимодействии с которым 5-аминопиразол превращается в пиразоло[1,5-а]пиримидин, является β-кетонитрил (Схема 1.9). Подобная реакция проходит только в присутствие катализатора, в качестве которого используют молекулярный йод [173]. Тем не менее, такой способ синтеза позволяет вводить амино-группу в положение 7 пиразоло[1,5-а]пиримидинового ядра.



Схема 1.9 – Взаимодействие 5-аминопиразола с β-кетонитрилами

Для циклизации пиримидинового ядра могут быть использованы и другие соединения, содержащие нитрильную группу. Так было показано, что β-замещенные α-цианоакрилонитрилы вступают в реакцию 5-аминопиразололом с образованием пиразоло[1,5-а]пиримидинового производного (Схема 1.10). Реакция проходит в классических для получения пиразоло[1,5-а]пиримидинов условиях, при этом также, как и в предыдущем примере образуется 7-аминозамещенный продукт [174].



Схема 1.10 – Взаимодействие 5-аминопиразола с α-цианоакрилонитрилом

Приведенные выше примеры представляют собой классические способы получения пиразоло[1,5-а]пиримидинового ядра. Учитывая высокий потенциал пиразоло[1,5-а]пиримидина как основы для создания биологически активных соединений различной направленности, a также его исключительные фотофизические свойства и кристаллические характеристики, представляющие практический интерес в области супрамолекулярной химии, наряду с оптимизацией классических схем получения в последние годы было предложено большое количество неклассических путей синтеза этой гетероциклической структуры, в том числе с использованием многокомпонентных реакций. Подробнее с последними разработками в этой области можно ознакомиться в обзоре [175].

## ГЛАВА 2 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

#### 2.1 Выбор объекта исследования

В настоящее время известны всего лишь три структуры, оказывающие на АМФК существенное ингибирующее действие: дорсоморфин (Compound C, BML-275), SBI-0206965 и BAY-3827. Все три структуры являются результатом высокопроизводительного скрининга, поэтому для них не проводились классические исследования структура-активность. При этом каждое из этих соединений имеют недостатки, ограничивающие их дальнейшее использование в исследовательских и терапевтических целях.

Для дорсоморфина была продемонстрирована низкая специфичность по отношению к АМФК при исследовании его профиля ингибирования киназ с MRC-PPU помошью сервиса Express Screen международного центра профилирования киназ (университет Данди, Шотландия) [135]. При этом ингибитор SBI-0206965 проявил более селективное, но менее исчерпывающее ингибирование АМФК (Рисунок 2.1). Дальнейшее исследование механизма действия SBI-0206965 показало его существенно большую ингибирующую активность относительно родственных АМФК киназ (NUAK1, MARK3/4) [176], а также неспецифическое нецелевое ингибирование транспорта глюкозы в мышцах [177].

Коммерческий ингибитор ВАҮ-3827 оказался более эффективным в отношении АМФК и более активным в отношении снижения фосфорилирования мишеней АМФК в сравнительных экспериментах с ингибитором SBI-0206965 [178], что позволило предложить его в качестве предпочтительного ингибитора для исследования функции АМФК на клеточных моделях. Тем не менее, данное соединение продемонстрировало плохую фармакокинетику, обусловленную низкой метаболической стабильностью в условиях in vivo. Оно также обладает низкой растворимостью, что делает затруднительным применение этого соединения для исследования функций АМФК в животных моделях.



Рисунок 2.1 – Профиль киназной селективности для дорсоморфина (2,5 мкм) и ингибитора SBI-0206965 (0,25 мкм) [135]

Для того, чтобы использовать рациональный дизайн, необходимо иметь структурные данные о белковой мишени, в нашем случае АМФК, а также о каком-либо низкомолекулярном лиганде, в нашем случае ингибиторе АМФК, активность которого подтверждается данными эксперимента. Экспериментально было установлено, что SBI-0206965 перекрывает АТФ-связывающий сайт, и это взаимодействие с АМФК соответствует ингибитору типа IIb [135]. В то же время предполагается, что BAY-3827 блокирует сайт связывания АТФ и, вероятно, изменяет конформацию активационной петли [178]. Тем не менее, структурные данные по связыванию с полноразмерным АМФК комплексом имеются лишь для дорсоморфина [179].

Дальнейшие наши исследования были направлены на то, чтобы подтвердить возможность использования структуры дорсоморфина в качестве основы для рационального дизайна селективных киназных ингибиторов, в том числе ингибиторов АМФК. Поэтому мы провели моделирование взаимодействия дорсоморфина с АТФ-связывающим сайтом АМФК методом молекулярного докинга. Структуру полученного комплекса дорсоморфин-АМФК мы сравнили со структурой комплекса, полученного методом ретнгеноструктурного анализа (модель PDB ID 7JHG). Циклоалкильный фрагмент дорсоморфина при докинге продемонстрировал несколько иную укладку, что выражается в достаточно большом значении среднеквадратичного отклонения RMSD = 3,79 Å. Однако если рассматривать ароматическую часть, можно увидеть высокую степень совпадения экспериментальной и расчетной укладок дорсоморфина в сайте связывания (RMSD = 0,15 Å).



Рисунок 2.2 – Размещение дорсоморфина в АТФ-связывающем сайте АМФК по данным рентгеноструктурного анализа (малиновый) и молекулярного докинга (зеленый). Атомы водорода в экспериментальной модели опущены. Справа приведены структуры дорсоморфина без белкового окружения

Таким образом, возможность смоделировать взаимодействие дорсоморфина в активном сайте AMФК с высокой степенью достоверности, а также отсутствие данных структура–активность для соединений этого хемотипа по отношению к AMФК определили выбор дорсоморфина в качестве объекта исследования. Модификация дорсоморфина с последующей оценкой вклада определенных структурных фрагментов в целевую ингибирующую активность представляет собой способ выявить более эффективный и селективный ингибитор AMФК, а также разработать основу для рационального дизайна принципиально новых ингибиторов, нацеленных на ATФ-связывающую область AMФК.

## 2.2 Литературные схемы синтеза дорсоморфина

Так дорсоморфин был как изначально выявлен В ходе высокопроизводительного скрининга, какой-либо конкретной схемы синтеза для него описано не было. Если провести литературный поиск, то можно найти первое упоминание схожих структур в канадском патенте компании Мерк, ингибиторам ангиогенеза [180]. Согласно посвященном новым данным, представленным в патенте, дорсоморфин может быть получен двумя путями (Схема 2.1). При этом синтетическая схема из 3-амино-4-бром-1Н-пиразола предлагалась авторами патента в случае, если необходимые аминопиразолы, а в 4-(4-пиридил)-1Н-пиразол-5-амин, случае дорсоморфина ЭТО коммерчески недоступны.



Схема 2.1 – Возможные пути синтеза дорсоморфина согласно [180]

Следует отметить, что в недавней работе была представлена альтернативная схема синтеза дорсоморфина [181]. Авторы руководствовались тем, что коммерческий продукт BML-275 (дорсоморфин) слишком дорогой, поэтому необходимо синтезировать его самостоятельно. Синтетическая схема включала в себя пять стадий, начиная с конденсации 2-броммалонового альдегида и 3-аминопиразола (Схема 2.2). При этом две стадии представляют собой реакцию

Сузуки, что существенно повышает стоимость конечного продукта при таком синтезе.



Схема 2.2 – Схема синтеза дорсоморфина, предложенная в [181]

В то же время, стоимость 3-амино-4-бром-1Н-пиразола не позволяет рассматривать данный реактив в качестве исходного, на котором можно построить схему синтеза дорсоморфина. Мы решили разработать синтетическую схему на основе 4-(4-пиридил)-1Н-пиразол-5-амина, подобрав для него соответствующий метод синтеза.

### 2.3 Разработка схемы синтеза дорсоморфина на основе линейной стратегии

Проанализировав имеющуюся в литературе информацию относительно синтеза дорсоморфина, мы решили сначала применить линейную стратегию для его синтеза, чтобы определить наиболее трудоемкие и выход-лимитирующие стадии. Структуру дорсоморфина мы разложили на циклические фрагменты, а синтетическую схему построили таким образом, чтобы последовательно вводить эти фрагменты (Рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 – Обозначение последовательности введения циклических фрагментов дорсоморфина при линейном синтезе

Таким образом, первым циклическим фрагментом для построения синтетической схемы стал фрагмент пиридина, а весь синтез был разбит на три подзадачи согласно Рисунку 2.3: 1) А → АБ; 2) АБ → АБВГ; 3) АБВГ → АБВГД.

### 2.3.1 Синтез пиридил-замещенной аминопиразольной компоненты

Первым этапом при синтезе дорсоморфина стала разработка синтетической схемы для получения 4-(4-пиридил)-1Н-пиразол-5-амина (фрагмент АБ, Рисунок 2.3). В качестве исходного реагента была выбрана изоникотиновая кислота (Схема 2.2). На первой стадии проводили этерификацию по методике [182]. Реакцию проводили в безводном метаноле с использованием серной кислоты в качестве дегидратирующего средства. Изначальный выход реакции составил 72%, что казалось недостаточным, учитывая количество предстоящих стадий. Оптимизация условий проведения реакции позволила повысить выход на этой начальной стадии до 92%.



Схема 2.2 – Предложенная схема синтеза 4-(4-пиридил)-1Н-пиразол-5-амина

Восстановление метилового эфира 4-пиридинкарбоновой (изоникотиновой) кислоты боргидридом натрия осуществляли в сравнительно новой модификации с катализом метилатом натрия (Схема 2.2, стадия II) [183]. В результате реакции образуется комплекс, не позволяющий выделить конечный продукт без дополнительной обработки соляной кислотой при нагревании с последующим подщелачиванием K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Получение 4-(хлорметил)пиридина (Схема 2.2, стадия III) проводили по методу [184] с дополнительной кристаллизацией продукта из изопропанола для того, чтобы удалить кислотные загрязнения, которые неизбежно будут мешать осуществлению последующей стадии нуклеофильного замещения. Изначально рассматривалась возможность получения И использования 4-(хлорметил)пиридина в виде свободного основания [185], однако ΜЫ зафиксировали, что при попытке концентрирования разбавленного раствора 4-(хлорметил)пиридина начинается активная самоконденсация. Поэтому получали 4-(хлорметил)пиридин гидрохлорид в хлористом метилене, применяя хлористый тионил.

Получение 2-пиридилацетонитрила (Схема 2.2, стадия IV) осуществляли путем нуклеофильного замещения цианистым натрием в апротонном биполярном растворителе, в качестве которого использовали ДМСО. Такая методика проведения реакции была впервые предложена в работе [186]. В дальнейшем были предложены модификации [184, 187], которые позволяют увеличить выход, но требующие достаточно большого избытка цианистого натрия. Это связано с тем, что один эквивалент нуклеофила уходит на нейтрализацию исходного хлорметилпиридина, взятого в виде гидрохлорида. Применение минимального избытка цианистого натрия (2,2 экв.) позволило получить 2-пиридилацетонитрил с устойчивым выходом, превышающим 80%. Выделение продукта реакции осуществляли с помощью вакуумной дистилляции при остаточном давлении 15 мм рт. ст., так как 2-(пиридин-4-ил)ацетонитрил представляет собой бесцветную жидкость, затвердевающую при комнатной температуре. Он достаточно стабильный в виде основания и для дальнейшего синтеза не требует превращения в гидрохлорид.

Согласно литературе, синтез 3-диметиламино-2-пиридилакрилонитрила (Схема 2.2. стадия V) требует применения двадцатикратного избытка диметилацеталя диметилформамида [188]. Анализируя данную методику, можно предположить, что при таких условиях процессы смолообразования, которые мы зафиксировали при применении данной методики, идут причине ПО использования диметилацеталя диметилформамида в качестве растворителя. Нами была проведена оптимизация методики реакции, в том числе установлено оптимальное количество избытка диметилацеталя диметилформамида (1,3 экв.). Дополнительно был разработан протокол очистки, который позволил оценить истинный цвет кристаллического 3-диметиламино-2-пиридилакрилонитрила как желтоватый.

Заключительной стадией стало образование пиразольного кольца. Стадия циклизации 3-диметиламино-2-пиридилакрилонитрила в аминопиразол происходит при участии молекулы гидразина (Схема 2.2, стадия VI). Для осуществления этой стадии использовали как гидразин в виде основания, так и его соли (гидрохлорид, гидробромид). Наиболее высокие выходы были получены при применении гидробромида гидразина в среде этанол–вода (92%).

Таким образом, шестистадийный синтез 4-(пиридин-4-ил)-1*Н*-пиразол-5амина по результатам неоднократных повторов был осуществлен со средним выходом 41% в пересчете на исходную кислоту.

# 2.3.2 Формирование пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда и введение арильного фрагмента

Следующий этап синтеза заключался в формировании непосредственно пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда и одновременном введении арильного фрагмента «Г» в структуру молекулы. Согласно патентным данным, это можно осуществить в одну стадию при использовании 4-метоксифенилмалонового альдегида (Схема 2.3). С точки зрения стратегии химического синтеза такой

вариант имеет некоторые преимущества за счет параллельного синтеза замещенного 1,3-бисэлектрофила, который синтезировали по методу, описанному в [189].



Схема 2.3 – Синтез пиразолопиримидинового скаффолда с арильным фрагментом

сложностями Однако столкнулись ΜЫ co на этапе синтеза 1,3-бисэлектрофила, получение которого оказалось достаточно трудоемким. Выходы из реакции составили более 100%, что однозначно указывало на образование продуктов. К очистку примесных сожалению, провести 4-метоксифенилмалонового альдегида без существенных потерь нам не удалось, поэтому мы использовали сырой продукт, выделенный из реакционной смеси. Однако применение такого продукта на стадии циклизации приводило к образованию примеси неидентифицированного 4-метоксифенил-содержащего соединения, которое очень плохо отделялось при применении как физикохимических, так и хроматографических методов очистки. Поэтому мы были вынуждены отойти от первоначальной схемы и разработать методику последовательного введения фрагментов «В» и «Г», а также использовать реакцию кросс-сочетания для образования углерод-углеродной связи между фрагментами «В» и «Г».

Согласно обновленной формирование схеме, пиразоло[1,5-а]пиримидинового скаффолда осуществляли при помощи броммалонового альдегида (Схема 2.4), который получали согласно методике [190]. Такой вариант построения функционализированной структуры пиразоло[1,5-а]пиримидина выглядит более предпочтительным с точки зрения

комбинаторной стратегии. Образование 6-бром-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5а]пиримидина в условиях, аналогичных взаимодействию с 4-метоксифенилмалоновым альдегидом, проходило со стабильно высоким выходом (около 90%), а сырой продукт не требовал специфической очистки.



Схема 2.4 – Последовательное введение фрагментов «В» и «Г» в структуру синтезируемой молекулы дорсоморфина

Образование С–С связи между 6-бром-3-пиридилпиразоло[1,5а]пиримидином и 4-метокси замещенным бензольным кольцом осуществляли с помощью реакции Сузуки–Мияуры (Схема 2.4), для проведения которой 4-метоксифенилборная кислота была синтезирована по методике, описанной в [191]. Реакция кросс-сочетания в стандартных условиях с применением Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> в качестве катализатора прошла с хорошим выходом (87%) и позволила получить конечный продукт высокой чистоты.

# 2.3.3 Синтез циклоаминового фрагмента и получение конечного соединения

Синтез циклоаминового алкильного фрагмента изначально осуществляли из этиленгликоля согласно Схеме 2.5. Для этого проводили монобензоилирование, свободную гидроксильную группу заменяли на хлор, полученный хлорид использовали для алкилирования пиперидина, затем осуществляли гидролиз, и вновь освободившуюся гидроксильную группу заменяли на хлор.



Схема 2.5 – Синтез алкильного фрагмента молекулы дорсоморфина

Бензоилирование этиленгликоля (Схема 2.5, стадия I) проводили в хлористом метилене с помощью бензоилхлорида, при этом гликолевая компонента бралась в избытке, а прибавление бензоилхлорида проводилось максимально медленно для снижения выхода диацилированного продукта.

Основным способом очистки при использовании такой схемы является вакуумная перегонка, которая позволяет получить целевые промежуточные продукты высокой чистоты. Конечный 1-(2-хлороэтил)пиперидин, получаемый по схеме в виде гидрохлорида, удобнее всего перевести в форму основания, которое является достаточно устойчивым и может храниться в течение нескольких недель без существенной деградации.

Для завершения синтеза дорсоморфина полученный на предыдущем этапе пиридилпиразоло[1,5-а]пиримидиновый фрагмент предполагалось подвергнуть деметилированию и алкилированию 1-(2-хлороэтил)пиперидином (Схема 2.6). Деметилирование проводили в хлористом метилене с использованием молярного эквивалента BBr<sub>3</sub> [192]. Затем осуществляли реакцию О-алкилирования освободившейся гидроксильной группы в диметилформамиде в присутствии  $K_2CO_3$ . К сожалению, суммарный выход после двух стадий не превышал 15–18%, несмотря на варьирование условий проведения реакций. Тем не менее, мы смогли получить целевой дорсоморфин, используя линейную стратегию, И охарактеризовать его.



