

**ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ  
4,5-ДИГИДРОТИАЗОЛО[5',4':5,6]БЕНЗИЗОКСАЗОЛ-2-АМИДОВ  
В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДВОЙНЫХ ИНГИБИТОРОВ  
HSP90/HER2**

*Воробьева А.О., Щербаков А.М., Сорокин Д.В., Михайлова А.Л.,  
Богданов Ф.Б., Шафрановская Е.В., Лахвич Ф.А., Пивень Ю.А.*

**Воробьева А.О.**

*Научный сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси,  
г. Минск, Беларусь  
na.varabyeva@gmail.com*

**Щербаков А.М.**

*Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией онкопротеомики, Отдел экспериментальной биологии опухолей, Национальный медицинский научно-исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина,  
г. Москва, Российская Федерация  
a.sherbakov@ronc.ru*

**Сорокин Д.В.**

*Научный сотрудник, Отдел экспериментальной биологии опухолей, Национальный медицинский научно-исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина,  
г. Москва, Российская Федерация  
d.sorokin@ronc.ru*

**Михайлова А.Л.**

*Лаборант-исследователь, Отдел экспериментальной биологии опухолей, Национальный медицинский научно-исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина,  
г. Москва, Российская Федерация  
alexandra.mivl92@gmail.com*

**Богданов Ф.Б.**

*Лаборант-исследователь, Отдел экспериментальной биологии опухолей, Национальный медицинский научно-исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина,  
г. Москва, Российская Федерация*

**Шафрановская Е.В.**

*Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси,  
г. Минск, Беларусь*

**Лахвич Ф.А.**

*Академик, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси,  
г. Минск, Беларусь  
lakhvich@iboch.by*

**Пивень Ю.А.**

*Кандидат химических наук, заведующий лабораторией химии проста-  
ландинов, Институт биоорганической химии,  
Национальная академия наук Беларуси,  
г. Минск, Беларусь  
piven.ya@gmail.com*

*В данном исследовании представлены новые изоксазол-тиазольные соеди-  
нения, которые действуют как двойные ингибиторы HSP90/HER2, демонстри-  
руя высокую активность и селективность против HER2-положительных кле-  
ток рака молочной железы. Соединение-лидер, **ATF-2**, продемонстрировало  
эффективность, аналогичную лапатинибу, и эффективно снижало активность  
HER2, EGFR и CDK6, что указывает на его потенциал в качестве многоцелевого  
противоопухолевого средства.*

***Ключевые слова:** таргетная терапия; рак молочной железы; белок тепло-  
вого шока 90 (HSP90); рецептор эпидермального фактора роста человека 2  
(HER2); двойные ингибиторы*

**DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOLOGICAL EVALUATION  
OF 4,5-DIHYDROTHIAZOLO [5',4':5,6]BENZISOXAZOL-2-  
AMIDES AS POTENTIAL DUAL HSP90/HER2 INHIBITORS**

**Varabyeva N.A.**

*Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of  
Belarus, Minsk, Belarus  
na.varabyeva@gmail.com*

**Scherbakov A.M.**

*Candidate of Biology, Head of the Oncoproteomics Laboratory, Department of  
Experimental Tumor Biology, Blokhin N.N. National Medical Research Center of On-  
cology, Moscow, Russian Federation  
a.sherbakov@ronc.ru*

**Sorokin D.V.**

*Researcher, Department of Experimental Tumor Biology, Blokhin N.N. Na-  
tional Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation  
d.sorokin@ronc.ru*

**Mikhaylova A.L.**

*Laboratory Research Assistant, Department of Experimental Tumor Biology,  
Blokhin N.N. National Medical Research Center of Oncology,  
Moscow, Russian Federation  
alexandra.mivl92@gmail.com*

**Bogdanov F.B.**

*Laboratory Research Assistant, Department of Experimental Tumor Biology,  
Blokhin N.N. National Medical Research Center of Oncology,  
Moscow, Russian Federation*

**Shafranovskaya E.V.**

*Candidate of Biology, Leading researcher, Institute of Bioorganic Chemistry,  
National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

**Lakhvich F.A.**

*Academician, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences  
of Belarus, Minsk, Belarus*

*lakhvich@iboch.by*

**Piven Y.A.**

*Candidate of Chemistry, Head of the Laboratory of Prostaglandin Chemistry,  
Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,*

