

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 547.786+615.277.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-3-218-226>

Поступила в редакцию 21.05.2024
Received 21.05.2024

**А. О. Воробьева, Д. И. Павлович, Т. В. Чукарина, С. Э. Огурцова,
Ю. А. Пивень, Ф. А. Лахвич**

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь*

**СИНТЕЗ 3-(5-ИЗОПРОПИЛ-2,4-ДИМЕТОКСИФЕНИЛ)-4-МЕТОКСИБЕНЗО[d]
ИЗОКСАЗОЛ-5-АМИНА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ Hsp90**

Аннотация. Основываясь на 3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-6,7-дигидробензо[d]изоксазол-4(5H)-оне – скаффолде для получения новых ингибиторов Hsp90, разработана эффективная схема синтеза 5-амино-4-метоксисбензо[d]изоксазолов. Ключевыми стадиями в синтезе были дибромирование в положение 5, ароматизация и последующее медькатализируемое кросс-сочетание 5-бром-4-метоксисбензо[d]изоксазола с азидом натрия с одновременным восстановлением до 5-амино-4-метоксисбензо[d]изоксазола. С использованием разработанной схемы получен потенциальный ингибитор Hsp90, который проявил высокую антипролиферативную активность в отношении клеток рака молочной железы линий BT-474 ($IC_{50} = 5 \text{ мкМ}$) и умеренную активность в отношении клеток линии MCF-7.

Ключевые слова: бензо[d]изоксазолы, Hsp90, кросс-сочетание, антипролиферативная активность, рак молочной железы

Для цитирования. Синтез 3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-4-метоксисбензо[d]изоксазол-5-амина и его применение для получения новых ингибиторов Hsp90 / А. О. Воробьева, Д. И. Павлович, Т. В. Чукарина [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Т. 61, № 3. – С. 218–226. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-3-218-226>

N. A. Varabyeva, D. I. Paulovich, T. V. Chukarina, S. E. Ogurtsova, Y. A. Piven, F. A. Lakhvich

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**SYNTHESIS OF 3-(5-ISOPROPYL-2,4-DIMETHOXYPHENYL)-4-METHOXYBENZO[d]ISOXAZOLE-
5-AMINE AND ITS APPLICATION FOR THE PREPARATION OF NEW Hsp90 INHIBITORS**

Abstract. An efficient synthetic scheme for 5-amino-4-methoxybenzo[d]isoxazoles has been developed starting from 3-(5-isopropyl-2,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dihydrobenzo[d]isoxazole-4(5H)-one – a scaffold for the preparation of new Hsp90 inhibitors. The key stages in the synthesis included dibromination at position 5, aromatization, and subsequent copper-catalyzed cross-coupling of 5-bromo-4-methoxybenzo[d]isoxazole with sodium azide, with simultaneous reduction to 5-amino-4-methoxybenzo[d]isoxazole. Using the developed scheme, a potential Hsp90 inhibitor was obtained, which showed high antiproliferative activity against breast cancer cells of BT-474 line ($IC_{50} = 5 \text{ }\mu\text{M}$) and moderate activity against MCF-7 cells.

Keywords: benzo[d]isoxazoles, Hsp90, cross-coupling, antiproliferative activity, breast cancer

For citation. Varabyeva N. A., Paulovich D. I., Chukarina T. V., Ogurtsova S. E., Piven Y. A., Lakhvich F. A. Synthesis of 3-(5-isopropyl-2,4-dimethoxyphenyl)-4-methoxybenzo[d]isoxazole-5-amine and its application for the preparation of new Hsp90 inhibitors. *Vesti Natsyunal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2025, vol. 61, no. 3, pp. 218–226 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-3-218-226>

Введение. 1,2-бензизоксазол – это ароматическое соединение, молекула которого состоит из сопряженных изоксазольного и бензольного колец. Данный фрагмент входит в целый ряд медицинских препаратов и различных экспериментальных биологически активных соединений [1]. Из-за широкого применения в медицинской химии 1,2-бензизоксазол часто относят к так называемым привилегированным скаффолдам.