Схема 2.6 – Заключительные стадии синтеза дорсоморфина

# 2.4 Синтез дорсоморфина и его производных с использованием конвергентной стратегии

Умеренные выходы на конечных стадиях реализации линейной стратегии заставили нас пересмотреть ранее предложенную схему синтеза и предложить новую схему, позволяющую получить не только сам дорсоморфин, но и его структурные аналоги.

Начальные этапы рационального дизайна обычно начинаются с создания библиотеки соединений из нескольких десятков, которые затем используются для первичной оценки зависимости структура–активность. При этом структурные различия этих соединений должны быть небольшими, чтобы различия их реальной активности можно было объяснить за счет компьютерного моделирования связывания с белком-мишенью.

Для целей наработки сфокусированной библиотеки соединений линейная стратегия практически не применяется. Поэтому перед нами была поставлена задача применения конвергентной стратегии для синтеза дорсоморфина и его производных. Анализ литературных данных и полученных результатов позволил предложить следующую схему согласно Рисунку 2.3: 1)  $A \rightarrow AE$ ; 2)  $AE \rightarrow AEB$ ; 3)  $\Gamma \rightarrow \Gamma Д$ ; 4)  $AEB + \Gamma Д \rightarrow AEB \Gamma Д$ .

Таким образом, основными прекурсорами для получения дорсоморфина, согласно предложенной схеме, могут выступать фрагменты, представленные на Рисунке 2.4.



Рисунок 2.4 – Ретросинтетический анализ молекулы дорсоморфина

#### 2.4.1 Основные точки модификации структуры дорсоморфина

Учитывая тот факт, что основной задачей в рамках работы явилась не модификация дорсоморфина с целью получить более активное и селективное соединение, а изучить зависимость структура–активность соединений пиразолопиримидинового ряда, в первую очередь были определены структурные элементы дорсоморфина, вклад которых в целевую активность необходимо определить. Для этого были определены точки, по которым можно осуществлять модификацию структуры дорсоморфина.

Если не затрагивать пиразолопиримидиновый скаффолд, который определяет сходство дорсоморфина с молекулой АТФ, то первым структурным элементом является пиридиновый цикл. Варьирование этого фрагмента можно достичь путем изменения положения атома азота в кольце, что легко реализуется с помощью использования соответствующих исходных пиридинкарбоновых кислот. Согласно рентгеноструктурным данным, молекула дорсоморфина в сайте связывания принимает практически планарное положение. Поэтому следующим важным моментом является угол плоскости фенильного фрагмента относительно пиразолопиримидинового ядра. Для того, чтобы развернуть фенильный фрагмент можно ввести заместители в положения 5 и 7, например метильные группы, что существенно повлияет на расположение фенильного фрагмента.

Помимо этих модификаций можно также ввести дополнительные заместители в фенильный фрагмент или изменить направление алкильного фрагмента за счет изменения положения атома кислорода относительно исходной молекулы дорсоморфина, проварьировать длину и структуру алкильной цепочки, а также циклического амина. Все эти модификации являются незначительными изменениями в структуре дорсоморфина, однако их реализация позволит определить значимость отдельных структурных элементов молекулы для проявления целевой ингибирующей активности по отношению к АМФК.

# 2.4.2 Синтез производных, обеспечивающих варьирование положения атома азота и разворот фенильного фрагмента

Для варьирования положения атома азота в конечной структуре были соответствующие 3-пиридил-И 2-пиридил-замещенные получены аминопиразолы, синтез которых проводился аналогично Схеме 2.2 при использовании 3-пиридинкарбоновой (никотиновой) и 2-пиридинкарбоновой (пиколиновой) Небольшие кислот. отличия заключались только В характеристиках промежуточных продуктов, демонстрировали которые различную температуру плавления.

Дальнейшая В получении 6-бром-замещенных задача заключалась пиразоло[1,5-а]пиримидиновых производных. Для этого стадию циклизации проводили с броммалоновым альдегидом (R = H, Схема 2.7), предварительно полученным по методике, отраженной в [190, 193]. Чтобы ввести заместители в пиримидиновое кольцо, которые обеспечили бы поворот фенильного кольца вокруг С-С связи относительно гетероциклического ядра, на стадии циклизации использовали 3-бромацетилацетон (R = CH<sub>3</sub>, Схема 2.7), полученный прямым общих принципов бромированием ацетилацетона, исходя ИЗ получения α-галогенкарбонильных соединений.



Схема 2.7 – Синтез производных пиразоло[1,5-а]пиримидина с варьируемым положением атома азота и заместителями

Условия реакции циклизации использовались одинаковые, во всех случаях реакции проводились в среде этанол/уксусная кислота, при этом выходы продуктов реакции варьировались от 75 до 92%. Как правило, продукты не требовали специфической очистки, однако выделение 5,7-диметилзамещенных производных требовало большего времени в связи с меньшим выходом продуктов.

# 2.4.3 Синтез производных, обеспечивающих варьирование состава и ориентации аминоалкильного фрагмента

Для получения фрагмента «ГД» была применена синтетическая схема, использованная для получения алкильного фрагмента в рамках линейной схемы синтеза дорсоморфина, с добавлением еще одной стадии – О-алкилирование бромфенолов (Схема 2.8).



Схема 2.8 – Синтез арилалкильного фрагмента «ГД», обеспечивающего варьирование структуры аналогов дорсоморфина

Для создания серии аналогов дорсоморфина МЫ прежде всего рассматривали следующие варианты варьирования алкильной цепи, циклоаминового фрагмента и фенильного кольца, соответственно (Рисунок 2.5): использование в качестве гликолей (a) – этиленгликоль, 1,3-пропиленгликоль, 2,2-диметилпропан-1,3-диол, 1,1-бис(гидроксиметил)циклопропан; в качестве циклических аминов (б) – пиперидин, пирролидин, морфолин, *N*-метилпиперазин; в качестве бромфенолов (в) – 4-бромфенол, 3-бромфенол, 4-бром-2-метилфенол, 5-бром-2-метилфенол, 4-бром-2,6-диметилфенол. Дальнейшие исследования были направлены на оптимизацию предложенной схемы для быстрого и эффективного синтеза различных вариантов фрагмента «ГД».



Рисунок 2.5 – Реагенты, использованные для обеспечения варьирования структуры аналогов дорсоморфина

В качестве ацильной компоненты при реализации Схемы 2.8 (стадия I) мы рассмотрели не только бензойную кислоту, но и уксусную кислоту. Мы установили, что монобензоилирование гликолей имеет два несомненных плюса:

- высокий инкремент липофильности фенильной группы [194], что проявляется в низкой растворимости в воде; это помогает избавиться от избытка водорастворимого гликоля на стадии обработки реакционной смеси и легко отделить дибензоилированный продукт с помощью перегонки;

- достаточно большая разница в температурах кипения исходного гликоля и его моно- и дибензоилированного производных; это позволяет выделять монобензоилированный продукт вакуумной перегонкой при давлении 0,5–1 Па.

Однако продукты, полученные после третьей стадии синтеза (Схема 2.8), имели в большинстве случаев слишком высокую температуру кипения для успешной перегонки. При этом мы сознательно старались избегать флэшхроматографии на ранних стадиях синтеза для возможности потенциального масштабирования.

С нашей точки зрения, моноацетилирование должно было решить проблему высокой температуры кипения промежуточных продуктов. Ацетилированные гликоли перегонялись при существенно более низкой температуре, но без полного разделения моно- и диацетилированных субстратов. В то же время, низкий инкремент липофильности метильной группы делал моноацетильное производное водорастворимым, исключая возможность отделения избытка исходного гликоля водной промывкой. Таким образом, мы остановились на бензойной кислоте, которую в дальнейшем использовали в качестве ацильной компоненты.

Известно, что для нуклеофильного замещения (Схема 2.8, стадия III) бром является более предпочтительным, чем хлор. Мы получали бромпроизводные взаимодействием моноацильного производного с бромом в ацетонитриле в присутствии трифенилфосфина по методике, описанной в [195]. Нуклеофильное замещение галогена проводили в диметилформамиде с К<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в качестве основания, и в случае бромидов выходы достигали 84-92%, тогда как в случае хлоридов выходы были заметно ниже. Гидролиз сложных эфиров (стадия IV) осуществляли гидроксидом натрия в смеси вода/ТГФ, при этом выходы составляли 90-94%. Галогенирование аминоспиртов на пятой стадии синтеза проводили аналогично второй стадии. Завершающую стадию проводили по методике, использованной для третьей стадии, но с несколько меньшими выходами, при этом применение предварительно полученных фенолятов не привело к существенному повышению выхода реакции. По рассматриваемой были наработаны препаративных схеме В количествах три фрагмента (Рисунок 2.6). Однако, подобная стратегия синтеза является громоздкой и малопригодной для наработки большего количества вариантов с целью получения расширенной библиотеки соединений.



Рисунок 2.6 – Фрагменты «ГД», синтезированные по классической схеме

Для преодоления этого затруднения мы провели литературный поиск и выяснили, что можно исключить стадии галогенирования и осуществить прямую дегидратацию за счет реакции Мицунобу (Схема 2.9). Эта реакция была открыта как метод образования сложных эфиров с обращением конфигурации спиртов [196]. Движущим реагентом этой реакции является диизопропилазодикарбоксилат (ДИАД), представляющий собой диизопропиловый эфир азодикарбоновой кислоты. При этом данный метод вполне применим в разнообразных случаях дегидратации, в частности, для получения арил-алкиловых простых эфиров [197] и образования связи С–N [198].



Схема 2.9 – Синтетическая схема с использованием реакции Мицунобу

При классическом варианте проведения реакции Мицунобу (смешивание реагентов при 0°С, выдерживание при комнатной температуре) выход составил около 3% при времени реакции 36 ч, при этом ВЭЖХ анализ подтвердил низкую конверсию и отсутствие побочных реакций. Подбор условий привел к методике проведения реакции при 24-часовом кипячении в  $T\Gamma\Phi$  с триэтиламином в качестве основного катализатора [199], которая дала хорошие результаты даже в случае *N*-алкилирования (выход 74–86%). Конечно, существуют и другие эффективные методы аминирования спиртов [200], но в данном случае реакция Мицунобу имеет преимущества по простоте синтеза и доступности используемых реактивов.

Очистка продуктов не потребовала больших трудозатрат и осуществлялась пропусканием через слой силикагеля в системе гексан/этилацетат. Более высокая липофильность продуктов реакции Мицунобу по сравнению с исходными веществами позволила получать соединения удовлетворительной чистоты. Поскольку атака активированного спирта фенолятом на последней стадии реакции Мицунобу происходит по SN<sub>2</sub> механизму, синтез с участием стерически нагруженных орто-замещенных фенолов часто проходит с низкими выходами [201]. В нашем случае успешно прошел синтез не только с орто-замещенными фенолами. но ди-орто-замещенным фенолом. Таким образом, И с с

использованием разработанной схемы были наработаны и охарактеризованы еще шесть фрагментов (Рисунок 2.7).



Рисунок 2.7 – Фрагменты «ГД», синтезированные по схеме с использованием реакции Мицунобу

### 2.4.4 Сборка конечных соединений из синтезированных фрагментов

Образование С–С связи между синтезированными фрагментами для получения конечных аналогов дорсоморфина предполагалось проводить по методу Сузуки–Мияуры, для которого требуется функционализация одного из сочетаемых фрагментов. С точки зрения построения библиотеки соединений более целесообразным является функционализация билдинг-блока, варьируемого в меньшей степени. В нашем случае меньшее количество модификаций реализовано в 6-бром-3-пиридил-замещенном пиразоло[1,5-а]пиримидиновом фрагменте (Схема 2.10).



Схема 2.10 – Варианты сборки конечных молекул

Введение борной функции в 6-бром-3-пиридил-замещенные пиразоло[1,5-а]пиримидины проводили взаимодействием триметилбората с литиевыми производными пиразолопиримидинов, которые были получены обменной реакцией брома на литий с помощью н-бутиллития в ТГФ при температуре –78°С, при этом выходы составили 57–62%. Образование С–С связи осуществляли с помощью реакции Сузуки–Мияуры по методике, использованной нами ранее в рамках линейной схемы синтеза дорсоморфина. Таким образом, по данной схеме было синтезировано десять структур при использовании различных комбинаций сочетаемых фрагментов (соединения 1–10, Рисунок 2.8).



Рисунок 2.8 – Синтезированные структуры аналогов дорсоморфина
В случае 5,7-диметилзамещенного производного получить борную кислоту из пиразоло[1,5-а]пиримидиновой части нам не удалось. Поэтому синтез конечного соединения с 5,7-замещением в ядре осуществляли с предварительной функционализацией 1-(2-(4-бромфенокси)этил)пиперидина. Последующее использование в качестве катализатора стандартного Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> для образования C–C связи не привело к образованию детектируемых количеств целевого продукта. При этом применение каталитической системы Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>/S-Phos, предложенной C. Бухвальдом для стерически затрудненных случаев кросссочетания [202], показало удовлетворительные результаты и позволило получить соединение **11** (Рисунок 2.8).

Таким образом, проделанной работы была В ходе реализована конвергентная стратегия синтеза дорсоморфина, на основе которой впервые синтезированы его 11 структурных аналогов для дальнейшего изучения зависимости структура-активность. Синтезированная малая серия соединений отличается максимально возможной диверсификацией в рамках сфокусированной библиотеки соединений, что позволяет провести оценочное определение биологической активности для выбора дальнейшего направления исследований.

# 2.5 Компьютерное моделирование дорсоморфина и его аналогов

Использование инструментов и методов рационального дизайна является современным трендом при разработке новых лекарственных кандидатов. Несмотря на то, что в рамках данной работы перед нами не стояло задачи осуществить модификацию дорсоморфина с целью увеличить его активность и селективность по отношению к АМФК, тем не менее, мы решили создать виртуальную сфокусированную библиотеку близких аналогов дорсоморфина и смоделировать их взаимодействие с АМФК.

73

## 2.5.1 Создание виртуальной библиотеки соединений

Для создания виртуальной библиотеки мы использовали пять точек для варьирования структуры дорсоморфина, модификации которых реализуются с помощью использования соответствующих реагентов.

В данной работе мы варьировали:

1) положение атома азота в пиридиновом ядре за счет использования различных пиридинкарбоновых кислот – 3 варианта;

 поворот фенильного кольца за счет применения броммалонового альдегида или 3-бромацетилацетона – 2 варианта;

3) ориентацию алкильной цепочки и заместители в фенильном фрагменте за счет использования различных бромфенолов – 5 вариантов;

4) длину и состав алкильной цепи за счет использования различных гликолей – 4 варианта;

5) циклоаминовый фрагмент – 4 варианта.

Таким образом, максимальное возможное число конечных соединений, которые можно получить с использованием данных реагентов, 3·2·5·4·4 = 480. Все эти соединения легли в основу виртуальной библиотеки аналогов дорсоморфина. Подобная сфокусированная библиотека будет полезна при исследованиях и других мишеней, содержащих АТФ-связывающий сайт.

## 2.5.2 Скрининг соединений по АТФ-связывающему сайту

Для того, чтобы провести оценку соотношения «структура-активность» для уже синтезированных соединений, а также определить дальнейшие пути исследования было принято решение провести виртуальный скрининг созданной сфокусированной библиотеки соединений по белковой модели АМФК. Так как изначально мы говорили об аналогах дорсоморфина, то в качестве модели мы выбрали полноразмерную трехсубъединичную структуру АМФК в комплексе с дорсоморфином (модель PDB ID 7JHG). Референсным лигандом служил дорсоморфин, который также входил в библиотеку и подвергался скринингу.

Скрининг сфокусированной библиотеки проводили методом молекулярного докинга в режиме полужесткого докинга, когда белковая мишень считается жесткой, но при этом учитывается конформационная подвижность лиганда. По результатам расчетного эксперимента для каждого соединения из библиотеки были получены значения скоринговой функции, которая отражает энергетические характеристики его связывания с АТФ-связывающим сайтом АМФК. В нашем случае, в качестве скоринговой функции анализировался показатель Docking Score, который приравнивался к значению расчетной активности соединения. Так как Docking Score является энергетической функцией, то чем меньше значение, сильнее взаимодействие выше активность соединения. Значения тем И рассматриваемой скоринговой функции для синтезированных соединенийаналогов дорсоморфина приведены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Значения скоринговой функции Docking Score синтезированных аналогов дорсоморфина по результатам скрининга сфокусированной библиотеки соединений

Соединение	Шифр	Docking Score
Дорсоморфин	40111	-8,7
1	30111	-8,2
2	20111	-7,4
3	40112	-8,2
4	40113	-8,3
5	40114	-8,6
6	40121	-8,5
7	40231	-8,1
8	40341	-8,3
9	40411	-8,9
10	40511	-8,7
11	42111	-6,9

## 2.6 Исследование структура-активность

Для того, чтобы оценить вклад каждого структурного элемента дорсоморфина в ингибирующую активность по отношению к АМФК, все синтезированные соединения были протестированы в эксперименте *in vitro* с использованием рекомбинантного трехсубъединичного комплекса АМФК и SAMS-пептида [203], являющегося синтетическим субстратом АМФК. Данные по ингибирующей активности соединений 1–11, а также дорсоморфина приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Экспериментальная ингибирующая активность синтезированных соединений по отношению к АМФК. Дорсоморфин выступает в качестве положительного контроля

Соединение	Остаточная активность, %	
Дорсоморфин	4 ± 1	
1	$10 \pm 2$	
2	$29\pm5$	
3	$6\pm 2$	
4	$10\pm 2$	
5	$4\pm1$	
6	$6\pm 2$	
7	$10\pm 2$	
8	$10\pm 2$	
9	4 ± 1	
10	4 ± 1	
11	$25 \pm 4$	

Согласно полученным данным, можно сделать вывод, что положение азота в пиридиновом кольце является критическим для проявления активности. И расчетные, и экспериментальные результаты показали, что с перемещением атома азота из 4 в 3 и 2 положение активность существенно падает. Вероятно, в качестве скаффолда дорсоморфина следует рассматривать не пиразоло[1,5-а]пиримидин, а 3-(4-пиридил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Изменение угла поворота фенильного фрагмента также драматически сказывается на ингибирующей активности.