*Minsk, Belarus*

*piven.ya@gmail.com*

*The study presents newly designed isoxazole–thiazole compounds that act as dual HSP90/HER2 inhibitors, showing strong activity and selectivity against HER2-positive breast cancer cells. The lead molecule, ATF-2, demonstrated potency similar to lapatinib and effectively reduced the activity of HER2, EGFR, and CDK6, indicating its potential as a multi-target anticancer agent.*

**Key words:** *targeted therapy; breast cancer; heat shock protein 90 (HSP90); human epidermal growth factor receptor 2 (HER2); dual inhibitors*

**Введение.** Рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у женщин и второй ведущей причиной смерти от рака среди женщин во всем мире. Белок теплового шока 90 (HSP90) играет ключевую роль в созревании и поддержании стабильности широкого спектра онкопротеинов-мишеней [1]. Рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2) является молекулярным маркером для формирования группы пациентов с HER2-положительными новообразованиями. Это мембранный рецептор, который способствует быстрому делению злокачественных клеток. Моноклональные антитела (например, трастузумаб, пертузумаб, маргетуксимаб) и ингибиторы тирозинкиназы (например, лапатиниб, тукатиниб), нацеленные на HER2, показали эффективность при HER2-положительных видах рака [2]. Однако остаются проблемы, такие как лекарственная устойчивость, высокие производственные затраты и побочные эффекты. В настоящее время альтернативные терапевтические стратегии представляют большой интерес, особенно разработка двойных ингибиторов.

Целью данного исследования было разработать новые потенциальные двойные ингибиторы HSP90/HER2 на основе 4,5-дигидротиазоло[5',4':5,6]бензизоксазол-2-аминов и оценить их антипролиферативную активность.

**Результаты и обсуждение.** В нашей предыдущей работе, посвященной поиску новых ингибиторов HSP90, мы синтезировали ряд *O*-ацилированных (*E*)-3-арил-6,7-дигидробензизоксазол-4(5*H*)-он оксимов **isfp** [3] (рис. 1), некоторые из которых продемонстрировали умеренную антипролиферативную активность в

клетках рака молочной железы в низкой микромолярной концентрации. Все активные соединения содержали 3-(3-фторбензамидо)бензоат в качестве общего фрагмента — фармакофора, ингибирующего тирозинкиназы. Для ведущего соединения с Ar = 4-гидрокси-3-метоксифенил, известного как фармакофор, ингибирующий HSP90, мы показали, что антипролиферативный эффект в основном обусловлен ингибированием HSP90.

В другой нашей работе [4] мы разработали схему синтеза полициклических соединений, содержащих изоксазольные и тиазольные кольца, и применили ее для синтеза потенциального ингибитора HSP90 **actzl-11** (рис. 1), который продемонстрировал антипролиферативную активность против гормонозависимых клеток MCF-7 со значением концентрации полумаксимального ингибирования IC<sub>50</sub> 9.5 мкМ. На основе данных, полученных в этих двух работах, и наших предположений возникла идея, что гибридизация упомянутых молекул может стать возможной возможностью получения двойного ингибитора HSP90/HER2.

Мы предложили два изомерных соединения, **ATF-1** и **ATF-2** (рис. 1), которые потенциально могут ингибировать как HSP90, так и HER2. Для проверки гипотезы мы провели докинг этих соединений в АТФ-связывающий карман N-терминального домена (NTD) HSP90α (PDB 6LTI) и АТФ-связывающий карман киназного домена HER2 (PDB 3PP0), выполнили моделирование молекулярной динамики в течение 200 нс для полученных комплексов, а затем рассчитали энтальпии связывания методом MM/GBSA. Аналогичные расчеты были проведены для известного ингибитора HSP90 люминеспиба и ингибитора HER2 лапатиниба. В результате получились характеристики, сопоставимые с известными ингибиторами, что говорит о перспективности предложенных соединений.