Белок теплового шока 90 (Hsp90) представляет собой молекулярный шаперон, выполняющий основную функцию в созревании и поддержании стабильности широкого спектра белков, которые называют клиентскими. Ингибирование Hsp90 привлекло значительное внимание в качестве терапевтической стратегии лечения рака и других заболеваний, в которых клиенты Hsp90 играют патогенную роль [2]. Было разработано несколько классов ингибиторов Hsp90, включая как соединения природного происхождения, так и синтетические малые молекулы различных классов. Эти соединения связываются с АТФ-связывающим карманом N-концевого домена Hsp90, нарушая его шаперонную активность и приводя к деградации клиентских белков Hsp90 [3]. Согласно данным clinicaltrials.gov для лечения различных видов рака исследовано около 20 ингибиторов Hsp90. Несмотря на многообещающие доклинические и ранние клинические результаты, большинство из них не смогли продемонстрировать достаточную эффективность. На данный момент в мире зарегистрирован лишь один ингибитор Hsp90 – пимитеспиб, одобренный в Японии для лечения рака кишечника [4]. В настоящее время исследования в этой области преимущественно направлены на улучшение селективности и фармакокинетических свойств ингибиторов Hsp90, разработку эффективных стратегий их применения в комбинированной терапии [5, 6].

Одним из классов ингибиторов Hsp90 являются производные резорцина. Люминеспиб (рис. 1), содержащий в своем составе изоксазольный цикл с 2,4-дигидрокси-5-изопропилфенильным заместителем, выступает эффективным ингибитором Hsp90 [7]. Однако во время клинических испытаний это соединение не показало достаточной эффективности и вызывало ряд побочных эффектов [8, 9]. Высокое сродство резорцин-замещенного изоксазольного фрагмента, входящего в структуру молекулы люминеспиба, к Hsp90 позволяет использовать его в качестве основы для дизайна новых более эффективных и безопасных ингибиторов.

Ранее была показана перспективность использования бензизоксазолов в качестве ингибиторов Hsp90 [10]. Наиболее активным оказалось соединение **CXZ** (см. рис. 1), которое ингибировало рост раковых клеток различных линий в диапазоне 0,17–0,37 мкМ.

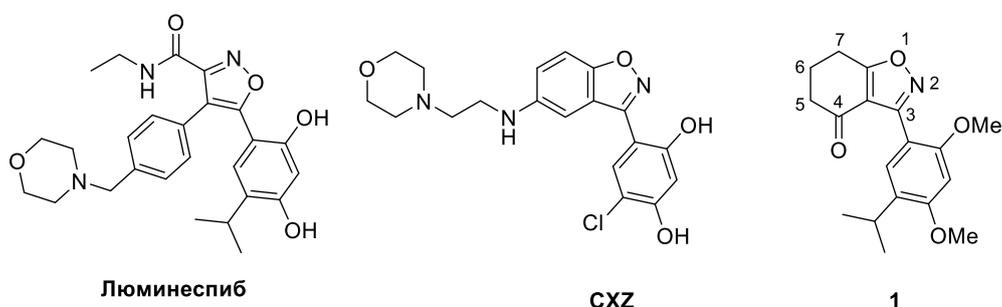
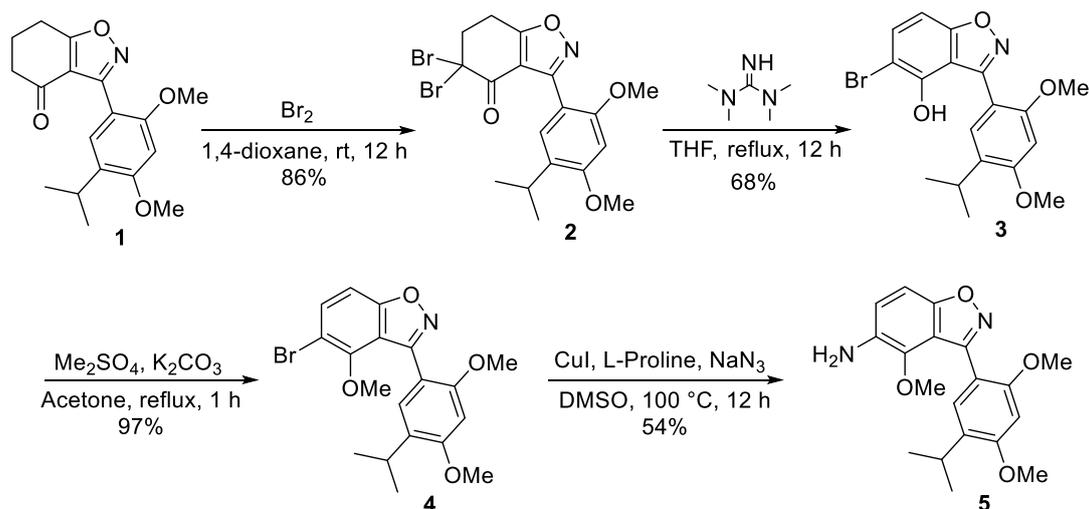