Следует также отметить, что введение дополнительного атома кислорода в случае использования морфолина, а также введение заместителей в алкильную цепочку не является перспективным в плане дальнейшей оптимизации структуры дорсоморфина. Для целей разработки более эффективного ингибирующего агента следует обратить внимание на более длинные алкильные цепочки, которые, по всей видимости, позволяют более благоприятно ориентировать циклоаминовый фрагмент, а также иные азот-содержащие циклоаминовые фрагменты. Перспективным является рассмотрение других замещенных пара- и метабромфенолов.

Если значения экспериментальной активности и расчетной активности синтезированных соединений нанести на график, то зависимость хорошо описывается линейной функцией (Рисунок 2.9). Это говорит о том, что при разработке более эффективных аналогов дорсоморфина с большой степенью достоверности можно использовать данные компьютерного моделирования.



Рисунок 2.9 – Корреляция данных по экспериментальной активности и расчетной активности синтезированных соединений

# ГЛАВА З ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

# 3.1 Химический синтез

## 3.1.1 Реактивы и оборудование

В работе использовали реагенты и растворители от отечественных и зарубежных производителей (Sigma-Aldrich, Fluka, Вектон). Перед применением растворители очищали и абсолютировали согласно стандартным методикам.

Прохождение реакций контролировали методом TCX на пластинках TLC Silica gel 60 F254 (Merck), детекция при УФ свете  $\lambda = 254$  нм. Разделение и очистку промежуточных продуктов и конечных веществ проводили методом флэш-хроматографии на флэш-хроматографе Isolera-4 (Biotage). В качестве колонок использовали картриджи Silica gel 60 (0.040–0.063 мм) (Merck).

Спектры ЯМР <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С регистрировали на приборе Bruker Avance III 400 (400 МГц) в ДМСО- $d_6$ , в качестве внутреннего стандарта использовали сигналы остаточных протонов <sup>1</sup>Н и ядер углерода <sup>13</sup>С дейтерированных растворителей.

Масс-спектры записывали на моноквадрупольном хромато-массспектрометре LCMS-2020 (Shimadzu) при ионизации электроспреем (ESI) в режиме детектирования положительных ионов, температура ионизационной камеры 200°С, напряжение ионизации 70 эВ.

#### 3.1.2 Синтез дорсоморфина и его производных по линейной схеме

Ниже приведены методики синтеза и характеристики соединений в рамках реализации линейной стратегии синтеза дорсоморфина и его аналогов.

Общая методика получения метилового эфира пиридинкарбоновых кислот. 50 г пиридинкарбоновой кислоты (0,41 моль) суспендировали в 300 мл безводного метанола. При перемешивании прикапывали 26 мл серной кислоты (0,49 моль) в течение 30 мин, при этом реакционная смесь гомогенизировалась. Полученный раствор кипятили с обратным холодильником 12 ч. По окончании реакции метанол отогнали при пониженном давлении, остаток вылили на 300 г

льда и сухим Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> довели pH до 8–9. Продукт экстрагировали 3×150 мл этилацетата, объединённые органические слои промыли 2×100 мл воды, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали при пониженном давлении. Метиловый эфир пиридинкарбоновой кислоты очищали перегонкой в вакууме при остаточном давлении 2,7 кПа.

Метиловый эфир 4-пиридинкарбоновой кислоты. Выход 92% (51 г), бесцветная жидкость, т. кип. 145°С (20 мм рт. ст.). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 8.67 (д, J = 6.1 Гц, 2H), 7.73 (д, J = 6.1 Гц, 2H), 3.85 (с, 3H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 165.47, 150.54, 137.14, 122.73, 52.60. Массспектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 138.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Метиловый эфир 3-пиридинкарбоновой кислоты. Выход 84% (47 г), бесцветная жидкость, при перегонке затвердевает, т. кип. 143°С (20 мм рт. ст.), т. пл. 47°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 9.21 (дд, J = 2.1, 0.9 Гц, 1Н), 8.77 (дд, J = 4.9, 1.7 Гц, 1Н), 8.30 (дт, J = 7.9, 1.9 Гц, 1Н), 7.40 (ддд, J = 8.0, 4.9, 0.9 Гц, 1Н), 3.94 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 165.77, 153.31, 150.82, 137.38, 126.23, 123.50, 52.58. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 138.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Метиловый эфир 2-пиридинкарбоновой кислоты. Выход 88% (49 г), бесцветная жидкость, т. кип. 142°С (20 мм рт. ст.). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 8.69 (дт, J = 4.8, 0.9 Гц, 1Н), 8.08 (дд, J = 7.9, 1.1 Гц, 1Н), 7.80 (тд, J= 7.8, 1.8 Гц, 1Н), 7.44 (ддд, J = 7.6, 4.7, 1.2 Гц, 1Н), 3.95 (с, 3Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 165.62, 149.75, 147.80, 137.20, 127.04, 125.18, 52.94. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 138.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения пиридинметанолов. К 20 мл безводного метанола добавили 0,2 г металлического натрия. После полного растворения натрия колбу поместили над ледяной баней и добавили 20 г метилового эфира пиридинкарбоновой кислоты (0,15 моль). При интенсивном перемешивании в реакционную смесь всыпали 11,4 г свежерастертого NaBH<sub>4</sub> (0,3 моль). Реакция восстановления имеет индукционный период и может протекать весьма энергично, при резком повышении температуры следует опустить колбу в

ледяную баню. Смесь перемешивали 3 ч при комнатной температуре, после чего добавили 150 мл метанола для гашения избытка NaBH<sub>4</sub>. Затем метанол отогнали досуха при пониженном давлении, прибавили 100 мл 20% HCl и нагревали при перемешивании в течение часа, после чего охладили и нейтрализовали сухим K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до pH 8–9. Полученную смесь солей, воды и отслоившегося пиридинметанола экстрагировали 3×100 мл этилацетата. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали при пониженном давлении. Пиридинметанол очищали перегонкой в вакууме при остаточном давлении 0,13 кПа.

*4-Пиридинметанол.* Выход 80% (13 г), бесцветная жидкость, при перегонке затвердевает, т. кип. 152°С (15 мм рт. ст.), т. пл. 54°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 8.39 (д, J = 6.1 Гц, 2H), 7.29 (д, J = 6.1 Гц, 2H), 5.48 (уш с, 1H), 4.71 (с, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ , м.д.: 151.84, 149.03, 121.38, 62.74. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 110.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*3-Пиридинметанол.* Выход 77% (12,4 г), бесцветная жидкость, т. кип. 144°С (15 мм рт. ст.). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 8.42 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.35 (дд, *J* = 4.9, 1.7 Гц, 1Н), 7.69 (дт, *J* = 7.8, 1.9 Гц, 1Н), 7.23 (дд, *J* = 7.8, 4.9 Гц, 1Н), 5.22 (с, 1Н), 4.65 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 148.04, 147.91, 137.35, 135.35, 123.72, 62.02. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 110.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*3-Пиридинметанол.* Выход 82% (13,2 г), бесцветная жидкость, т. кип. 140°С (15 мм рт. ст.), затвердевает при 12°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 8.49 (д, *J* = 4.8 Гц, 1Н), 7.66 (т, *J* = 7.7 Гц, 1Н), 7.29 (д, *J* = 7.8 Гц, 1Н), 7.17 (дд, *J* = 7.5, 5.0 Гц, 1Н), 4.80 (с, 1Н), 4.74 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м.д.: 159.60, 148.41, 137.04, 122.42, 120.87, 64.29. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 110.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения гидрохлоридов хлорметилпиридинов. К раствору 15 г пиридинметанола (0,14 моль) в 200 мл дихлорметана при перемешивании прибавляли по каплям 20 мл тионилхлорида (32,8 г, 0,28 моль) таким образом, чтобы температура смеси не превышала 30°С. По окончании

прибавления, реакционную смесь перемешивали 3 ч, после чего растворитель отгоняли досуха при пониженном давлении. К остатку прибавили 200 мл изопропанола, перемешивали суспензию в течение 30 мин, после чего отогнали растворитель досуха при пониженном давлении. Хлорметилпиридин гидрохлорид перекристаллизовали из изопропанола с применением активированного угля. Полученные таким образом продукты были стабильны и не содержали кислотных примесей.

4-(Хлорметил)пиридина гидрохлорид. Выход 87% (19,8 г), бесцветные кристаллы, т. пл. 170°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 8.95 (д, *J* = 6.7 Гц, 2Н), 8.10 (д, *J* = 6.6 Гц, 2Н), 5.10 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 156.19, 142.18, 126.31, 43.22.

3-(Хлорметил)пиридина гидрохлорид. Выход 77% (17,8 г), бесцветные кристаллы, т. пл. 146°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 9.06 (д, *J* = 2.0 Гц, 1Н), 8.91 (дд, *J* = 5.7, 1.4 Гц, 1Н), 8.64 (дт, *J* = 8.2, 1.7 Гц, 1Н), 8.07 (дд, *J* = 8.1, 5.6 Гц, 1Н), 5.01 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 145.49, 141.98, 141.84, 137.52, 127.24, 41.38.

*2-(Хлорметил)пиридина гидрохлорид*. Выход 82% (18,6 г), бесцветные кристаллы, т. пл. 131°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 8.83 (дд, *J* = 5.5, 1.0 Гц, 1Н), 8.42 (тд, *J* = 7.8, 1.7 Гц, 1Н), 8.02 (д, *J* = 7.9 Гц, 1Н), 7.87 (ддд, *J* = 7.6, 5.5, 1.2 Гц, 1Н), 5.08 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 152.33, 144.44, 144.08, 126.45, 126.04, 41.84.

Общая методика получения 2-пиридилацетонитрилов. 22 г NaCN (0,45 моль) поместили в фарфоровую ступку, залили 200 мл безводного ДМСО и перетирали образовавшийся сольват до получения равномерной суспензии, после чего перенесли в колбу. При перемешивании небольшими порциями добавили 30,8 г сухого гидрохлорида хлорметилпиридина (0,19 моль) таким образом, чтобы температура не превышала 40°C. По окончании прибавления смесь перемешивали 2 ч при 40°C, после чего вылили в раствор 100 г K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 14 г KOH в 500 мл воды. Полученную смесь экстрагировали 4×200 мл этилацетата, при этом в делительной воронке наблюдалось образование трех слоев. Объединённые органические слои

промыли 100 мл рассола, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали при пониженном давлении. 2-Пиридилацетонитрил выделяли двукратной перегонкой при пониженном давлении. Первая перегонка проводилась при остаточном давлении 0,5–0,6 кПа без разделения фракций. Вторая перегонка начиналась при 2,7 кПа, при этом перегонялся захваченный экстракцией ДМСО, затем давление снижали до 1,3 кПа и перегоняли 2-пиридилацетонитрил. Полученные 2-пиридилацетонитрилы достаточно стабильны в виде основания, хранятся при 4°C и для дальнейшего синтеза не требуют превращения в гидрохлориды.

2-(Пиридин-4-ил)ацетонитрил. Выход 86% (19,3 г), бесцветная жидкость, т. кип. 145°С (15 мм рт. ст.), затвердевает, т. пл. 45°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 8.59 (д, J = 6.1 Гц, 2H), 7.38 (д, J = 6.1 Гц, 2H), 4.15 (с, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 150.11, 140.44, 123.22, 118.13, 22.12. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 119.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

2-(Пиридин-З-ил)ацетонитрил. Выход 81% (18,2 г), бесцветная жидкость, т. кип. 135°С (10 мм рт. ст.). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 8.50 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.42 (дд, *J* = 4.8, 1.6 Гц, 1Н), 7.82 (дт, *J* = 7.8, 1.9 Гц, 1Н), 7.38 (дд, *J* = 7.8, 4.9 Гц, 1Н), 4.11 (с, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 149.47, 146.25, 137.77, 135.69, 123.94, 118.25, 25.34. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 119.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

2-(Пиридин-2-ил)ацетонитрил. Выход 85% (19 г), бесцветная жидкость, т. кип. 130°С (10 мм рт. ст.), затвердевает, т. пл. 27°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 8.56 (ддд, J = 4.8, 1.5, 0.8 Гц, 1Н), 7.82 (тд, J = 7.7, 1.1 Гц, 1Н), 7.42 (д, J = 7.8 Гц, 1Н), 7.35 (дд, J = 7.5, 4.9 Гц, 1Н), 4.21 (с, 1Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м.д.: 151.33, 149.56, 137.47, 122.93, 122.76, 118.34, 25.67. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 119.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения З-диметиламино-2-пиридил акрилонитрилов. Смесь 20 г 2-пиридилацетонитрила (0,17 моль), 26 г диметилацеталя диметилформамида (0,22 моль) и 150 мл ДМФА перемешивали при 70°С в течение 4 ч. По окончании реакции смесь отгоняли досуха при пониженном давлении и затем максимально досушивали при остаточном давлении 70 Па. Полученную массу перекристаллизовывали из минимального количества этилацетата. Выпавший осадок растворили в 800 мл этилацетата, отфильтровали на бумажном фильтре, затем пропустили через 10 см слой силикагеля. Отгонка растворителя позволила получить бледно желтую кристаллическую массу 3-диметиламино-2-пиридилакрилонитрила.

*3-(Диметиламино)-2-(пиридин-4-ил)акрилонитрил.* Выход 85% (25 г), светло желтые кристаллы, т. пл. 182°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 8.33 (д, *J* = 6.3 Гц, 2H), 7.79 (с, 1H), 7.26 (д, *J* = 6.3 Гц, 2H), 3.25 (с, 6H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 152.01, 149.45, 144.83, 119.84, 116.61, 71.74. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 174.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*3-(Диметиламино)-2-(пиридин-3-ил)акрилонитрил.* Выход 83% (24,4 г), светло желтые кристаллы, т. пл. 174°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 8.55 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.26 (дд, *J* = 4.7, 1.5 Гц, 1Н), 7.66 (ддд, *J* = 8.1, 2.6, 1.5 Гц, 1Н), 7.56 (с, 1Н), 7.29 (ддд, *J* = 8.2, 4.6, 0.7 Гц, 1Н), 3.21 (с, 6Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м.д.: 151.23, 145.14, 144.21, 132.81, 129.86, 123.43, 120.42, 70.22. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 174.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

3-(Диметиламино)-2-(пиридин-2-ил)акрилонитрил. Выход 80% (23,8 г), светло желтые кристаллы, т. пл. 169°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ), δ, м.д.: 8.34 (ддд, J = 4.8, 1.9, 0.9 Гц, 1Н), 8.07 (с, 1Н), 7.65 (ддд, J = 8.2, 7.4, 1.9 Гц, 1Н), 7.23 (дт, J = 8.1, 1.1 Гц, 1Н), 6.99 (ддд, J = 7.4, 4.8, 1.1 Гц, 1Н), 3.24 (с, 6Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ), δ, м.д.: 154.60, 152.17, 148.55, 137.03, 137.01, 120.63, 118.83, 116.60, 74.35. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 174.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения 4-пиридил-1*Н*-пиразол-5-аминов. Смесь 20 г 3-диметиламино-2-пиридилакрилонитрила (0,12 моль), 26 г гидробромида гидразина (0,23 моль), 200 мл этанола и 30 мл воды кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 6 ч. По окончании реакции из реакционной смеси отогнали этанол при пониженном давлении, добавили 300 мл воды. pH смеси довели до 8–9 с помощью сухого K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, после чего интенсивно перемешивали в течение 30 мин. Из смеси отогнали 200 мл воды при пониженном

давлении, остаток отфильтровали, осадок высушили на воздухе. Сырой 4пиридил-1*H*-пиразол-5-амин перекристаллизовали из этанола.