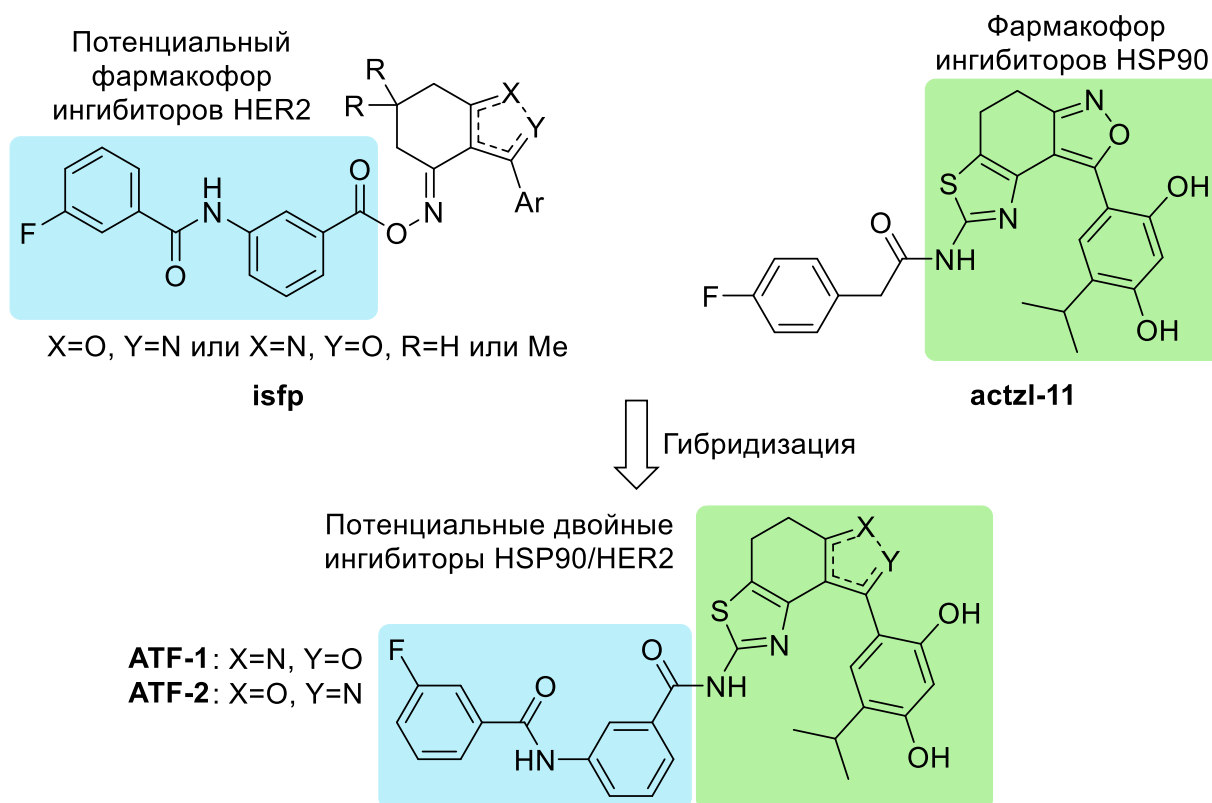


Рис. 1. Дизайн двойных ингибиторов HSP90/HER2

Для синтеза обоих целевых соединений был использован подход, разработанный ранее в нашей исследовательской группе [4]. На первом этапе региоизомерные бромиды **1** конденсировали с тиомочевиной в ацетонитриле при кипячении в течение 8 ч. В этих условиях аминотиазолы **2a** и **2b** были получены с хорошими выходами 76 и 98 % соответственно. Затем проводили ацилирование аминотиазолов **2** ацилхлоридом **3** в присутствии триэтиламина и DMAP в  $\text{CHCl}_3$ . Продукты **4a** и **4b** были получены с выходами 27 и 54 % соответственно. На последнем этапе метильные защитные группы снимали с соединений **4a** и **4b** с использованием избытка  $\text{BBr}_3$  в качестве кислоты Льюиса в сухом DCM, что дало целевые соединения **ATF-1** и **ATF-2** с выходами 38 и 26 % соответственно (схема 1).