Рис. 1. Структуры известных изоксазолсодержащих ингибиторов Hsp90 люминеспиба, **CXZ** и перспективного скаффолда для получения новых ингибиторов Hsp90 6,7-дигидробензизоксазол-4(5H)-она **1**

Fig. 1. Structures of the known isoxazole-containing Hsp90 inhibitors luminespib, **CXZ** and a promising scaffold for the preparation of new Hsp90 inhibitors 6,7-dihydrobenzisoxazol-4(5H)-one **1**

Целью данного исследования были разработка метода синтеза 4,5-дизамещенных бензизоксазолов на основе полученного нами ранее 6,7-дигидробензизоксазол-4(5H)-она **1** (см. рис. 1) [11] и применение таких соединений для получения новых ингибиторов Hsp90.

Результаты и их обсуждение. 6,7-дигидробензизоксазол-4(5H)-он **1** содержит в своей структуре три положения (4, 5 и 7), по которым он может быть далее модифицирован. Для синтеза целевых 4,5-замещенных бензизоксазолов в данном случае нами использована расположенная в α -положении к карбонилу метиленовая группа. Соединение **1** дибромировали под действием трехкратного избытка брома с получением дибромкетона **2** (выход 86 %), который затем вводили в реакцию элиминирования под действием тетраметилгуанидина в качестве основания. Фенольную гидроксильную группу полученного соединения **3** (выход 68 %) защитили с использованием диметилсульфата и K_2CO_3 , что привело к метоксипроизводному **4** с выходом 97 % (рис. 2).

Рис. 2. Схема синтеза 5-амино-4-метоксибензо[*d*]изоксазола **5**Fig. 2. Scheme for the synthesis of 5-amino-4-methoxybenzo[*d*]isoxazole **5**

Так как для дальнейшей работы представлялось интересным ввести в положении 5 бензизоксазола аминогруппу, которая может использоваться для получения различных амидов, была изучена литература, посвященная методам получения первичных ариламинов из арилгалогенидов. В результате для синтеза анилина **5** был выбран ранее описанный метод [12]. Арилбромид **4** вводили в Cu-катализируемую реакцию кросс-сочетания с азидом натрия в присутствии избытка иодида меди (I), что привело к ключевому амину **5** с выходом 54 % (см. рис. 2).

После анализа кристаллической структуры N-концевого домена Hsp90α в комплексе с соединением **CXZ** (PDB ID : 3VMY) мы предположили, что с точки зрения проявления целевой активности перспективными могут оказаться ацилированные и деметилированные производные амина **5**. Для проверки данной гипотезы нами был проведен докинг соединения **Inh-1** (рис. 3, *a*) в карман связывания АТФ N-концевого домена Hsp90α с использованием программы QVina2 [13]. Предсказанная поза соединения **Inh-1** оказалась близка к экспериментальной позе **CXZ** (рис. 3, *b*). В частности, резорцинзамещенные изоксазольные фрагменты обеих молекул занимают почти идентичные позиции. Примечательно, что для соединения **Inh-1** наблюдается образование дополнительной водородной связи между амидным карбонилем и остатком LYS58 белка (рис. 3, *c*).