*4-(Пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-5-амин*. Выход 92% (17,4 г), светло коричневые кристаллы, т. пл. 185°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 11.94 (уш с, 1Н), 8.42 (д, *J* = 6.3 Гц, 1Н), 7.90 (уш с, 1Н), 7.49 (д, *J* = 6.3 Гц, 1Н), 5.18 (уш с, 2Н). Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>0тн</sub>, %): 161.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*4-(Пиридин-3-ил)-1Н-пиразол-5-амин*. Выход 88% (16,8 г), светло коричневые кристаллы, т. пл. 182°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 11.88 (уш с, 1Н), 8.75 (дд, *J* = 2.6, 0.8 Гц, 1Н), 8.31 (дд, *J* = 4.7, 1.5 Гц, 1Н), 7.91–7.84 (м, 2Н), 7.32 (ддд, *J* = 8.2, 4.6, 0.7 Гц, 1Н), 5.30 (уш с, 2Н). Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 161.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*4-(Пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-5-амин.* Выход 92% (17,4 г), светло коричневые кристаллы, т. пл. 190°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м.д.: 11.86 (уш с, 1Н), 8.82 (ддд, *J* = 4.8, 1.9, 1.0 Гц, 1Н), 8.11 (уш с, 1Н), 7.65 (тд, *J* = 7.7, 1.9 Гц, 1Н), 7.54 (дт, *J* = 7.9, 1.0 Гц, 1Н), 6.99 (ддд, *J* = 7.4, 4.8, 1.1 Гц, 1Н), 5.70 (уш с, 2Н). Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 161.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Методика получения броммалонового альдегида. 25 г 1,1,3,3тетраметоксипропана (0,152 моль), 25 мл воды и 1,1 мл концентрированной HCl перемешали до получения гомогенного раствора. Смесь охладили в ледяной бане и при перемешивании прибавили по каплям 7,8 мл брома (24,3 г, 0,152 моль) с такой скоростью, чтобы реакционная смесь успевала обесцвечиваться и ее температура не превышала 15°C. По окончании прибавления смесь упарили при 2,7 кПа и температуре бани 40°C. Полученную влажную кристаллическую массу промыли 50 мл ледяной воды и 20 мл холодного CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Продукт досушивали при пониженном давлении. Выход 17–20 г (73–86%).

**Методика получения 3-бромацетилацетона.** 15 г ацетилацетона (0,15 моль) и 5 мл концентрированной HCl смешали со 100 мл воды. Смесь охладили в ледяной бане и при перемешивании прибавили по каплям 7,7 мл брома (24 г, 0,15 моль) с такой скоростью, чтобы реакционная смесь успевала обесцвечиваться и ее температура не превышала 15°C. По окончании реакции к смеси добавили 200 мл

этилацетата, перемешивали 5 мин, органический слой отделили и промыли его до нейтральной реакции 10% раствором NaHCO<sub>3</sub>. Растворитель отогнали при пониженном давлении, полученный 3-бромацетилацетон применяли для дальнейшего синтеза без дополнительной очистки.

Общая методика получения 6-замещенных 3-пиридилпиразоло[1,5а]пиримидинов. 16 г 4-пиридил-1*H*-пиразол-5-амина (0,1 моль) и 0,1 моль дикарбонильного соединения растворили в смеси 150 мл уксусной кислоты и 150 мл этанола. Полученный раствор кипятили при перемешивании с обратным холодильником в течение 6 ч. Реакционную смесь отогнали досуха, залили 400 мл воды, добавили 20 г K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и перемешивали полученную суспензию 10 мин, осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством этанола. При необходимости продукт перекристаллизовывали из толуола.

6-(4-Метоксифенил)-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 80% (24,2 г), желтоватое кристаллическое вещество, т. пл. 215°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 9.52 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 9.12 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 8.96 (с, 1Н), 8.59 (д, J = 6.2 Гц, 2Н), 8.15 (д, J = 6.2 Гц, 2Н), 7.84 (д, J = 8.8 Гц, 2Н), 7.10 (д, J = 8.8 Гц, 2Н), 3.83 (с, 3Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 159.70, 150.79, 149.98, 143.84, 143.80, 139.28, 132.61, 128.28, 125.34, 122.16, 119.62, 114.72, 106.08, 55.33. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 303.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-Бром-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 90% (24,7 г), ярко желтые кристаллы, т. пл. 223°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.74 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.96 (с, 1Н), 8.84 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.60 (д, *J* = 6.2 Гц, 2Н), 8.10 (д, *J* = 6.2 Гц, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 151.86, 150.00, 144.09, 143.39, 138.84, 137.05, 119.81, 106.89, 104.59. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 275.0 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-Бром-3-(пиридин-3-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 86% (23,7 г), ярко желтые кристаллы, т. пл. 218°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.79 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 9.50 (дд, *J* = 2.3, 0.8, 1Н), 9.12 (ддд, *J* = 8.0, 2.3, 1.7, 1Н), 9.06 (с, 1Н), 8.89 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.78 (дд, *J* = 4.7, 1.6 Гц, 1Н), 8.08 (ддд, *J* = 8.0, 4.8, 0.9 Гц, 1Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 152.40, 143.99, 143.22, 140.05, 139.66, 139.13, 137.27, 130.73, 126.87, 105.01, 103.93. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 275.0 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-Бром-3-(пиридин-2-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 92% (25,3 г), ярко желтые кристаллы, т. пл. 215°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ), б, м. д.: 9.70 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 8.80 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 8.79 (с, 1Н), 8.60 (ддд, J = 4.7, 1.9, 0.9 Гц, 1Н), 8.36 (дт, J = 7.9, 1.1 Гц, 1Н), 7.87 (тд, J = 7.7, 1.9 Гц, 1Н), 7.25 (ддд, J = 7.5, 4.9, 1.2 Гц, 1Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ), б, м. д.: 151.44, 150.40, 149.43, 144.33, 143.05, 136.92, 136.82, 121.43, 120.47, 110.40, 104.12. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 275.0 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-Бром-5,7-диметил-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 82% (24,8 г), бледно желтые кристаллы, т. пл. 212°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 8.88 (с, 1Н), 8.56 (д, J = 6.2 Гц, 2Н), 8.11 (д, J = 6.2 Гц, 2Н), 2.89 (с, 3Н), 2.74 (с, 3Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 158.30, 149.92, 145.71, 143.25, 143.05, 139.22, 119.49, 107.47, 105.75, 26.36, 17.19. Массспектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 303.0 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения 6-арилзамещенных 3-пиридилпиразоло[1,5а]пиримидинов. В 80 мл ТГФ при перемешивании растворили 2 г 6галогензамещенного 3-пиридилпиразоло[1,5-а]пиримидина (7,3 ммоль), 0,05 г Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (0.043 ммоль, 0,5 мол. %), 1,66 г метоксифенилборной кислоты (11 ммоль). Полученную смесь перемешивали 30 мин в слабом токе аргона, затем прибавили раствор 5 г K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (36 ммоль) в 50 мл воды. Реакцию проводили при кипении с интенсивным перемешиванием в слабом токе аргона в течение 4 ч. По окончании реакции реакционную смесь отогнали досуха при пониженном давлении. Остаток перемешивали в 200 мл кипящего толуола с обратным холодильником, после чего отфильтровали горячим. Фильтрат осветлили 1 г силикагеля при кипении и перемешивании, вновь отфильтровали и довели объем раствора до 15 мл. Через сутки отфильтровали выпавший продукт.

6-(4-Метоксифенил)-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 87% (1,92 г), физико-химические и спектральные характеристики приведены выше. 6-(4-Метоксифенил)-3-(пиридин-3-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 84% (1,85 г), желтоватое кристаллическое вещество, т. пл. 165–166°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ), δ, м. д.: 9.48 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 9.36 (дд, J = 2.3, 0.8 Гц, 1Н), 9.07 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 8.88 (с, 1Н), 8.52 (ддд, J = 8.0, 2.3, 1.7 Гц, 1Н), 8.45 (дд, J = 4.7, 1.6 Гц, 1Н), 7.83 (д, J = 8.9, 2Н), 7.48 (ддд, J = 8.0, 4.8, 0.9 Гц, 1Н), 7.10 (д, J = 8.9, 2Н), 3.83 (с, 3Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ), δ, м. д.: 159.63, 150.23, 146.89, 146.68, 143.29, 142.95, 132.39, 132.30, 128.21, 128.03, 125.48, 123.78, 121.81, 114.70, 105.80, 55.32. Масс-спектр, m/z ( $I_{0TH}$ , %): 303.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(4-Метоксифенил)-3-(пиридин-2-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин. Выход 82% (1,81 г), желтоватое кристаллическое вещество, т. пл. 184–185°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 9.49 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 9.09 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 8.81 (с, 1Н), 8.60 (ддд, J = 4.9, 1.9, 1.0 Гц, 1Н), 8.46 (дт, J = 7.9, 1.1 Гц, 1Н), 7.87 (гд, J = 7.8, 1.9 Гц, 1Н), 7.83 (д, J = 8.8, 2Н), 7.23 (ддд, J = 7.5, 4.8, 1.2 Гц, 1Н), 7.10 (д, J = 8.8, 2Н), 3.82 (с, 3Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 159.63, 150.93, 150.44, 149.39, 144.07, 143.57, 136.74, 132.54, 128.23, 125.47, 121.79, 121.11, 120.30, 114.69, 109.66, 55.31. Масс-спектр, m/z ( $I_{\rm OTH}$ , %): 303.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения монобензоатов гликолей. К раствору 0,4 моль диола в 300 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, содержащему 55,6 мл трэтиламина (40,5 г, 0,4 моль) и охлажденному до 0°C, в течение 2 ч по каплям прибавляли раствор 28 г бензоилхлорида (0,2 моль) в 100 мл CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, поддерживая температуру не выше 5°C. По окончании прибавления раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Полученный раствор промывали водой  $2 \times 200$  мл, затем 200 мл 5% соляной кислоты, снова водой  $2 \times 200$  мл, раствором 5% NaHCO<sub>3</sub>, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток перегоняли при давлении 5 мбар.

*2-гиброксиэтилбензоат.* Выход 81% (26,9 г), прозрачная жидкость, т. пл. 45°С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м. д.: 8.05 (м, 2Н), 7.55 (тт, *J* = 7.4, 1.6

Гц, 1Н), 7.44 (м, 2Н), 4.46 (м, 2Н), 3.95 (м, 2Н), 2.21 (уш с, 1Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, CDCl<sub>3</sub>), δ, м. д.: 167.15, 133.34, 130.02, 129.84, 128.51, 66.88, 61.55.

Общая методика получения хлоридов. К раствору карбинола (0,1 моль) в 300 мл дихлорметана охлажденному до 4°С при перемешивании прибавляли по каплям раствор 14,3 мл тионилхлорида (23,4 г, 0,2 моль) с такой скоростью, чтобы температура смеси не превышала 15°С. По окончании прибавления смесь оставляли на 16 ч при комнатной температуре, после чего растворитель отгоняли досуха при пониженном давлении. К остатку прибавляли 100 мл 10% раствора NaHCO<sub>3</sub>, 150 мл этилацетата и перемешивали 20 мин. Слои разделяли, водный слой экстрагировали этилацетатом 2×150 мл. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отгоняли при пониженном давлении. Остаток перегоняли при давлении 5–10 мбар.

*2-Хлорэтилбензоат.* Выход 85% (15,7 г), прозрачная жидкость. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 8.01–7.97 (м, 2Н), 7.70–7.65 (м, 1Н), 7.57–7.52 (м, 2Н), 4.56–4.52 (м, 2Н), 3.99–3.95 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 165.44, 133.57, 129.31, 129.23, 128.83, 64.63, 42.69.

1-(*2-Хлорэтил*)*пиперидин*. Выход 76% (11,2 г), прозрачная жидкость. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 3.64 (т, *J* = 6.9 Гц, 1Н), 2.58 (т, *J* = 6.9 Гц, 1Н), 2.44–2.30 (м, 2Н), 1.55–1.42 (м, 2Н), 1.41–1.30 (м, 1Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 60.01, 53.87, 41.60, 25.51, 23.90.

Общая методика проведения щелочного гидролиза. В 150 мл ТГФ растворяли 0,05 моль бензоата при перемешивании и прибавляли раствор 8 г гидроксида натрия (0,2 моль) в 100 мл воды. Полученную смесь выдерживали 12 ч при 40°С и интенсивном перемешивании. По окончании реакции водный слой отделяли, а органический упаривали досуха при пониженном давлении, остаток растворяли в 200 мл этилацетата, фильтровали и пропускали через 10 см слой 400 силикагеля, дополнительно промывали силикагель ΜЛ этилацетата. Растворитель отгоняли при пониженном давлении. При необходимости перегоняли полученный продукт при 5-10 мбар.

2-(Пиперидин-1-ил)этан-1-ол. Выход 92% (6 г), прозрачная жидкость. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 4.32 (т, *J* = 5.2 Гц, 1Н), 3.46 (тд, *J* = 6.4, 5.1 Гц, 2Н), 2.36–2.27 (м, 6Н), 1.51–1.42 (м, 4Н), 1.40–1.30 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 61.12, 58.58, 54.55, 25.62, 24.09.

Общая методика деметилирования. К суспензии простого эфира (4,6 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при –50°С добавляли по каплям BBr<sub>3</sub> (1М в дихлорметане, 28 мл, 28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь концентрировали досуха, охлаждали на ледяной бане и разбавляли насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Полученный осадок фильтровали и сушили на воздухе, сырой продукт использовали без дальнейшей очистки.

Общая методика проведения нуклеофильного замещения. В 200 мл безводного ДМФА растворяли 0,05 моль галогенидов, 0,055 моль *O*- или *N*- нуклеофилов, тонко растертого  $K_2CO_3$  и перемешивали при 60°C в течение 16 ч. Раствор отфильтровывали от неорганического осадка и отгоняли ДМФА при пониженном давлении, остаток заливали 200 мл воды и экстрагировали 3×100 мл этилацетата, который дважды промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Продукт выделяли флэш-хроматографией с использованием в качестве элюента смеси гексан/этилацетат (6/1–9/1).

6-(4-(2-(Пиперидин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5а]пиримидин (дорсоморфин). Выход 18% (с двух стадий), бесцветное твердое вещество. Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.53 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 9.13 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.97 (с, 1Н), 8.59 (д, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 7.83 (д, *J* = 8.6 Гц, 2Н), 7.11 (д, *J* = 8.6 Гц, 2Н), 4.14 (т, *J* = 5.7 Гц, 2Н), 2.68 (т, *J* = 5.7 Гц, 2Н), 2.50–2.38 (м, 4Н), 1.55–1.46 (м, 4Н), 1.42–1.35 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.82, 150.60, 149.99, 143.84, 143.80, 139.27, 132.58, 128.27, 125.31, 122.17, 119.63, 115.28, 106.71, 65.80, 57.34, 54.44, 25.61, 23.96. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 400.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

#### 3.1.3 Синтез аналогов дорсоморфина по конвергентной схеме

Ниже приведены методики реакций и характеристики соединений в рамках реализации конвергентной стратегии синтеза аналогов дорсоморфина.

Общая методика получения бромидов. К раствору 13,1 г (0,05 моль) трифенилфосфина В 200 ΜЛ безводного ацетонитрила добавили при перемешивании 2,6 мл брома (8 г, 0,05 моль) и 0,05 моль карбинола при 0°С. Смесь перемешивали при комнатной температуре 30 мин, затем кипятили с обратным холодильником в течение 8 ч. По окончании реакции растворитель отгоняли досуха при пониженном давлении, добавляли к остатку 300 мл смеси гексан/этилацетат (6:1) и перемешивали в течение часа. Отфильтровывали раствор от выпавшего трифенилфосфин оксида, промывали 10% раствором NaHCO<sub>3</sub>, дважды водой, насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и пропускали через 10 см слой силикагеля, который затем промывали 500 мл той же смеси. После отгонки растворителя при пониженном давлении получали сырое бромпроизводное, пригодное для проведения дальнейших реакций. Выход 76-87%.

**Нуклеофильное замещение** проводили согласно методике, приведенной при описании линейной схемы синтеза дорсоморфина. Выходы составляли при получении продуктов из бромидов – 62–92%, из хлоридов – 45–64%.

*1-(2-(4-бромфенокси)этил)пиперидин.* Выход 33% (с шести стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 7.42 (д, *J* = 9.0 Гц, 2H), 6.90 (д, *J* = 9.0 Гц, 2H), 4.03 (т, *J* = 5.9 Гц, 2H), 2.62 (т, *J* = 5.9 Гц, 2H), 2.45–2.34 (м, 4H), 1.52–1.42 (м, 4H), 1.42–1.30 (м, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 157.79, 132.05, 116.77, 111.81, 65.89, 57.24, 54.38, 25.57, 23.92. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 284.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*1-(2-(4-бромфенокси)этил)пирролидин.* Выход 31% (с шести стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 7.41 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 6.90 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 4.36 (т, J = 5.7 Гц, 2H), 2.77 (т, J = 5.7 Гц, 2H), 2.54–2.49 (м, 2H), 1.69– 1.63 (м, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 157.83, 131.99, 116.78, 111.95, 63.84, 53.95, 53.84, 23.18. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{отн}}$ , %): 270.0 (100) [M + H]<sup>+</sup>. *1-(2-(4-бромфенокси)этил)морфолин*. Выход 33% (с шести стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 7.39 (д, *J* = 8.7 Гц, 2H), 6.89 (д, *J* = 8.7 Гц, 2H), 4.04 (t, *J* = 5.8 Гц, 2H), 3.65–3.58 (м, 4H), 2.72 (т, *J* = 5.8 Гц, 2H), 2.56–2.50 (м, 4H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.04, 132.28, 116.04, 112.90, 66.92, 66.21, 55.71, 53.35. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 286.0 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения соединений по реакции Мицунобу. В 100 мл ТГФ растворяли при перемешивании 0,05 моль замещенного фенола или вторичного амина, 0,055 моль спиртовой компоненты, 14,4 г (0,055 моль) трифенилфосфина, 5 г (0,05 моль) триэтиламина. Смесь охлаждали и при 4°С добавляли раствор 11,1 г (0,055 моль) диизопропилазодикарбоксилата в 30 мл ТГФ по каплям в течение 30 мин. После окончания прибавления снимали охлаждение и перемешивали еще 30 мин, затем кипятили с обратным холодильником при перемешивании в течение 24 ч. Растворитель отгоняли при пониженном давлении, добавляли к остатку 400 мл смеси гексан/этилацетат (6:1) и перемешивали в течение часа. Отфильтровывали раствор от выпавшего трифенилфосфин оксида, промывали 10% раствором NaHCO<sub>3</sub>, дважды водой, насыщенным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отгоняли растворитель при пониженном давлении. Растворяли остаток в смеси гексан/этилацетат (9:1–19:1) и пропускали через 10 см слой силикагеля, который затем промывали 500 мл той же смесью. После отгонки растворителя получали вязкое масло, представляющее собой продукт чистотой около 95%.