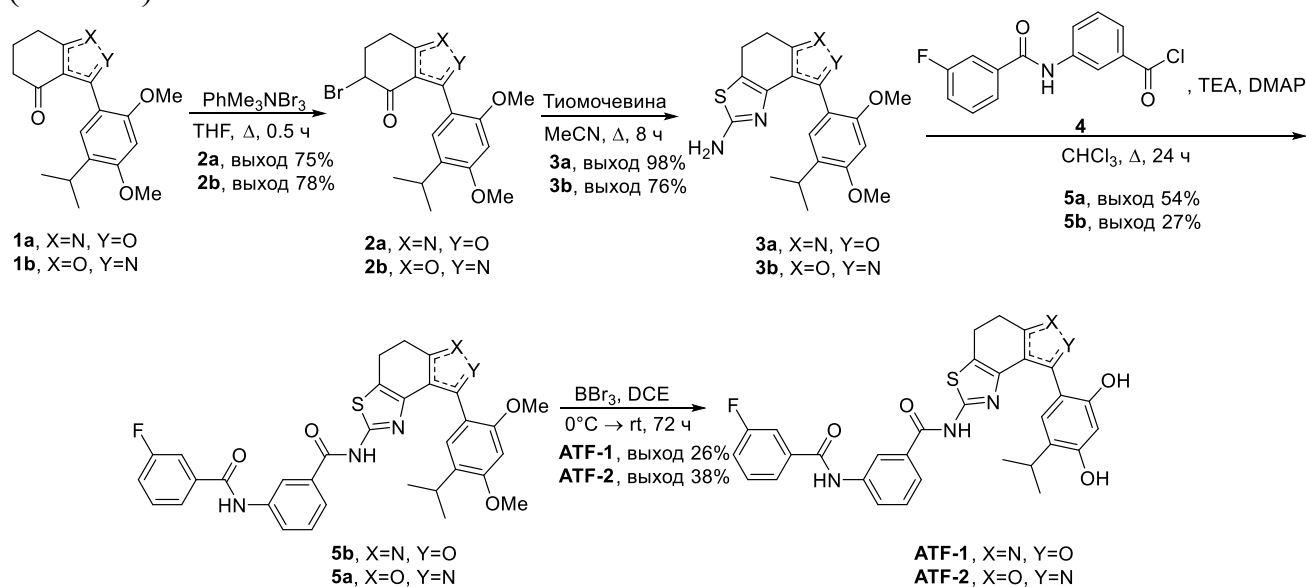


Схема 1

Для изучения антипролиферативной активности синтезированных гибридных соединений была выбрана клеточная линия рака молочной железы HCC1954. Ранее мы подтвердили высокий уровень экспрессии HER2 в этих клетках. В качестве эталонного препарата использовался известный ингибитор рецепторной тирозинкиназы лапатиниб. На основании полученных данных (таблица 1) можно заключить, что молекулы **ATF-1** и **ATF-2** обладают цитотоксической активностью в микромолярном диапазоне концентраций. Значения полуингибирующих концентраций ( $\text{IC}_{50}$ ) были ниже 3  $\mu\text{M}$  и сопоставимы с лапатинибом.

Таблица 1

Антипролиферативная активность и токсичность соединений **ATF-1** и **ATF-2**

Соединение	Линии клеток		Индекс селективности
	HCC1954 $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$	hFB-hTERT $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$	
<b>ATF-1</b>	1.7 ± 0.3	17.5 ± 1.5	10
<b>ATF-2</b>	2.1 ± 0.4	5.5 ± 0.5	3
Лапатиниб	2.4 ± 0.3	12.8 ± 1.4	5
Люминеспиб	0.2 ± 0.01		

Для оценки селективности полученных соединений были проведены тесты на нормальных клетках — фибробластах hFB-hTERT. Полученные результаты показывают, что структурный изомер **ATF-1** обладает наибольшей селективностью по отношению к опухолевым клеткам. Примечательно, что индекс селективности **ATF-1** в два раза превосходит индекс селективности лапатиниба, что подчеркивает его потенциал для разработки таргетной терапии с уменьшенными побочными эффектами и улучшенным профилем безопасности. Соединение **ATF-2** продемонстрировало более низкую селективность по сравнению с **ATF-1**.

Следующим этапом биологических испытаний был иммуноблоттинг (рис. 2). Обнаружено, что ни **ATF-1**, ни **ATF-2** напрямую не влияли на экспрессию HSP90, при обработке 10  $\mu\text{M}$  **ATF-2** наблюдалось значительное увеличение экспрессии HSP70, что служит маркером ингибирования HSP90. Обработка возрастающими концентрациями **ATF-1** привела к снижению уровня HER2 и его фосфорилированной формы (p-HER2) при концентрации 10  $\mu\text{M}$ . Соединение **ATF-2** снижало экспрессию HER2 и p-HER2 уже при 1  $\mu\text{M}$ , при этом значительное подавление наблюдалось при 10  $\mu\text{M}$ . Также **ATF-2** ингибировал другой рецептор тирозин-киназы, EGFR, и его активированную форму (p-EGFR) при концентрации 10  $\mu\text{M}$ . На основании этих данных можно сделать вывод, что **ATF-2** обладает большей селективностью в отношении HER2-зависимых клеток HCC1954 по сравнению с **ATF-1**.