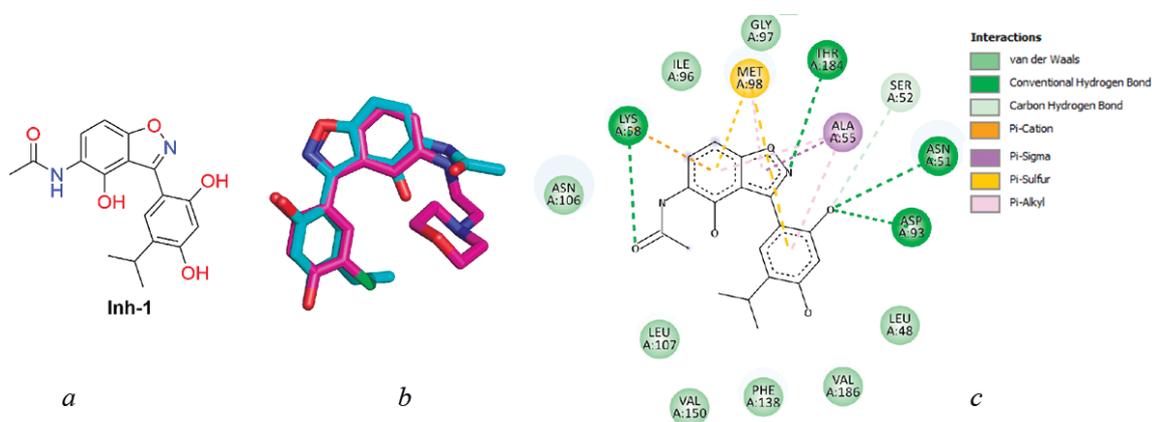
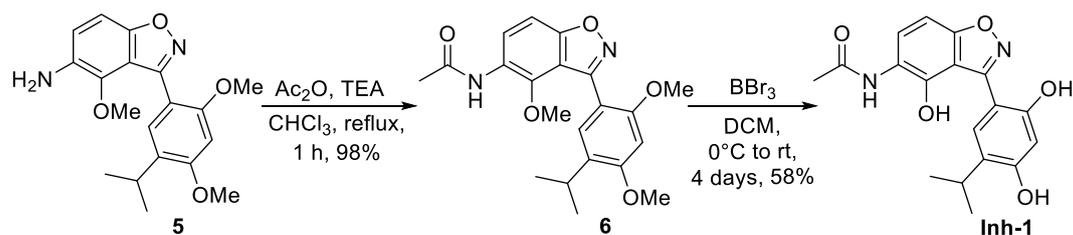


Рис. 3. Структура соединения **Inh-1** (*a*); сравнение теоретической позы **Inh-1** (бирюзовый) с экспериментальной позой соединения **CXZ** (розовый) в комплексе с N-концевым доменом Hsp90α (*b*); 2D представление межмолекулярных взаимодействий **Inh-1** с N-концевым доменом Hsp90α (*c*)

Fig. 3. Structure of the compound **Inh-1** (*a*), comparison of the theoretical pose of **Inh-1** (teal) with the experimental pose of **CXZ** (pink) in complex with N-terminal domain of Hsp90α (*b*); 2D representation of intermolecular interactions of **Inh-1** with N-terminal domain of Hsp90α (*c*)

Рис. 4. Синтез 5-ацетидамо-4-гидроксibenзо[*d*]изоксазола **Inh-1** – потенциального ингибитора Hsp90Fig. 4. Scheme for the synthesis of 5-acetamido-4-hydroxybenzo[*d*]isoxazole **Inh-1** – a potential Hsp90 inhibitor

Значение аффинности, предсказанное оценочной функцией Q_{vina2} , для соединений **Inh-1** и **CXZ** составило $-8,2$ и $-8,1$ ккал/моль соответственно (предсказанная докинггом поза была почти идентична экспериментальной).

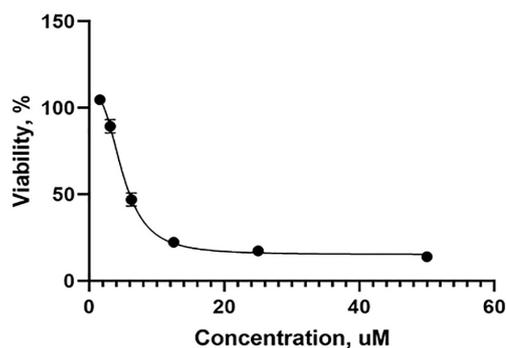
Для получения соединения **Inh-1** ариламин **5** ацилировали уксусным ангидридом, в результате чего был получен ацетамид **6** с высоким выходом 98 %. На последней стадии синтеза было проведено снятие метильных защитных групп с использованием BBr_3 в DCM с образованием конечного соединения **Inh-1** с выходом 58 % (рис. 4).

ЯМР 1H , ^{13}C и масс-спектры всех полученных соединений полностью подтверждают их структуру.