*1-(2-(4-бромфенокси)этил)-4-метилпиперазин.* Выход 46% (с четырех стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 7.39 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 6.89 (д, J = 8.9 Гц, 2H), 4.05 (т, J = 7.1 Гц, 2H), 2.80 (т, J = 7.1 Гц, 2H), 2.68–2.54 (м, 4H), 2.58 (с, 3H), 2.47–2.39 (м, 4H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 158.07, 132.27, 116.04, 112.95, 66.55, 55.52, 54.33, 52.72, 45.65. Масс-спектр, m/z ( $I_{0TH}$ , %): 299.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*1-(3-(4-бромфенокси)пропил)пиперидин*. Выход 49% (с четырех стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 7.39 (д, *J* = 7.5 Гц, 1Н), 6.92 (д, *J* = 7.6 Гц, 1Н), 3.99 (т, *J* = 7.1 Гц, 1Н), 2.53 (т, *J* = 7.1 Гц, 1Н), 2.52–2.46 (м, 4Н), 1.86 (п, *J* = 7.0 Гц, 2H), 1.64–1.55 (м, 4H), 1.48–1.41 (м, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.62, 132.46, 114.67, 112.86, 66.26, 53.57, 53.51, 28.04, 27.28, 22.94. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 298.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*1-(3-(3-бромфенокси)-2,2-диметилпропил)пиперидин*. Выход 42% (с четырех стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 7.29 (дт, *J* = 7.4, 1.6 Гц, 1H), 7.23 (т, *J* = 7.4 Гц, 1H), 7.16–7.11 (м, 1H), 6.97 (дт, *J* = 7.3, 1.5 Гц, 1H), 3.84 (с, 2H), 2.57–2.48 (м, 6H), 1.60–1.53 (м, 4H), 1.49–1.37 (м, 2H), 1.02 (с, 6H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.72, 130.88, 126.27, 122.54, 118.57, 115.30, 74.97, 63.82, 54.19, 35.95, 26.15, 24.38, 23.82. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 326.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*1-((1-((4-бром-2-метилфенокси)метил)циклопропил)метил)пиперидин.* Выход 40% (с четырех стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 7.28 (дд, J = 1.6, 0.6 Гц, 1Н), 7.15 (дд, J = 7.5, 1.5 Гц, 1Н), 6.81 (д, J = 7.5 Гц, 1Н), 3.70 (с, 2Н), 2.56–2.48 (м, 4Н), 2.45 (с, 2Н), 2.25 (с, 3Н), 1.91 (с, 4Н), 1.60–1.52 (м, 4Н), 1.46–1.38 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 157.21, 133.54, 130.46, 128.50, 114.51, 114.05, 75.28, 62.86, 54.22, 26.10, 24.39, 22.48, 16.00, 13.25. Масс-спектр, *m/z* ( $I_{\text{отн}}$ , %): 338.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*1-(2-(5-бром-2-метилфенокси)этил)пиперидин*. Выход 41% (с четырех стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 7.35 (дд, *J* = 7.5, 1.4 Гц, 1H), 7.21 (дк, *J* = 7.5, 1.0 Гц, 1H), 6.97 (д, *J* = 1.5 Гц, 1H), 4.04 (т, *J* = 5.8 Гц, 2H), 2.98 (т, *J* = 5.8 Гц, 2H), 2.50–2.46 (м, 4H), 2.21 (д, *J* = 1.0 Гц, 3H), 1.60–1.52 (м, 4H), 1.48–1.39 (м, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 157.29, 130.39, 126.00, 123.97, 120.05, 116.44, 66.37, 54.88, 54.40, 23.80, 23.01, 15.83. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 298.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

*1-(2-(4-бром-2,6-диметилфенокси)этил)пиперидин*. Выход 39% (с четырех стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м. д.: 7.24 (с, 2H), 4.02 (т, *J* = 5.8 Гц, 2H), 2.63 (т, *J* = 5.8 Гц, 2H), 2.45–2.34 (м, 4H), 2.21 (с, 6H), 1.52–1.42 (м, 4H), 1.42–1.31 (м, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ , м. д.: 154.18, 131.34, 129.19, 115.05, 67.84, 54.88, 54.42, 23.77, 23.00, 15.98. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 312.1 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

Общая методика получения арил-, гетероарил борных кислот. В высушенную колбу, продутую аргоном, загружали 40 мл ТГФ и 10 ммоль арилбромидов. Полученный раствор охлаждали до –78°С, по каплям добавляли 10 мл 1М раствора н-BuLi в гексане и перемешивали 2 ч при температуре -78°С. Затем добавляли 0,98 мл (11 ммоль) триметилбората в 10 мл ТГФ и перемешивали в течение часа при -78°С. После нагревания до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли 20 мл воды, добавляли 10 мл насыщенного раствора NH<sub>4</sub>Cl и перемешивали в течение часа. Затем растворитель отгоняли досуха при пониженном давлении, остаток экстрагировали этилацетатом. Полученный раствор сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и полностью упаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в 10 мл этилацетата и высаживали продукт добавлением гексана. Полученное масло пригодно для проведения кросссочетания по Сузуки-Мияуре. При необходимости продукт очищали перекристаллизацией из смеси гексан-этилацетат без идентификации.

Общая методика получения 6-арилзамещенных 3-пиридилпиразоло[1,5а]пиримидинов. В 100 мл ТГФ растворяли при перемешивании 10 ммоль замещенного арилбромида, 0,05 г Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (0,043 ммоль, 0,3 мол%) и 3,1 г 3пиридилпиразоло[1,5-а]пиримидин-6-ил борной кислоты (13 ммоль). Полученную смесь перемешивали 30 мин в слабом токе аргона, затем прибавляли раствор 5 г  $K_2CO_3$  (36 ммоль) в 50 мл воды. Реакцию проводили при кипении и интенсивном перемешивании в слабом токе аргона в течение 4 ч. По окончании реакции растворитель отгоняли досуха при пониженном давлении. Остаток перемешивали в 200 мл кипящего бутилацетата, после чего отфильтровали горячим. Фильтрат осветляли 2 г силикагеля при кипении и перемешивании, вновь отфильтровали и доводили объем раствора до 30 мл. Через 16 ч отфильтровали выпавший осадок.

Общая методика получения 6-арил-5,7-диметилзамещенных 3пиридилпиразоло[1,5-а]пиримидинов. В 120 мл толуола при перемешивании растворили 0,04 г Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,044 ммоль, 0,66 мол. %) и 0,08 г 2дициклогексилфосфино-2',6'-диметоксибифенила (Sphos, 0,195 ммоль). Раствор перемешивали в течение 30 мин в небольшом токе аргона. К реакционной смеси прибавили 2 г 6-галоген-5,7-диметилзамещенного 3-пиридилпиразоло[1,5а]пиримидина (6,6 ммоль), борной кислоты (11 ммоль) и 6 г Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (18,4 ммоль). Реакцию проводили при 100°C с интенсивным перемешиванием в слабом токе аргона в течение 16 ч. По окончании реакции объем толуола довели до 200 мл, довели до кипения и отфильтровали горячим. Фильтрат осветлили 1 г силикагеля при кипении и перемешивании, вновь отфильтровали и довели объем раствора до 15 мл. Через сутки отфильтровали выпавший продукт.

6-(4-(2-(Пиперидин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-3-ил)пиразоло[1,5а]пиримидин (1). Выход 49% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $<math>d_6$ ), б, м. д.: 9.50 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 9.39 (д, J = 2.3, 0.8 Гц, 1Н), 9.07 (д, J = 2.3 Гц, 1Н), 8.90 (с, 1Н), 8.55 (ддд, J = 8.0, 2.3, 1.7 Гц, 1Н), 8.46 (дд, J = 4.7, 1.6 Гц, 1Н), 7.83 (д, J = 8.7 Гц,) 7.47 (ддд, J = 8.0, 4.8, 0.9 Гц, 1Н), 7.10 (д, J = 8.7 Гц, 2Н), 4.14 (т, J = 5.6 Гц, 2Н), 2.68 (т, J = 5.6 Гц, 2Н), 2.51–2.38 (м, 4Н), 1.56–1.45 (м, 4Н), 1.42–1.36 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ), б, м. д.: 159.46, 148.96, 143.82, 139.14, 137.76, 133.10, 132.57, 131.10, 130.35, 129.96, 129.59, 124.11, 113.58, 110.34, 66.23, 54.87, 54.27, 23.71, 23.11. Масс-спектр, m/z ( $I_{0тн}$ , %): 400.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(4-(2-(Пиперидин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-2-ил)пиразоло[1,5а]пиримидин (2). Выход 48% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСОd<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.50 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 9.10 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 8.82 (с, 1Н), 8.61 (ддд, J = 4.9, 1.8, 1.0 Гц, 1Н), 8.48 (дт, J = 7.7, 1.1 Гц, 1Н), 7.88 (тд, J = 7.7, 1.8 Гц, 1Н), 7.82 (д, J = 8.7 Гц, 1Н), 7.24 (ддд, J = 7.6, 4.8, 1.2 Гц, 1Н), 7.10 (д, J = 8.7 Гц, 2Н), 4.14 (т, J = 5.6 Гц, 2Н), 2.67 (т, J = 5.6 Гц, 2Н), 2.50–2.37 (м, 4Н), 1.57–1.45 (м, 4Н), 1.43–1.35 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.90, 150.93, 150.44, 149.39, 144.06, 143.55, 136.75, 132.54, 128.22, 125.42, 121.80, 121.11, 120.31, 115.26, 109.65, 65.79, 57.34, 54.43, 25.60, 23.95. Масс-спектр, *m*/*z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 400.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

3-(Пиридин-4-ил)-6-(4-(2-(пирролидин-1-ил)этокси)фенил)пиразоло[1,5а]пиримидин (**3**). Выход 50% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСОd<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.52 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 9.12 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.98 (с, 1Н), 8.59 (д, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 7.83 (д, J = 8.7 Гц, 2Н), 7.11 (д, J = 8.7 Гц, 2Н), 4.20 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.68 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.55–2.50 (м, 4Н), 1.70–1.65 (м, 4Н), 1.42–1.35 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 158.82, 150.60, 149.99, 143.84, 143.80, 139.27, 132.58, 128.27, 125.31, 122.17, 119.63, 115.28, 106.71, 63.84, 53.95, 53.84, 23.18. Масс-спектр, m/z ( $I_{\text{огн}}$ , %): 386.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

4-(2-(4-(3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин-6ил)фенокси)этил)морфолин (4). Выход 46% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ), б, м. д.: 9.54 (д, J = 2.4 Гц, 1Н), 9.15 (д, J = 2.4 Гц, 1Н), 8.98 (с, 1Н), 8.59 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 7.83 (д, J = 8.6 Гц, 2Н), 7.11 (д, J = 8.6 Гц, 2Н), 4.04 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 3.65–3.58 (м, 4Н), 2.68 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.55–2.50 (м, 4Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ), б, м. д.: 158.85, 150.61, 150.00, 143.84, 143.80, 139.27, 132.59, 128.27, 125.31, 122.18, 119.65, 115.28, 106.71, 66.93, 66.20, 55.71, 53.35. Масс-спектр, m/z ( $I_{оттн}$ , %): 402.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(4-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-4-

ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин (5). Выход 50% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.53 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 9.13 (д, *J* = 2.2 Гц, 1Н), 8.97 (с, 1Н), 8.59 (д, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 7.83 (д, *J* = 8.6 Гц, 2Н), 7.11 (д, *J* = 8.6 Гц, 2Н), 4.15 (т, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 2.69 (т, *J* = 5.8 Гц, 2Н), 2.66–2.52 (м, 4Н), 2.59 (с, 3Н), 2.45–2.37 (м, 4Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.72, 150.61, 149.98, 143.84, 143.80, 139.27, 132.58, 128.27, 125.31, 122.17, 119.63, 115.28, 106.71, 66.65, 55.42, 54.35, 52.72, 45.65. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 415.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(4-(3-(пиперидин-1-ил)пропокси)фенил)-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5а]пиримидин (6). Выход 48% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСОd<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.53 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 9.13 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 8.97 (с, 1Н), 8.59 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 7.83 (д, J = 8.6 Гц, 2Н), 7.11 (д, J = 8.6 Гц, 2Н), 4.14 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.65 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.53–2.47 (м, 4Н), 1.86 (п, J = 5.7 Гц, 2Н), 1.64–1.55 (м, 4Н), 1.48–1.41 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.82, 150.60, 149.99, 143.84, 143.80, 139.27, 132.58, 128.27, 125.31, 122.17, 119.63, 115.28, 106.71, 65.26, 54.57, 54.52, 28.05, 27.28, 22.94. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 414.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(3-(2,2-диметил-3-(пиперидин-1-ил)пропокси) фенил)-3-(пиридин-4ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин (7). Выход 49% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н $(400 МГц, ДМСО-<math>d_6$ ), δ, м. д.: 9.52 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 9.13 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 8.96 (с, 1Н), 8.60 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 7.30 (дт, J = 7.5, 1.6 Гц, 1Н), 7.23 (т, J = 7.4 Гц, 1Н), 7.17–7.10 (м, 1Н), 6.97 (дт, J = 7.4, 1.6 Гц, 1Н), 3.84 (с, 2Н), 2.53–2.47 (м, 6Н), 1.64–1.55 (м, 4Н), 1.48–1.41 (м, 2Н), 1.02 (с, 6Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ), δ, м. д.: 159.68, 149.41, 148.74, 145.15, 142.04, 137.02, 136.48, 132.33, 129.91, 129.32, 120.75, 120.36, 117.20, 115.47, 111.39, 75.65, 63.77, 54.36, 35.79, 26.06, 24.65, 23.65. Масс-спектр, m/z ( $I_{отн}$ , %): 442.3 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(3-метил-4-((1-(пиперидин-1-илметил)циклопропил)метокси)фенил)-3-(пиридин-4-ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин (8). Выход 45% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 9.53 (д, *J* = 2.2 Гц, 1H), 9.13 (д, *J* = 2.2 Гц, 1H), 8.97 (с, 1H), 8.59 (д, *J* = 5.8 Гц, 2H), 8.16 (д, *J* = 5.8 Гц, 2H), 7.28 (дд, *J* = 1.6, 0.6 Гц, 1H), 7.15 (дд, *J* = 7.5, 1.5 Гц, 1H), 6.81 (д, *J* = 7.5 Гц, 1H), 3.71 (с, 2H), 2.50– 2.38 (м, 6H), 2.25 (с, 3H), 1.91 (с, 4H), 1.55–1.46 (м, 4H), 1.42–1.35 (м, 2H). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.28, 149.50, 148.87, 144.08, 142.04, 137.00, 133.10, 132.56, 129.58, 128.17, 128.10, 126.30, 120.36, 111.39, 74.37, 63.08, 54.39, 26.03, 24.66, 22.50, 15.47, 13.58. Масс-спектр, *m*/*z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 454.3 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(4-метил-3-(2-(пиперидин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-4ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин (9). Выход 47% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 9.52 (д, J = 2.0 Гц, 1Н), 9.12 (д, J = 2.0 Гц, 1Н), 8.97 (с, 1Н), 8.59 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 7.35 (дд, J = 7.5, 1.4 Гц, 1Н), 7.21 (дк, J = 7.5, 1.0 Гц, 1Н), 6.97 (д, J = 1.5 Гц, 1Н), 4.14 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.68 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.50–2.38 (м, 4Н), 2.21 (д, J = 1.0 Гц, 3Н), 1.55–1.46 (м, 4Н), 1.42– 1.35 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 158.82, 150.60, 149.99, 143.84, 143.80, 139.27, 135.07, 132.24, 129.74, 128.93, 127.98, 122.17, 119.63, 115.28, 106.71, 65.80, 57.34, 54.44, 25.61, 23.96, 15.83. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 414.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

6-(3,5-диметил-4-(2-(пиперидин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-4ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин (10). Выход 50% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н $(400 МГц, ДМСО-<math>d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 9.53 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 9.13 (д, J = 2.2 Гц, 1Н), 8.97 (с, 1Н), 8.59 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 8.16 (д, J = 5.8 Гц, 2Н), 7.49 (с, 4Н), 4.14 (т, J = 5.7Гц, 2Н), 2.68 (т, J = 5.7 Гц, 2Н), 2.50–2.38 (м, 4Н), 2.22 (с, 6Н), 1.55–1.46 (м, 4Н), 1.42–1.35 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$ , м. д.: 158.65, 149.50, 148.68, 144.11, 142.07, 136.83, 132.95, 132.15, 129.81, 129.44, 127.79, 121.65, 119.63, 115.28, 106.71, 65.80, 57.34, 54.44, 25.61, 23.96, 15.37. Масс-спектр, m/z( $I_{отн}$ , %): 428.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

5,7-диметил-6-(4-(2-(пиперидин-1-ил)этокси)фенил)-3-(пиридин-4ил)пиразоло[1,5-а]пиримидин (11). Выход 35% (с двух стадий). Спектр ЯМР <sup>1</sup>Н (400 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>), δ, м. д.: 8.90 (с, 1Н), 8.60 (д, *J* = 5.7 Гц, 2Н), 8.16 (д, *J* = 5.7 Гц, 2Н), 7.83 (д, *J* = 8.6 Гц, 2Н), 7.11 (д, *J* = 8.6 Гц, 2Н), 4.14 (т, *J* = 5.7 Гц, 2Н), 2.89 (с, 3Н), 2.74 (с, 3Н), 2.68 (т, *J* = 5.7 Гц, 2Н), 2.50–2.38 (м, 4Н), 1.55–1.46 (м, 4Н), 1.42–1.35 (м, 2Н). Спектр ЯМР <sup>13</sup>С (101 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>), δ, м. д.: 158.35, 150.60, 149.99, 143.84, 143.80, 140.76, 132.58, 128.27, 126.93, 122.17, 119.63, 115.28, 106.71, 65.80, 57.34, 54.44, 26.36, 25.61, 23.96, 17.19. Масс-спектр, *m/z* (*I*<sub>отн</sub>, %): 428.2 (100) [M + H]<sup>+</sup>.