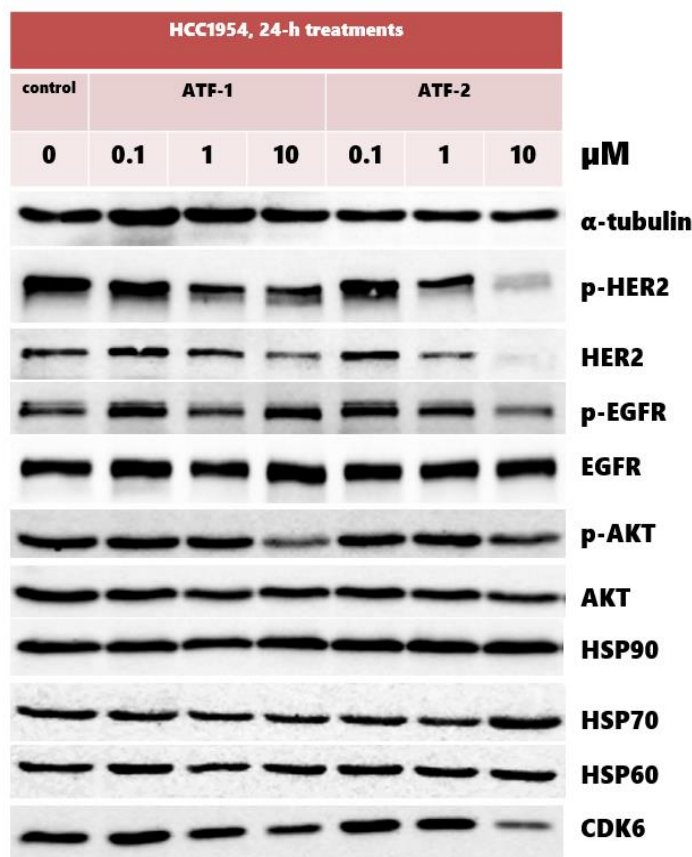


Рис. 2. Результаты иммуноблоттинга

Антипролиферативные эффекты синтезированных соединений были подтверждены снижением экспрессии фосфорилированного АКТ (p-AKT) при концентрации 10  $\mu\text{M}$ , что указывает на воздействие на сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR, который имеет решающее значение для регуляции клеточного цикла и прогрессирования опухоли. Еще один ключевой белок-мишень HSP90, циклин-зависимая киназа 6 (CDK6), играет важную роль в активации клеточного цикла в фазе G1. После инкубации с **АТФ-1** и **АТФ-2** экспрессия CDK6 снижалась при концентрации 10  $\mu\text{M}$ .

**Заключение.** Таким образом, в ходе работы был разработан эффективный подход к синтезу 4,5-дигидро-1,2,4-тиазоло[5',4':5,6]бензизоксазол-2-амидов. С помощью этого подхода были получены два новых потенциальных двойных ингибитора HSP90/HER2. Все соединения показали высокую антипролиферативную активность против HER2-положительных клеток рака молочной железы HCC1954.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Белорусского фонда фундаментальных исследований (проект X22МС-030, химия) и Российского научного фонда (проект 24-15-00273, исследование сигнальных путей HSP90).

#### **Список литературы**

1. Yu, J. Pan- and isoform-specific inhibition of Hsp90: Design strategy and recent advances / J. Yu, C. Zhang, C. Song // *Eur. J. Med. Chem.* – 2022. – V. 238. – P. 114516–114534.
2. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial / Y.-J. Bang, E. Van Cutsem, A. Feyereislova [et al.] // *The Lancet.* – 2010. – Vol. 376, № 9742 – P. 687–697.
3. Piven Y. A., Yastrebova M. A., Khamidullina A. I., Scherbakov A. M., Tatarskiy V. V., Rusanova J. A., Baranovsky A. V., Zinovich V. G., Khlebnicova T. S., Lakhvich F. A. Novel O-acylated (E)-3-aryl-6,7-dihydrobenzisoxazol-4(5H)-one oximes targeting HSP90-HER2 axis in breast cancer cells // *Bioorg. Med. Chem.* – 2022. – Vol. 53. – P. 116521.
4. Piven Y. A. D., Scherbakov A. M. D., Yastrebova M. A., Sorokin D. V., Shchegolev Y. Y., Matous A. E., Zinovich V. G. D., Khlebnicova T. S. D., Lakhvich F. A. D. Effective synthesis of novel dihydrobenzisoxazoles bearing the 2-aminothiazole moiety and evaluation of the antiproliferative activity of their acylated derivatives // *Org. Biomol. Chem.* – 2021. – Vol. 19, № 47. – P. 10432-10443.