Соединение **Inh-1** было протестировано на антипролиферативную активность в отношении клеток гормонозависимой линии рака молочной железы MCF-7 и HER2-положительной линии рака молочной железы BT-474. HER2 (рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) является клиентом Hsp90, поэтому ингибирование Hsp90 рассматривается как перспективная стратегия борьбы с типами рака со сверхэкспрессией HER2 [14]. В результате проведенных испытаний установлено, что полученное соединение дозозависимо и эффективно подавляло рост клеток BT-474 со значением концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}), равным 5,0 мкМ (рис. 5). Действие на клетки MCF-7 оказалось менее выраженным, их выживаемость при 25 мкМ составила 73 %.

Экспериментальная часть. Спектры ЯМР 1H и ^{13}C записаны на спектрометре Bruker Avance 500 (500 МГц для 1H и 126 МГц для ^{13}C). Значения химических сдвигов в спектрах ЯМР даны относительно остаточных сигналов растворителя ($CDCl_3$, δH 7,26, δC 77,16 м. д.; $DMCO-d_6$, δH 2,50, δC 39,52 м. д.). Константы (J) указаны в Герцах (Гц). Мультиплетность обозначалась следующим образом: с (синглет), д (дублет), т (триплет), к (квартет), г (гептет), м (мультиплет), уш. с (уширенный синглет) или их комбинации. Масс-спектры высокого разрешения были получены на системе Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS с использованием метода ионизации электрораспылением (ESI) и ВЭЖХ Agilent 1200 с масс-спектрометром типа тройной квадруполь Agilent 6410 в режиме ионизации ESI (электроспрей) с детектированием положительных ионов. Температуры плавления измерены на аппарате Voetius. Очистку синтезированных соединений проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле Merck 60 (0,063–0,2 мм). За ходом реакции следили с помощью ТСХ на предварительно покрытых силикагелем пластинках Merck 60 F_{254} . 3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-6,7-дигидробензо[*d*]изоксазол-4(5*H*)-он **1** был получен по ранее описанной методике [11]. Все реагенты были приобретены из коммерческих источников и, если не указано иное, использовались без дополнительной очистки. При необходимости растворители перед применением перегоняли и сушили стандартными методами.

5,5-дибром-3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-6,7-дигидробензо[*d*]изоксазол-4(5*H*)-он (2). К раствору 3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-6,7-дигидробензо[*d*]изоксазол-4(5*H*)-она **1** (1,640 г, 5,2 ммоль, 1 экв.) в диоксане (37 мл) добавляли Br_2 (0,801 мл, 15,6 ммоль, 3 экв.) по каплям, пере-

Рис. 5. Выживаемость клеток линии BT-474, обработанных соединением **Inh-1** в различных концентрациях в течение 72 чFig. 5. Viability of BT-474 cells treated with compound **Inh-1** at various concentrations for 72 h

мешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Реакционную смесь разбавляли водой, продукт экстрагировали DCM (3×15 мл), объединенные органические слои промывали насыщенным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2×10 мл), затем водой (10 мл) и сушили над безводным Na_2SO_4 , растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием смеси петролейный эфир–этилацетат 90 : 10 в качестве элюента. Продукт **2** был получен в виде бесцветных кристаллов (2,088 г, выход 86 %), т. пл. 129–133 °С. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 7,26 с (1H, H_{Ar}), 6,52 с (1H, H_{Ar}), 3,89 с (3H, OCH_3), 3,81 с (3H, OCH_3), 3,23 г (J 6,9 Гц, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 3,17 с (4H, 2CH_2), 1,19 д (J 6,9 Гц, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 177,77, 177,41, 160,18 (C_{Ar}), 159,30 (C_{Ar}), 157,45 (C_{Ar}), 129,12 (C_{Ar}), 127,74 (CH_{Ar}), 110,82 (C_{Ar}), 107,25 (C_{Ar}), 95,16 (CH_{Ar}), 66,06 (CBr_2), 55,85 (OCH_3), 55,65 (OCH_3), 44,67 (CH_2), 26,42 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 23,86 (CH_2), 22,81 (2C, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). HPLC/APCI-MS: m/z вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{NO}_4$ $[M+H]^+$: 473,9, найдено m/z 474,0.