## 3.2 Расчетные методы

Формирование виртуальной библиотеки соединений осуществляли с помощью программы ChemDraw (CambridgeSoft). Для идентификации соединений вводили следующую систему кодировки: XXXXX, где каждая позиция отражает рассмотренную в работе точку модификации структуры дорсоморфина.

Позиция 1 отражает положение атома азота в пиридиновом фрагмента; может принимать значения 4 (структуры на основе изоникотиновой кислоты), 3

(структуры на основе никотиновой кислоты) и 2 (структуры на основе пиколиновой кислоты).

Позиция 2 отражает наличие заместителей в пиразоло[1,5-а]пиримидиновом ядре; может принимать значения 0 (нет заместителей) и 2 (5,7-диметил).

Позиция 3 отражает использованный при синтезе фенол; может принимать значения 1 (4-бромфенол), 2 (3-бромфенол), 3 (4-бром-2-метилфенол), 4 (5-бром-2-метилфенол) и 5 (4-бром-2,6-диметилфенол).

Позиция 4 отражает использованный при синтезе диол; может принимать значения 1 (этиленгликоль), 2 (1,3-пропиленгликоль), 3 (2,2-диметилпропан-1,3диол) и 4 (1,1-бис(гидроксиметил)циклопропан).

Позиция 3 отражает циклический амин; может принимать значения 1 (пиперидин), 2 (пирролидин), 3 (морфолин) и 4 (*N*-метилпиперазин).

Таким образом, согласно введенной кодировке соединений дорсоморфин обозначается кодом 40111. Нарисованные структуры конвертировали в формат .sd с помощью интерфейса Maestro (Schrodinger).

Вычислительные эксперименты проводили с использованием пакета программ Small-Molecule Drug Discovery Suite (Schrodinger). Скрининговое исследование проводили на предварительно подготовленной белковой модели АМФК в комплексе с дорсоморфином (модель PDB ID 7JHG). Для подготовки модели использовали встроенный инструмент Protein Wizard. В качестве референсного лиганда для определения области докинга использовали дорсоморфин, который затем удаляли из модели.

Генерацию трехмерных структур соединений из виртуальной библиотеки проводили с помощью программы LigPrep в силовом поле OPLS3e при генерации возможных состояний при pH 7±2 с использованием программы Epic. Таким образом были подготовлены 852 структуры для дальнейшего исследования взаимодействия с рассматриваемым сайтом связывания.

Процедуру скрининга методом молекулярного докинга проводили в режиме SP (standard precision) с учетом конформационной подвижности лиганда. Результатом докинга стал набор укладок лигандов в рассматриваемом сайте связывания. Для каждого синтезированного соединения были импортированы минимальные значения скоринговой функции Docking Score, которая рассматривалась в качестве расчетной активности.

## 3.3 Биологические исследования

Все синтезированные в работе соединения испытывались в виде гидрохлоридов при конечной концентрации 2,5 мкМ согласно используемому киназному протоколу.

Исследование проводили в 96-луночных планшетах (конечный объем 20 мкл), буфер для анализа содержал 40 мМ Трис, pH = 7,5, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мг/мл БСА и 50 мкМ ДТТ. В каждую лунку добавляли 4 мкл исследуемого соединения (конечная концентрация ДМСО не превышала 1%), затем 8 мкл  $AM\Phi K\alpha 1/\beta 1/\gamma 1$ (10 нг), после инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре добавляли 8 мкл АТФ (конечная концентрация 20 мкМ) и SAMS-пептид (0,2 мкг/мкл). Планшеты инкубировали 60 мин при комнатной температуре, затем добавляли реагент ADP-Glo<sup>™</sup> (20 мкл) и продолжали инкубацию в течение еще 40 мин при комнатной температуре. После инкубации добавляли детектирующий киназный агент (40 мкл) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Люминесценцию регистрировали с помощью мультимодального ридера CLARIOstar (BMG Labtechnologies). Ингибирующую активность рассчитывали на основе максимальной активности, измеренной в отсутствие ингибитора.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения исследования был разработан синтетический подход, позволяющий с использованием конвергентной стратегии синтеза получать дорсоморфин и его близкие структурные аналоги в количествах, достаточных для дальнейших биологических испытаний. Такие модифицированные соединения могут быть использованы для рационального дизайна новых селективных АТФконкурентных ингибиторов АМФК, а также других киназных мишеней.

1. Установлено, что линейная стратегия не является оптимальной при синтезе дорсоморфина и его аналогов. Была разработана синтетическая схема, позволяющая нарабатывать конечные соединения путем сочетания двух билдингблоков. Предложенная конвергентная схема является оптимальной для наработки сфокусированной библиотеки соединений.

2. Определены пять основных точек модификации молекулы дорсоморфина, которые позволили оценить вклад основных структурных элементов в ингибирующую активность по отношению к АМФК.

3. Показано, что предложенная конвергентная схема синтеза позволяет реализовать все рассматриваемые в работе модификации. Дальнейшая оптимизация схемы позволила существенно упростить синтез с использованием неклассической реакции Мицунобу.

4. Синтезирована серия аналогов дорсоморфина. Все полученные соединения были исследованы в *in vitro* эксперименте по ингибированию активности АМФК.

5. По результатам анализа полученных данных определены ключевые структурные фрагменты дорсоморфина, определяющие ингибирующую активность. Показана возможность применения рационального дизайна при разработке ингибиторов АМФК, а также определены дальнейшие направления исследований.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АДФ аденозиндифосфат
- АМФ аденозинмонофосфат
- АМФК АМФ-активируемая протеинкиназа
- АТФ аденозинтрифосфат
- ДМСО диметилсульфоксид
- ДМФА диметилформамид
- НАД никотинамидадениндинуклеотид
- $T\Gamma\Phi-$ тетрагидрофуран
- ТСХ тонкослойная хроматография на силикагеле
- ЯМР ядерный магнитный резонанс
- ACC acetyl-CoA, ацетил-КоА карбоксилаза
- AICAR 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибозид
- AID autoinhibitory domain, автоингибиторный домен
- CBS цистатионин-β-синтаза
- ESI electrospray ionization, ионизация электроспреем
- FDA U.S. Food and Drug Administration, Управление по контролю качества

пищевых продуктов и лекарственных средств

- KD kinase domain, киназный домен
- LKB1 liver kinase B1, киназа печени B1
- PDB Protein Data Bank, база данных белковых структур (www.rcsb.org/)

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Slivko-Koltchik, G. A. Are there gap junctions without connexins or pannexins? / G. A. Slivko-Koltchik, V. P. Kuznetsov, Y. V. Panchin // BMC Evolutionary Biology. – 2019. – Vol. 19. – P. 5–12.

2. Krauss, G. Biochemistry of signal transduction and regulation / G. Krauss. – WILEY-VCH: Weinheim, 2003. – 541 p.

3. Role of protein phosphorylation in cell signaling, disease, and the intervention therapy / K. Pang, W. Wang, J.-X. Qin [et al.] // Medicine Communications. – 2022. – Vol. 3. – P. e175.

4. Burnett, G. The enzymatic phosphorylation of proteins / G. Burnett,
E. P. Kennedy // Journal of Biological Chemistry. -1954. - Vol. 211. - P. 969–980.

5. Lindberg, I. Posttranslational modifications: key players in health and disease /
I. Lindberg, J. R. Peinado // Encyclopedia of Cell Biology. – 2016. – P. 84–90.

6. Arena, S. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer /
S. Arena, S. Benvenuti, A. Bardelli // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. –
Vol. 62. – P. 2092–2099.

7. Denhardt, D. T. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling /
D. T. Denhardt // Biochemical Journal. – 1996. – Vol. 318. – Iss. 3. – P. 729–747.

8. Rikova, K. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer / K. Rikova, A. Guo, Q. Zeng [et al.] // Cell. – 2007. – V. 131. – Iss. 6. – P. 1190–1203.

9. Saltiel, A. R. Insulin signaling in health and disease / A. R. Saltiel // Journal of Clinical Investigation. – 2021. – Vol. 131. – Iss. 1. – P. e142241.

10. Chen, Y. Changes of protein phosphorylation are associated with synaptic functions during the early stage of Alzheimer's disease / Y. Chen, J. Xu, X. Zhou [et al.] // ACS Chemical Neuroscience. –2019. – Vol. 10. – P. 3986–3996.

11. Молекулярно-генетические механизмы сигнального каскада RAS-RAF-MEK-ERK, связанные с развитием опухолевого процесса и назначением таргетных препаратов при колоректальном раке / А. Н.Тороповский, О. Н.Павлова, Д. А. Викторов, А. Г. Никитин // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье. – 2021. – Т. 4. – С. 25–35.

12. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy /
F. Liu, X. Yang, M. Geng, M. Huang // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2018. – Vol. 8.
– Iss. 4. – P. 552–562.

13. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling / T. Hunter // Cell. – 1995. – Vol. 80. – Iss. 2. – P. 225–236.

14. Identification and classification of small molecule kinases: insights into substrate recognition and specificity / K. Oruganty, E. E.Talevich, A. F.Neuwald, N. Kannan // BMC Evolutionary Biology. – 2016. – Vol. 16. – P. 7–21.

15. A subcellular map of the human kinome / H. Zhang, X. Cao, M. Tang [et al.] // eLife. – 2021. – P. 10:e64943.

16. Kennelly, P. Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective / P. Kennelly // FEMS microbiology letters. -2002. - Vol. 206. - Iss. 1. - P. 1-8.

17. Besant, P.G. Mammalian protein histidine kinases / P. G. Besant, E. Tan,
P. V. Attwood // The international journal of biochemistry & cell biology. – 2003. –
Vol. 35. – Iss. 3. – P. 297–309.

18. Viola, R. E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis / R. E. Viola // Accounts of Chemical Research. – 2001. – Vol. 34. – Iss. 5. – P. 339– 349.

19. Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis / S. Manuse, A. Fleurie, L. Zucchini [et al.] // FEMS microbiology reviews. – 2015. – Vol. 40. – Iss. 1. – P. 41–56.

20. Pereira, S.F.F. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria / S. F. F. Pereira, L. Goss, J. Dworkin // Microbiology and molecular biology reviews. – 2011. – Vol. 75. – Iss. 1. – P. 192–212.

21. Blume-Jensen, P. Oncogenic kinase signaling / P. Blume-Jensen, T. Hunter // Nature. – 2001. – Vol. 411. – Iss. 6835. – P. 355–365.

22. Thiriet, M. Dual-specificity protein kinases in intracellular signaling mediators in the circulatory and ventilatory systems / M. Thiriet // Biomathematical and biomechanical modeling of the circulatory and ventilatory systems. – 2013. – Vol. 4. – P. 379–386.

23. Hubbard, S. R. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling / S. R. Hubbard, W. T. Miller // Current Opinion in Cell Biology. – 2007. – Vol. 19. – Iss. 2. – P. 117–123.

24. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch / M. Huse, T. W. Muir, L. Xu [et al.] // Molecular Cell. – 2001. – Vol. 8. – Iss. 3. – P. 671–682.

25. Kennelly, P. J. Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry / P. J. Kennelly // Biochemical Journal. – 2003. – Vol. 370. – Iss. 2. – P. 373–389.

26. Hunter, T. Discovering the first tyrosine kinase / T. Hunter // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112. – Iss. 26. – P. 7877–7882.

27. An overview of kinase downregulators and recent advances in discovery approaches / Wang B., Wu H., Hu C. [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2021. – Vol.6. – Iss. 1. – P. 423.

28. Modi, V. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases / V. Modi, R. L. Dunbrack // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116. – Iss. 14. – P. 6818–6827.

29. Ung, P. M. DFGmodel: predicting protein kinase structures in inactive states for structure-based discovery of type-II inhibitors / P. M. Ung, A. Schlessinger // ACS Chemical Biology. – 2015. – Vol. 10. – Iss. 1. – P. 269–278.

30. Systematic comparison of competitive and allosteric kinase inhibitors reveals common structural characteristics / H. Hu, O. Laufkötter, F. Miljković, J. Bajorath // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 214. – P. 113206.

31. Structural basis for the inhibition of cyclin g-associated kinase by gefitinib /
N. Ohbayashi, K. Murayama, M. Kato-Murayama [et al.] // ChemistryOpen. – 2018. –
Vol. 7. – Iss. 9. – P. 713–719.

32. Breccia, M. Nilotinib: A second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia / M. Breccia, G. Alimena // Leukemia Research. – 2010. – Vol. 34. – Iss. 2. – P. 129–134.

33. Garuti, L. Non-ATP competitive protein kinase inhibitors / L. Garuti,
M. Roberti, G. Bottegoni // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 17. – Iss. 25. –
P. 2804–2821.

34. Wu, P. Allosteric small-molecule kinase inhibitors / P. Wu, M. H. Clausen,
T. E. Nielsen // Pharmacology & Therapeutics. – 2015. – Vol. 156. – P. 56–68.

35. Profit, A. A. Bivalent inhibitors of protein tyrosine kinases / A. A. Profit,
T. R. Lee, D. S. Lawrence // Journal of the American Chemical Society. – 1999. –
Vol. 121. – P. 280–283.

36. Boike, L. Advances in covalent drug discovery / L. Boike, N. J. Henning,D. K. Nomura // Nature Reviews Drug Discovery. – 2022. – Vol. 21. – P. 881–898.

37. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase / T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1986. – Vol. 135. – P. 397–402.

38. Ruegg, U. T. K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases / U. T. Ruegg, B. G. Staurosporine // Trends in Pharmacological Sciences. – 1989. – Vol. 10. – P. 218–220.

39. Iqbal, N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer / N. Iqbal,
N. Iqbal // Chemotherapy Research and Practice. – 2014. – Vol. 2014. – P. 357027.

40. Roskoski, R. J. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2023 update / R. J. Roskoski // Pharmacological Research. – 2023. – Vol. 187. – P. 106552.

41. Lightfoot, H. L. Evolution of small molecule kinase drugs / H. L. Lightfoot,
F. W. Goldberg, J. Sedelmeier // ACS Medicinal Chemistry Letters. -2019. - Vol. 10. - Iss. 2. - P. 153-160.

42. Kinases and cancer / J. Cicenas, E. Zalyte, A. Bairoch, P. Gaudet // Cancers. – 2018. – Vol. 10. – P. 63.

43. Cohen, P. Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century?
/ P. Cohen // Nature Reviews Drug Discovery. – 2002. – Vol. 1. – Iss. 4. – P. 309–315.

44. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design / M. M. Attwood, D. Fabbro, A.V. Sokolov [et al.] // Nature Reviews Drug Discovery. – 2021. – Vol. 20. – P. 839–861.

45. Kinase hinge binding scaffolds and their hydrogen bond patterns / L. Xing, J. Klug-Mcleod, B. Rai, E. A. Lunney // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2015. – Vol. 23. – P. 6520–6527.

46. Sharma, V. Designing of kinase hinge binders: a medicinal chemistry perspective / V. Sharma, M. Gupta // Chemical Biology & Drug Design. – 2022. – Vol. 100. – P. 968–980.

47. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function / D. G. Hardie // Genes and Development– 2011. – Vol. 25. – Iss. 18. – P. 1895–1908.

48. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure / S. P. Davies, S. A. Hawley, A. Woods [et al.] // European Journal of Biochemistry. – 1994. – Vol. 223. – Iss. 2. – P. 351–357.

49. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation / S. C. Stein, A. Woods, N. A. Jones [et al.] // Biochemical Journal. – 2000. – Vol. 345. – Iss. 3. – P. 437–443.

50. Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits / J. R. Dyck, G. Gao, J. Widmer [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – № 30. – P. 17798–17803.

51. Eisenberg, E. Human housekeeping genes are compact / E. Eisenberg,
E. Y. Levanon // Trends in Genetics. - 2003. - Vol. 19. - Iss. 7. - P. 362-365.

52. Ross, F. A. AMP activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes
in 12 flavours / F. A. Ross, C. MacKintosh, D. G. Hardie // The FEBS Journal. – 2018.
– Vol. 283. – P. 2987–3001.

53. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase / B. E. Crute, K. Seefeld, J. Gamble [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273. – № 52. – P. 35347–35354.

54. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase / S. A. Hawley, M. Davison, A. Woods [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. –  $N_{2}$  44. – P. 27879–27887.

55. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform / I. Salt, J. W. Celler, S. A. Hawley [et al.] // Biochemical Journal. – 1998. – Vol. 334. – Iss. 1. – P. 177–187.

56. Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMPactivated protein kinase / N. Kazgan, T. Williams, L. J. Forsberg, J. E. Brenman // Molecular Biology of the Cell. – 2010. – Vol. 21. – No. 19. – P. 3433–3442.

57. Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro / A. Woods, P. C. Cheung, F. C. Smith [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – No. 17. – P. 10282–10290.

58. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias / E. R. Hudson, D. A. Pan, J. James [et al.] // Current Biology. – 2003. – Vol. 13. – Iss. 10. – P. 861–866.

59. AMPK  $\beta$  subunit targets metabolic stress sensing to glycogen / G. Polekhina, A. Gupta, B. J. Michell [et al.] // Current Biology. – 2003. – Vol. 13. – Iss. 10. – P. 867–871.

60. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186–270) / T. J. Iseli, M. Walter, B. J. van Denderen [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280. – No. 14. – P. 13395–13400.

61. Moffat, C. Metabolic functions of AMPK: aspects of structure and of natural mutations in the regulatory gamma subunits // C. Moffat, E. M. Harper // IUBMB Life. – 2010. – Vol. 62. – Iss. 10. – P. 739–745.

62. Bateman, A. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein / A. Bateman // Trends in Biochemical Sciences. – 1997.
– Vol. 22. – P. 12–13.

63. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators / B. Xiao,
M. J. Sanders, D. Carmena [et al.] // Nature Communications. – 2013. – Vol. 4. –
P. 3017.

64. Anashkin, V. A. Enzymes regulated via cystathionine β-synthase domains / V. A. Anashkin, A. A. Baykov, R. Lahti // Biochemistry (Moscow). – 2017. – Vol. 82. – Iss. 10. – P. 1079–1087.

65. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations / J. W. Scott, S. A. Hawley, K. A. Green [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2004. – Vol. 113. – No. 2. – P. 274–284.

66. A conserved sequence immediately N-terminal to the bateman domains in amp-activated protein kinase  $\gamma$  subunits is required for the interaction with the  $\beta$  subunits / R. Viana, M. C. Towler, D. A. Pan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – Iss. 22. – P. 16117–16125.

67. АМРК: структура, функции и участие в патологических процессах /
Д. С. Новикова, А. В. Гарабаджиу, Д. Мелино [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80.
– № 2. – С. 163–183.

68. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK) / K. Barnes, J. C. Ingram, O. H. Porras [et al.] // Journal of Cell Science. – 2002. – Vol. 115. – № 11. – P. 2433–2442.

69. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia / A. S. Marsin, L. Bertrand, M. H. Rider [et al.] // Current Biology. – 2000. – Vol. 10. – No. 20. – P. 1247–1255.

70. The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading / S. B. Jorgensen, J. N. Nielsen, J. B. Birk [et al.] // Diabetes. – 2004. – Vol. 53. – Iss. 12. – P. 3074–3081.

71. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase /
P. A. Lochhead, I. P. Salt, K. S. Walker [et al.] // Diabetes. – 2000. – Vol. 49. – Iss. 6. – P. 896–903.

72. AICAR decreases malonyl-CoA and increases fatty acid oxidation in skeletal muscle of the rat / G. M. Merrill, E. Kurth, D. G. Hardie, W. W. Winder // American Journal of Physiology. – 1997. – Vol. 273. – P. E1107–E1112.

73. Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes / D. D. Habets, W. A. Coumans, M. El Hasnaoui [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta – 2009. – Vol. 1791. – Iss. 3. – P. 212–219.

74. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice / Y. Li, S. Xu,
M. M. Mihaylova [et al.] // Cell Metabolism. – 2011. – Vol. 13. – Iss. 4. – P. 376–388.

75. Clarke, P. R. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver / P. R. Clarke, D. G. Hardie // EMBO J. – 1990. – Vol. 9. – Iss. 8. – P. 2439–2446.

76. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target / D. M. Muoio, K. Seefeld, L. A. Witters, R. A. Coleman // Biochemical Journal. – 1999. – Vol. 338. – Iss. 3. – P. 783–791.

77. Inoki, K. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival / K. Inoki, T. Zhu, K. L. Guan // Cell. – 2003. – Vol. 115. – Iss. 5. – P. 577–590.

78. Browne, G. J. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398 / G. J. Browne, S. G. Finn, C. G. Proud // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279. –  $N_{2}$  13. – P. 12220–12231.

79. Lin, J. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators / J. Lin, C. Handschin, B. M. Spiegelman // Cell Metabolism. – 2005. – Vol. 1. – Iss. 6. – P. 361–370.

80. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy / D. F. Egan, D. B. Shackelford, M. M. Mihaylova [et al.] // Science. - 2010. - Vol. 331. - Iss. 6016. - P. 456-461.

81. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint
/ R. G. Jones, D. R. Plas, S. Kubek [et al.] // Molecular Cell. – 2005. – Vol. 18. – Iss. 3.
- P. 283–293.

82. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis / J. Liang, S. H. Shao, Z. X. Xu [et al.] // Nature Cell Biology. – 2007. – Vol. 9. – Iss. 2. – P. 218–224.

83. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor / E. L. Greer, P. R. Oskoui, M. R. Banko [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – Iss. 41. – P. 30107–30119.

84. Identification of AMP-activated protein kinase targets by a consensus sequence search of the proteome / T. L. Marin, B. Gongol, M. Martin [et al.] // BMC Systems Biology. – 2015. – Vol. 9. – P. 13.

85. Nutrient excess in AMPK downregulation and insulin resistance / K. A. Coughlan, R. J. Valentine, N. B. Ruderman, A. K. Saha // Journal of Endocrinology, Diabetes and Obesity. – 2013. – Vol. 1. – P. 1008.

86. Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMPactivated protein kinase / S. I. Itani, A. K. Saha, T. G. Kurowski [et al.] // Diabetes. – 2003. – Vol. 52. – P. 1635–1640.

87. Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase / M. Du, Q. W. Shen, M. J. Zhu, S. P. Ford // Journal of Animal Science. – 2007. – Vol. 85. – P. 919–927.

88. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase / Y. Wu, P. Song, J. Xu [et al.]. // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – P. 9777–9788.

89. Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser(4)(8)(5)/(4)(9)(1) through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle / R. J. Valentine, K. A. Coughlan, N. B. Ruderman, A. K. Saha . // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2014. – Vol. 562. – P. 62–69.

90. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function / L. L. Dugan, Y. H. You, S. S. Ali [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123. – No. 11. – P. 4888–4899.

91. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans / M. S. Gauthier, E. L. O'Brien, S. Bigornia [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2011. – Vol. 404. – Iss. 1. – P. 382–387.

92. Jiang, P. Negative regulation of AMPK signaling by high glucose via E3 ubiquitin ligase MG53 // P. Jiang, L. Ren, L. Zhi // Molecular Cell. – 2021. – Vol. 81. – Iss. 3. – P. 629–637.

93. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome / N. B. Ruderman, D. Carling, M. Prentki, J. M. Cacicedo // Journal of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123. – Iss. 7. – P. 2764–2772.

94. Sestrin2 in atherosclerosis / Z. Tian, B. J. Yan, W. Luo [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2021. – Vol. 523. – P. 325–329.

95. Umezawa, S. AMPK: Therapeutic target for diabetes and cancer prevention /
S. Umezawa, T. Higurashi, A. Nakajima // Current Pharmaceutical Design. – 2017. –
Vol. 23. – Iss. 25. – P. 3629–3644.

96. AMP-activated protein kinase: a potential therapeutic target for triplenegative breast cancer / W. Cao, J. Li, Q. Hao [et al.] // Breast Cancer Research. – 2019. – Vol. 21. – P. 29.

97. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury / R. R.Russell, J. Li, D. L. Coven [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2004. – Vol. 114. – P. 495–503.

98. Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle / S. B. Jørgensen, B.Viollet, F. Andreelli [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279. – Iss. 2. – P. 1070–1079.

99. Targeting AMP-activated protein kinase (AMPK) for treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease / X. Song, E. Tsakiridis, G. R. Steinberg, Y. Pei // Cell Signalling. – 2020. – P. 109704.

100. Critical Role for AMPK in Metabolic Disease-Induced Chronic Kidney Disease / F. Juszczak, N. Caron, A. V. Mathew, A.-E. Declèves // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – Iss. 21. – P. 7994.

101. AMPK: A bridge between diabetes mellitus and Alzheimer's disease /
M. Chen, N. Huang, J. Liu [et al.] // Behavioural Brain Research. – 2021. – Vol. 400. –
P. 113043.

102. Muraleedharan, R. AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism / R. Muraleedharan, B. Dasgupta // FEBS Journal. – 2022. – Vol. 289. – Iss. 8. – P. 2247–2262.

103. Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in parkinson's disease / D. W. Curry, B. Stutz, Z. B. Andrews, J. D. Elsworth // Journal of Parkinson's Disease. – 2018. – Vol. 8. – Iss. 2. – P. 161–181.

104. Hardie, D. G. Molecular pathways: Is AMPK a friend or a foe in cancer? /
D. G. Hardie // Clinical Cancer Research. - 2015. - Vol. 21. - Iss. 17. - P. 3836-3840.

105. Vara-Ciruelos, D. The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde? / D. Vara-Ciruelos, F. M. Russell, D. G. Hardie // Open Biology. – 2019. – Vol. 9. – Iss. 7. – P. 190099.

106. Inhibition of AMPK/PFKFB3 mediated glycolysis synergizes with penfluridol to suppress gallbladder cancer growth / J. Hu, J. Cao, R. Jin [et al.] // Cell Communication and Signaling. – 2022. – Vol. 20. – Iss. 1. – P. 105.

107. AMPK inhibition protects against arterial thrombosis while sparing hemostasis through differential modulation of platelet responses / P. P.Kulkarni,

V. K.Sonkar, D. Gautam, D. Dash // Thrombosis Research. – 2020. – Vol. 196. – P. 175–185.

108. Discovery of novel pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives with dual activities of vascular remodeling inhibition and vasodilation for the treatment of pulmonary arterial hypertension /L. Hu, L. Li, Q. Chang [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – Vol. 63. – Iss. 19. – P. 11215–11234.

109. Liu, Y. J.AMPK-mediated regulation of neuronal metabolism and function in brain diseases / Y. J. Liu, Y. Chern // Journal of Neurogenetics. – 2015. – Vol. 29. – P. 50–58.

110. Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase reduces glial cell-mediated inflammation and induces the expression of Cx43 in astroglias after cerebral ischemia / Y. Ma, J. Bu, H. Dang [et al.] // Brain Research. – 2015. – Vol. 1605. – P. 1–11.

111. The inhibition of zinc excitotoxicity and AMPK phosphorylation by a novel zinc chelator, 2G11, ameliorates neuronal death induced by global cerebral ischemia / D. K. Hong, J.-W. Eom, A. R. Kho [et al.] // Antioxidants (Basel). – 2022. – Vol. 11. – Iss. 11. – P. 2192.

112. Small-molecule activators of amp-activated protein kinase as modulators of energy metabolism / D. S. Novikova, A. V. Garabadzhiu, G. Melino [et al.] / Russian Chemical Bulletin. – 2015. – Vol. 64. – No. 7. – P. 1497–1517.

113. Cellular transport in the regulation of amino acid metabolism / D. L. Oxender, E. J. Collarini, M. A. Shotwell [et al.] // Biochemical Society Transactions. – 1986. – Vol. 14. – Iss. 6. – P. 993–995.

114. Characterisation of 5'-AMP-activated protein kinase in human liver using specific peptide substrates and the effects of 5'-AMP analogues on enzyme activity / J. E. Sullivan, F. Carey, D. Carling, R. K. Beri // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1994. – Vol. 200. – Iss. 3. – P. 1551–1556.

115. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase / J. E. Sullivan,

K. J. Brocklehurst, A. E. Marley [et al.] // FEBS Letters. – 1994. – Vol. 353. – Iss. 1. – P. 33–36.

116. Corton, J. M. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response / J. M. Corton, J. G. Gillespie, D. G. Hardie // Current Biology. –1994. – Vol. 4. – P. 315–324.

117. Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMPactivated protein kinase / O. Goransson, A. McBride, S. A. Hawley [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – № 45. – P. 32549–32560.

118. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome / B. Cool,
B. Zinker, W. Chiou [et al.] // Cell Metabolism. – 2006. – Vol. 3. – Iss. 6. – P. 403–416.

119. Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits / T. Pang, B. Xiong, J. Y. Li [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – No. 1. – P. 495–506.

120. A potent and selective AMPK activator that inhibits de novo lipogenesis / J. E. Gómez-Galeno, Q. Dang, T. H. Nguyen [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2010. – Vol. 1. – Iss. 9. – P. 478–482.

121. PAN-AMPK activator O304 improves glucose homeostasis and microvascular perfusion in mice and type 2 diabetes patients / P. Steneberg, E. Lindahl, U. Dahl [et al.] // JCI Insight. – 2018. – Vol. 3. – Iss. 12. – P. e99114.

122. AMPK activator O304 protects against kidney aging through promoting energy metabolism and autophagy / M. Zhu, W. Shen, J. Li [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – P. 836496.

123. Sujobert, P. Co-activation of AMPK and mTORC1 as a new therapeutic option for acute myeloid leukemia / P. Sujobert, J. Tamburini // Molecular & Cellular Oncology. – 2015. – Vol. 3. – Iss. 4. – P. e1071303.

124. Development of novel alkene oxindole derivatives as orally efficacious AMP-activated protein kinase activators / L. F. Yu, Y. Y. Li, M. B. Su [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2013. – Vol. 4. – Iss. 5. – P. 475–480.

125. AMPK activator C24 inhibits hepatic lipogenesis and ameliorates dyslipidemia in HFHC diet-induced animal models / S. M. Sun, Z. F. Xie, Y. M. Zhang [et al.] // Acta Pharmacologica Sinica. – 2021. – Vol. 42. – Iss. 4. – P. 585–592.

126. A small-molecule benzimidazole derivative that potently activates AMPK to increase glucose transport in skeletal muscle: comparison with effects of contraction and other AMPK activators / Y. C. Lai, S. Kviklyte, D. Vertommen [et al.] // Biochemical Journal. – 2014. – Vol. 460. – Iss. 3. – P. 363–375.

127. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis / G. Zadra, C. Photopoulos, S. Tyekucheva [et al.] // EMBO Molecular Medicine. – 2014. – Vol. 6. – Iss. 4. – P. 519–538.

128. Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-human primates and mice / E. C. Cokorinos, J. Delmore, A. R. Reyes [et al.] // Cell Metabolism. – 2017. – Vol. 25. – Iss. 5. – P. 1147 – 1159.

129. Discovery and preclinical characterization of 6-chloro-5-[4-(1-hydroxycyclobutyl)phenyl]-1H-indole-3-carboxylic acid (PF-06409577), a direct activator of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), for the potential treatment of diabetic nephropathy / K. O. Cameron, D. W. Kung, A. S. Kalgutkar [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 59. – Iss. 17. – P. 8068–8081.

130. Optimization of metabolic and renal clearance in a series of indole acid direct activators of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) / D. J. Edmonds, D. W. Kung, A. S. Kalgutkar [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 61. – Iss. 6. – P. 2372–2383.

131. Macrophage AMPK  $\beta$ 1 activation by PF-06409577 reduces the inflammatory response, cholesterol synthesis, and atherosclerosis in mice / E. A. Day, L. K. Townsend, S. Rehal [et al.] // iScience. – 2023. – Vol. 26. – Iss. 11. – P. 108269.

132. Efficacy and safety of PXL770, a direct AMP kinase activator, for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (STAMP-NAFLD): a randomised, doubleblind, placebo-controlled, phase 2a study / K. Cusi, N. Alkhouri, S. A. Harrison [et al.] // The Lancet Gastroenterology & Hepatology. – 2021. – Vol. 6. – Iss. 11. – P. 889–902. 133. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action /
G. Zhou, R. Myers, Y. Li [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2001. – Vol. 108.
– Iss.8. – P. 1167–1174.

134. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism / P. B.Yu, C. C.Hong, C. Sachidanandan [et al.] // Nature Chemical Biology. – 2008. – Vol. 4. – Iss. 1. – P. 33–41.

135. AMP-activated protein kinase selectively inhibited by the type II inhibitor SBI-0206965 / T. A. Dite, C. G.Langendorf, A. Hoque [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2018. – Vol. 293. – Iss. 23. – P. 8874–8885.

136. The potent AMPK inhibitor BAY-3827 shows strong efficacy in androgendependent prostate cancer models / C. Lemos, V. K.Schulze, S. J. Baumgart [et al.] // Cellular oncology (Dordrecht) . – 2021. – Vol. 44. – Iss. 3. – P. 581–594.