5-бром-3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)бензо[d]изоксазол-4-ол (3). К раствору соединения **2** (2,088 г, 4,4 ммоль, 1 экв.) в сухом ТГФ (45 мл) добавляли TMG (0,829 мл, 4,4 ммоль, 1,5 экв.) при 0 °С, перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч в атмосфере аргона. Растворитель отгоняли при пониженном давлении, остаток растворяли в 20 % HCl (15 мл), продукт экстрагировали этилацетатом (3×5 мл), объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием смеси петролейный эфир–этилацетат 85 : 15 в качестве элюента. Продукт **3** был получен в виде бесцветных кристаллов (1,18 г, выход 68 %), т. пл. 183–186 °С. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 7,80 уш. с (1H, OH), 7,63 д (1H, J 8,8 Гц, H_{Ar}), 7,44 с (1H, H_{Ar}), 7,08 д (1H, J 8,8 Гц, H_{Ar}), 6,63 с (1H, H_{Ar}), 3,94 с (3H, OCH_3), 3,93 с (3H, OCH_3), 3,28 г (J 6,9 Гц, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1,22 д (J 6,9 Гц, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 164,59 (C_{Ar}), 160,10 (C_{Ar}), 155,22 (C_{Ar}), 154,46 (C_{Ar}), 147,86 (C_{Ar}), 134,12 (CH_{Ar}), 131,65 (C_{Ar}), 129,85 (CH_{Ar}), 113,46 (C_{Ar}), 109,73 (C_{Ar}), 103,36 (C_{Ar}), 103,27 (CH_{Ar}), 96,38 (CH_{Ar}), 57,32 (OCH_3), 55,79 (OCH_3), 26,56 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 22,73 (2C, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Масс-спектр высокого разрешения, m/z : вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{BrNO}_4$ $[M+H]^+$: 394,0477, найдено m/z 394,0471.

5-бром-3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-4-метоксибензо[d]изоксазол (4). К раствору соединения **3** (0,880 г, 2,25 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (16 мл) добавляли K_2CO_3 (0,621 г, 4,50 ммоль, 2 экв.), затем диметилсульфат (0,428 г, 3,40 ммоль, 1,5 экв.) по каплям. Полученную смесь кипятили в течение 1 ч в атмосфере аргона. Растворитель отгоняли при пониженном давлении, остаток разбавляли 20 % HCl (15 мл), продукт экстрагировали CHCl_3 (3×5 мл), объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием смеси петролейный эфир–этилацетат 85 : 15 в качестве элюента. Продукт **4** был получен в виде бесцветных кристаллов (0,901 г, выход 97 %), т. пл. 130–134 °С. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 7,67 д (1H, J 8,8 Гц, H_{Ar}), 7,32 с (1H, H_{Ar}), 7,28 д (1H, J 8,8 Гц, H_{Ar}), 6,57 с (1H, H_{Ar}), 3,93 с (3H, OCH_3), 3,81 с (3H, OCH_3), 3,41 с (3H, OCH_3), 3,29 г (J 6,9 Гц, 1H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1,20 д (J 6,9 Гц, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 164,35 (C_{Ar}), 159,47 (C_{Ar}), 157,35 (C_{Ar}), 155,10 (C_{Ar}), 152,08 (C_{Ar}), 134,38 (CH_{Ar}), 129,28 (C_{Ar}), 128,63 (CH_{Ar}), 118,06 (C_{Ar}), 110,10 (C_{Ar}), 109,00 (C_{Ar}), 107,18 (CH_{Ar}), 95,34 (CH_{Ar}), 62,23 (OCH_3), 56,24 (OCH_3), 55,71 (OCH_3), 26,36 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 22,91 (2C, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Масс-спектр высокого разрешения, m/z : вычислено для $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{BrNO}_4$ $[M+H]^+$: 408,0633, найдено m/z 408,0627.

3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-4-метоксибензо[d]изоксазол-5-амин (5). Раствор соединения **4** (1,172 г, 2,89 ммоль, 1 экв.), *L*-пролина (0,32 г, 3,75 ммоль, 1,3 экв.), NaN_3 (0,375 г, 5,77 ммоль, 2 экв.), CuI (0,551 г, 2,89 ммоль, 1 экв.) в ДМСО (11,5 мл) перемешивали при 100 °С в течение 12 ч в атмосфере аргона. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, затем добавляли насыщенный раствор NH_4Cl (10 мл) и этилацетат (10 мл) и перемешивали еще 1 ч. Далее смесь фильтровали через цеолиты и промывали этилацетатом. Полученный раствор промывали насыщенным раствором NaCl (10 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием смеси петролейный эфир–этилацетат 50 : 50 в качестве элюента.