137. Производные пиразоло[1,5-а]пиримидина и их биологическая активность / Ф. Дарвиш, Д. С. Новикова, Т. А. Григорьева, В. Г. Трибулович // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2024. – Т. 70. – № 96. – С. 53–59.

138. Zaleplon, a novel nonbenzodiazepine hypnotic, effectively treats insomnia in elderly patients without causing rebound effects / S. Ancoli-Israel, J. K.Walsh, R. M. Mangano, M. Fujimor // Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry. – 1999. – Vol. 1. – Iss. 4. – P. 114–120.

139. Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABA(A) receptor subtypes / E. Sanna, F. Busonero, G. Talani [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2002. – Vol. 451. – Iss. 2. – P. 103–110.

140. Indiplon is a high-affinity positive allosteric modulator with selectivity for alpha1 subunit-containing GABAA receptors / R. E. Petroski, J. E. Pomeroy, R. Das [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2006. – Vol. 317. – Iss. 1. – P. 369–377.

141. Mirza, N. R. Comparative cue generalization profiles of L-838, 417, SL651498, zolpidem, CL218,872, ocinaplon, bretazenil, zopiclone, and various benzodiazepines in chlordiazepoxide and zolpidem drug discrimination / N. R. Mirza,

R. J. Rodgers, L. S. Mathiasen // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2006. – Vol. 316. – Iss. 3. – P. 1291–1299.

142. Santos, B. A single-dose, randomized, double-blind, double dummy, placebo and positive-controlled, five-way cross-over study to assess the pharmacodynamic effects of lorediplon in a phase advance model of insomnia in healthy Caucasian adult male subjects / B. Santos, A. Guglietta, T. Roth // Human Psychopharmacology. – 2014. – Vol. 29. – Iss. 3. – P. 266–273.

143. Discovery and pharmacological characterization of N-[2-({2-[(2S)-2-cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-2-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide hydrochloride (anagliptin hydrochloride salt) as a potent and selective DPP-IV inhibitor / N. Kato, M. Oka, T. Murase [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 19. – Iss. 23. – P. 7221–7227.

144. I2-Catalyzed three-component synthesis of 3-selenylated pyrazolo[1,5a]pyrimidines / T. Choudhuri, S. Paul, P. Sikdar, [et al.] // New Journal of Chemistry. – 2024. – Vol. 48. – P. 9480

145. Discovery of an oral respiratory syncytial virus (RSV) fusion inhibitor (GS-5806) and clinical proof of concept in a human RSV challenge study / R. L. Mackman, M. Sangi, D. Sperandio [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2015. – Vol. 58. – Iss. 4. – P. 1630–1643.

146. A phase 2b, randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study evaluating antiviral effects, pharmacokinetics, safety, and tolerability of presatovir in hematopoietic cell transplant recipients with respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract // F. M. Marty, R. F. Chemaly, K. M. Mullane [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 71. – Iss. 11. – P. 2787–2795.

147. Medicinal attributes of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine based scaffold derivatives targeting kinases as anticancer agents / N. S. M. Ismail, G. M. E. Ali, D. A. Ibrahim, A. M. Elmetwali // Future Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – Vol. 2. – P. 60–70.

148. Łukasik, P. Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development-review / P. Łukasik, M. Załuski, I. Gutowska // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – Iss. 6. – P. 2935.

149. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as orally available inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 / K. Paruch, M. P. Dwyer, C. Alvarez [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2007. – Vol. 17. – Iss. 22. – P. 6220–6223.

150. The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity / S. Ali, D. A. Heathcote, S. H. Kroll [et al.] // Cancer Research. – 2009. – Vol. 69. – Iss. 15. – P. 6208–6215.

151. Discovery and SAR of novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as inhibitors of CDK9 / L. J. Phillipson, D. H. Segal, T. L. Nero [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2015. – Vol. 23. – Iss. 19. – P. 6280–6296.

152. Roskoski, R. Jr. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs / R. Roskoski // Pharmacological Research. – 2019. – Vol. 139. – P. 471–488.

153. Discovery of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-based CHK1 inhibitors: A templatebased approach – Part 1 / M. P. Dwyer, K. Paruch, M. Labroli [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2011. – Vol. 21. – P. 467–470.

154. Discovery of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-based CHK1 inhibitors: A templatebased approach – Part 2 / M. Labroli, K. Paruch, M. P. Dwyer [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2011. – Vol. 21. – P. 471–474.

155. 7-Aminopyrazolo[1,5-a]pyrimidines as potent multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor / R. R. Frey, M. L. Curtin, D. H. [et al.] // Albert Journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 51. – P. 3777–3787.

156. Heterocycle-functional steroidal derivatives: Design, synthesis, bioevaluation and SARs of steroidal pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as potential ALK inhibitors / Fang Liu, Shaohua Wen, Manli Liu [et al.] // Bioorganic Chemistry. – 2024. – Vol. 153. – P. 107847.

157. Optimization of a pyrazolo[1,5-a]pyrimidine class of KDR kinase inhibitors: improvements in physical properties enhance cellular activity and pharmacokinetics /

M. E. Fraley, R. S. Rubino, W. F. Hoffman [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2002. – Vol. 12. – P. 3537–3541.

158. Efficacy and tolerability of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine RET kinase inhibitors for the treatment of lung adenocarcinoma / C. J. N. Mathison, D. Chianelli, P. V. Rucker [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2020. – Vol. 11. – P. 558–565.

159. Scott, L. J. Larotrectinib: first global approval / L. J. Scott // Drugs. – 2019. – Vol. 79. – P. 201–206.

160. Repotrectinib (TPX-0005) is a next-generation ROS1/TRK/ALK inhibitor that potently inhibits ROS1/TRK/ALK solvent-front mutations / A. Drilon, S. I. Ou, B. C. Cho [et al.] // Cancer Discovery. – 2018. – Vol. 8. – P. 1227–1236.

161. A next-generation TRK kinase inhibitor overcomes acquired resistance to prior TRK kinase inhibition in patients with TRK fusion-positive solid tumors / A. Drilon, R. Nagasubramanian, J. F. Blake [et al.] // Cancer Discovery. – 2017. – Vol. 7. – P. 963–972.

162. Novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as c-Src kinase inhibitors that reduce IKr channel blockade / H. Mukaiyama, T. Nishimura, S. Kobayashi [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 16. – Iss. 2. – P. 909–921.

163. Synthesis and identification of GZD856 as an orally bioavailable Bcr-AbIT315I inhibitor overcoming acquired imatinib resistance / X. Lu, Z. Zhang, X. Ren [et al.] // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 32. – P. 331–336.

164. Discovery of novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as potent pan-Pim inhibitors by structure- and property-based drug design / X. Wang, S. Magnuson, R. Pastor [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2013. – Vol. 23. – P. 3149– 3153. doi:10.1016/j.bmcl.2013.04.020

165. Discovery of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine TTK inhibitors: CFI-402257 is a potent, selective, bioavailable anticancer agent / Y. Liu, R. Laufer, N. K. Patel [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2017. – Vol. 7. – P. 671–675.

166. Pharmacophore-based virtual screening for identification of negative modulators of GLI1 as potential anticancer agents / F. Manetti, B. Stecca, R. Santini [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2020. – Vol. 11 – P. 832–838.

167. Goel, N. Transition-metal-free chemo-selective C–C/C–N bond formation reaction for the highly efficient synthesis of pyrazoles, pyrazolo fused pyrimidines and pyridines / N. Goel, P. Kumar, S. Bhagat [et al.] // European Journal of Organic Chemistry. -2024. - Vol. 27 – P. e202400492.

168. Parallel synthesis of 7-heteroaryl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamides
/ S. Ahmetaj, N. Velikanje, U. Grošelj [et al.] // Molecular Diversity. – 2013. – Vol. 17.
– P. 731–743.

169. Synthesis and SAR of a new series of COX-2-selective inhibitors: pyrazolo[1,5-a]pyrimidines / C. Almansa, A. F. de Arriba, F. L. Cavalcanti // Journal of Medicinal Chemistry. – 2001. – Vol. 44. – P. 350–361.

170. Emelina, E. E. α-Aminoazoles in the synthesis of heterocycles: V. Synthesis of azolo[1,5-a]pyrimidines from 2-ethoxyvinyl trifluoromethyl ketones and 2,2-diethoxyvinyl trifluoromethyl ketone / E. E. Emelina, A. A. Petrov, // Russian Journal of Organic Chemistry. – 2009. – Vol. 45. – P. 417–420.

171. Regioselective formylation of pyrazolo[3,4-b]pyridine and pyrazolo[1,5-a]pyrimidine systems using Vilsmeier–Haack conditions / J. Quiroga, J. Trilleras,
B. Insuasty // Tetrahedron Letters. – 2008. – Vol. 49. – P. 2689–2691.

172. Concise and efficient access to 5,7-disubstituted pyrazolo[1,5-a ]pyrimidines by Pd-catalyzed sequential arylation, alkynylation and SNAr reaction / B. Jismy, G. Guillaumet, H. Allouchi // European Journal of Organic Chemistry. – 2017. – Vol. 41. – P. 6168–6178.

173. I<sub>2</sub>-catalyzed cyclization of β-ketonitrile with 1H-Pyrazol-5-amine / T. Sang,
F. Jia, J. He [et al.] // Chinese Journal of Organic Chemistry. – 2023. – Vol. 43. – Iss. 1.
– P. 195–201.

174. Regiochemistry of addition of aminoheterocycles to  $\alpha$ -cyanocinnamonitriles: formation of aza-bridged bi- and tricycles / M. D. Wendt, A. Kunzer, R. F. Henry [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2007. – Vol. 48. – Iss. 36. – P. 6360–6363.

175. Arias-Gomez, A. Functional pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Current approaches in synthetic transformations and uses as an antitumor scaffold / A. Arias-Gomez, A. Godoy, J. Portilla // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – Iss. 9. – P. 2708.

176. Investigation of the specificity and mechanism of action of the ULK1/AMPK inhibitor SBI-0206965 / D. Ahwazi, K. Neopane, G. R. Markby [et al.] // Biochemical Journal. – 2021. – Vol. 478. – Iss. 15. – P. 2977–2997.

177. The ULK1/2 and AMPK inhibitor SBI-0206965 blocks AICAR and insulinstimulated glucose transport / J. R. Knudsen, A. B.Madsen, K. W. Persson [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – Iss. 7. – P. 2344.

178. BAY-3827 and SBI-0206965: Potent AMPK inhibitors that paradoxically increase Thr172 phosphorylation / S. A. Hawley, F. M. Russell, F. A. Ross, D. G. Hardie // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 25. – P. 453.

179. Structure of an AMPK complex in an inactive, ATP-bound state / Y. Yan, S. Mukherjee, K. G. Harikumar [et al.] // Science. – 2021. – Vol. 373. – Iss. 6553. – P. 413–419.

180. E. P. Patent №1109555 A1 / Novel angiogenesis inhibitors / M. T Bilodeau,
R. W. Hungate, A. M. Cunningham, T. J. Koester; application 30.05.97; patented 03.12.98.

181. AMPK inhibitor BML-275 induces neuroprotection through decreasing cyt c and AIF expression after transient brain ischemia / Y. Hu, Y. D. Dong, Y. C. Wu [et al.] 160// Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 52. – P. 116522.

182. Synthesis and characterization of novel classes of PDE10A inhibitors - 1 H1,3-benzodiazoles and imidazo[1,2-a]pyrimidines. / R. Moszczyński-Pętkowski,
J. Majer, M. Borkowska [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. - 2018. Vol. 155. - P. 96-116.

183. Stabilization of NaBH4 in methanol using a catalytic amount of naome. reduction of esters and lactones at room temperature without solvent-induced loss of hydride / C. P. Prasanth, J. Ebbin, A. Abhijith [et al.] // Journal of Organic Chemistry. – 2018. – Vol. 83. – No. 3. – P. 1431–1440.

184. Tetrazolylhydrazides as selective fragment-like inhibitors of the jumonjicdomain-containing histone demethylase KDM4A / N. Rüger, M. Roatsch, T. Emmrich [et al.] // ChemMedChem. – Vol. 10. – No. 11. – P. 1875–1883.

185. Kaushik, M. P. Synthesis and characterization of oximino pyridoyl phosphonates / M. P. Kaushik, R. Vaidyanathaswamy // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. – 1995. – Vol. 102. – No. 1-4. – P. 45–50.

186. Borne, R. F. Derivatives of perhydrofuro[2,3-c]pyridin-2-one / R. F. Borne,
H. Y. Aboul-Enein // Journal of Heterocyclic Chemistry. – 1980. – Vol. 17. – Iss. 7. –
P. 1609–1611.

187. Robust and scalable approach to 1,3-disubstituted pyridylcyclobutanes / O. P. Demchuk, O. V. Hryshchuk, B. V. Vashchenko [et al.] // European Journal of Organic Chemistry. – 2019. – Vol. 2019. – Iss. 34. – P. 5937.

188. Structure–activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors / G. D. Cuny, P. B.Yu, J. K. Laha [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2008. – Vol. 18. – Iss. 15. – P. 4388–4392.

189. S-cis diene conformation: a new bathochromic shift strategy for nearinfrared fluorescence switchable dye and the imaging applications / H. J. Chen, C. Y. Chew, E. H. Chang [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – Vol. 140. – Iss. 15. – P. 5224–5234.

190. Tomsho, J. W. Synthesis of (6R)- and (6S)-5,10-dideazatetrahydrofolate oligo-gamma-glutamates: kinetics of multiple glutamate ligations catalyzed by folylpoly-gamma-glutamate synthetase / J. W. Tomsho, J. J. McGuireb, J. K. Coward // Organic and Biomolecular Chemistry. – 2005. – Vol. 3. – Iss. 18. – P. 3388–3398.

191. Tribulovich, V. G. A new preparative method for the synthesis of 6-[3-(1-adamantyl)-4-methoxyphenyl]-2-naphthoic acid / V. G. Tribulovich, A. V. Garabadzhiu, I. Kalvin'sh // Pharmaceutical Chemistry Journal – 2011. – Vol. 45. – Iss. 4. – P. 241–244.

192. Ether cleavage re-investigated: elucidating the mechanism of BBr<sub>3</sub>-facilitated demethylation of aryl methyl ethers / T. M. Kosak, H. A. Conrad,

A. L. Korich, R. L. Lord // European Journal of Organic Chemistry. – 2015. – Vol. 2015. – Iss. 34. – P. 7460–7467.

193. Trofimenko, S. Dihalomalonaldehydes/ S. Trofimenko // Journal of Organic Chemistry. – 1963. – Vol. 28. – Iss. 11. – P. 3243–3245.

194. Хорецкий, М. С. Липофильность ВОDIPY флуорофоров и их распределение в системе октанол-1–вода / М. С. Хорецкий, Н. С. Фролова, В. М. Шкуматов // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2023. – Т. 59. – Вып. 2. – С. 150–161.

195. Divergent Synthesis of β-Fluoroamides via Silver-Catalyzed Oxidative Deconstruction of Cyclopropanone Hemiaminals / Y. Jang, W. Deng, I. S. Sprague, V. N. G. Lindsay // Organic Letters. – 2023. – Vol. 25. – Iss. 28. – P. 5389–5394.

196. Mitsunobu, O. Preparation of esters of carboxylic and phosphoric acid via quaternary phosphonium salts get access arrow / O. Mitsunobu, Y. Yamada // Bulletin of the Chemical Society of Japan. – 1967. – Vol. 40. – Iss. 10. – P. 2380–2382.

197. Stereochemistry of the conversion of 2-phenoxyethanol into phenol and acetaldehyde by *Acetobacterium* sp. / G. Speranza, B. Mueller, M. Orlandi [et al.] // Helvetica Chimica Acta. – 2003. – Vol. 86. – Iss. 7. – P. 2629–2636.

198. Huang, H. Mitsunobu reaction using basic amines as pronucleophiles / H. Huang, J. Y. Kang // Journal of Organic Chemistry. – 2017. – Vol. 82. – Iss. 13. – P. 6604–6614.

199. Base catalyzed Mitsunobu reactions as a tool for the synthesis of aryl secalkyl ethers / P. Manivel, N. P. Rai, V. P. Jayashankara, P. N. Arunachalam // Tetrahedron Letters – 2007. – Vol. 48. – Iss. 15. – P. 2701–2705.

200. Amination of aliphatic alcohols and diols with an iridium pincer catalyst / N. V. Andrushko, V. Andrushko, P. Roose [et al.] // ChemCatChem. – 2010. – Vol. 2. – Iss. 6. – P. 640–643.

201. Liu, D. Mitsunobu reactions of aliphatic alcohols and bulky phenols / D. Liu,
L. P. Sanow, C. Zhang // Tetrahedron Lett. – 2014. – Vol. 55. – Iss. 19. – P. 3090–3092.

202. Разработка воспроизводимого и масштабируемого метода синтеза биологически активных производных пиразоло[1,5-а]пиримидина /

Д. С. Новикова, Ф. Дарвиш, Т. А. Григорьева, В. Г. Трибулович // Журнал общей химии. – 2023. – Т. 95 – № 5. – С. 684–694.

203. Davies, S. P. Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay / S. P. Davies, D. Carling, D. G. Hardie // European Journal of Biochemistry. – 1989. – Vol. 186. – Iss. 1-2. – P. 123–128.