Продукт **5** был получен в виде желтых кристаллов (0,376 г, выход 54 %), т. пл. 137–142 °С. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 7,37 с (1H_{Ar}), 7,20 д (J 8,7 Гц, 1H_{Ar}), 7,03 д (J 8,6 Гц, 1H_{Ar}), 6,57 с (1H_{Ar}), 3,92 с (3H , OCH_3), 3,81 с (3H , OCH_3), 3,30 с (3H , OCH_3), 3,29 г (J 6,9 Гц, 1H , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1,20 д (J 6,9 Гц, 6H , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 159,27 (C_{Ar}), 159,07 (C_{Ar}), 157,24 (C_{Ar}), 154,65 (C_{Ar}), 129,18 (2C_{Ar}), 128,86 (CH_{Ar}), 120,86 (CH_{Ar}), 116,56 (C_{Ar}), 110,06 (2C_{Ar}), 105,68 (CH_{Ar}), 95,55 (CH_{Ar}), 61,40 (OCH_3), 56,40 (OCH_3), 55,68 (OCH_3), 26,28 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 22,92 (2C , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). HPLC/APCI-MS: m/z вычислено для $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 343,2, найдено m/z 343,2.

N-(3-(5-изопропил-2,4-диметоксифенил)-4-метоксибензо[d]изоксазол-5-ил)ацетамид (6). К раствору амина **5** (0,070 г, 0,2 ммоль, 1 экв.) в CHCl_3 (4 мл) добавляли триэтиламин (55,6 мкл, 0,4 ммоль, 2 экв.) и ангидрид уксусной кислоты (28,3 мкл, 0,3 ммоль, 1,5 экв.) по каплям, кипятили при перемешивании в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли CHCl_3 и промывали 20 % HCl (3×5 мл), органический слой сушили над Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с использованием смеси петролейный эфир–этилацетат 40 : 60 в качестве элюента. Продукт **6** был получен в виде бесцветных кристаллов (0,075 г, выход 98 %), т. пл. 140–143 °С. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 8,54 д (J 9,1 Гц, 1H_{Ar}), 7,69 уш. с. (1H , NH), 7,38–7,32 м (2H_{Ar}), 6,57 с (1H_{Ar}), 3,93 с (3H , OCH_3), 3,80 с (3H , OCH_3), 3,37–3,24 м (4H , $\text{OCH}_3 + (\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 2,22 с (3H , CH_3CO), 1,20 д (J 6,9 Гц, 6H , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, CDCl_3), δ , м. д.: 168,49 ($\text{C}=\text{O}$), 161,42 (C_{Ar}), 159,36 (C_{Ar}), 157,23 (C_{Ar}), 154,85 (C_{Ar}), 142,95 (C_{Ar}), 129,46 (C_{Ar}), 128,70 (CH_{Ar}), 126,63 (C_{Ar}), 124,06 (CH_{Ar}), 115,47 (C_{Ar}), 109,58 (C_{Ar}), 105,62 (CH_{Ar}), 95,51 (CH_{Ar}), 62,78 (OCH_3), 56,36 (OCH_3), 55,69 (OCH_3), 26,28 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 24,87 (CH_3CO), 22,91 (2C , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). HPLC/APCI-MS: m/z вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 385,2, найдено m/z 385,2.

N-(3-(2,4-дигидрокси-5-изопропилфенил)-4-гидроксибензо[d]изоксазол-5-ил)ацетамид (Inh-1). К охлажденному до 0 °С раствору соединения **6** (0,065 г, 0,17 ммоль, 1 экв.) в сухом DCM (2 мл) добавляли VBr_3 (0,155 мл, 1,53 ммоль, 9 экв.), перемешивали в течение 4 дней при комнатной температуре в атмосфере аргона. Затем добавляли насыщенный раствор NaHCO_3 (3 мл) при 0 °С и перемешивали еще 1 ч. Продукт экстрагировали этилацетатом (3×5 мл), объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4 . Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток очищали препаративной тонкослойной хроматографией на силикагеле с использованием смеси хлороформ–метанол 93 : 7 в качестве элюента. Продукт **7** был получен в виде бесцветных кристаллов (34 мг, выход 58 %), т. пл. 223–228 °С. Спектр ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{DMCO}-d_6$), δ , м. д.: 10,19 уш. с. (1H , OH), 10,02 уш. с. (1H , NH), 9,59 уш. с. (2H , OH), 7,38 д (1H , J 8,8 Гц, H_{Ar}), 7,16–7,11 м (2H , H_{Ar}), 6,50 с (1H , H_{Ar}), 3,15–3,08 м (1H , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 2,10 с (3H , CH_3CO), 1,14 д (J 6,9 Гц, 6H , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Спектр ЯМР ^{13}C (126 МГц, $\text{DMCO}-d_6$), δ , м. д.: 170,53 ($\text{C}=\text{O}$), 162,08 (C_{Ar}), 156,77 (C_{Ar}), 156,35 (C_{Ar}), 154,48 (C_{Ar}), 145,50 (C_{Ar}), 128,35 (CH_{Ar}), 128,03 (C_{Ar}), 125,16 (C_{Ar}), 120,23 (CH_{Ar}), 113,41 (C_{Ar}), 106,50 (C_{Ar}), 102,57 (CH_{Ar}), 100,14 (CH_{Ar}), 25,84 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 22,96 (CH_3CO), 22,80 (2C , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$). Масс-спектр высокого разрешения, m/z : вычислено для $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 343,1294, найдено m/z 343,1290.

Изучение антипролиферативной активности. Антипролиферативный эффект соединений исследовали в тест-системах клеточных линий опухоли человека карциномы протока молочной железы BT-474 и MCF-7, полученными в Российском банке клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Для анализа использовали МТТ-тест. Принцип метода МТТ основан на способности фермента сукцинатдегидрогеназы митохондриальной мембраны клеток млекопитающих восстанавливать желтую соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) до кристаллов формазана фиолетового цвета, накапливающихся в результате этой реакции в цитоплазме живых клеток. Количество образуемого формазана в клеточном монослое пропорционально имеющемуся количеству живых клеток. Клетки линий BT-474 и MCF-7 культивировали в питательной среде RPMI1640 и DMEM соответственно с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков пенициллина 100 ед/мл, стрептомицина 100 мкг/мл и антимикотика амфотерицина в 25 мкг/мл, инсулина 10 мкл/мл среды (только в среду RPMI1640) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO_2 . Клетки линии BT-474 и MCF-7 сажали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^3 клеток/луночку и инкубировали 24 ч. На следующий день добавляли тестируемые вещества в концентрациях от 1,56 до 50 мкМ.

Исходная концентрация препаратов – 20 мкМ, раствор в ДМСО. В контрольный образец добавляли 0,5 % ДМСО. Препараты разводили до конечных концентраций последовательно инкубационной средой. Клетки культивировали 72 ч с изучаемыми препаратами в стандартных условиях. Для проведения МТТ использовали набор CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega. Для измерения поглощения формазана клетки инкубировали с MTS в течение 225 мин в термостате, измерение поглощения формазана при $\lambda = 492$ нм проведено на приборе для иммуноферментного анализа фирмы Awareness, Microplate Rider Stat Fax 3200. Для каждой концентрации тестируемого препарата вычисляли среднее значение из трех параллельных измерений и рассчитывали жизнеспособность клеток в присутствии исследуемого соединения по формуле:

$$\text{ОП опытных лунок} / \text{ОП контр. лунок} \times 100 \%,$$

где ОП опытных лунок – оптическая плотность образцов с испытуемыми соединениями, ОП контр. лунок – оптическая плотность образцов с растворителем (0,5 % ДМСО). Концентрацию препарата, которая вызывает 50 % ингибирования жизнеспособности клеток (IC_{50}), рассчитывали по уравнению дозозависимой кривой с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.

Молекулярный докинг. Подготовка соединений **CXZ** и **Inh-1** (добавление 3D-координат и оптимизация геометрии) была выполнена с помощью программного обеспечения DataWarrior [15] с использованием силового поля MMFF94s+. Файлы sdf далее были преобразованы в формат mol2 с помощью Open Vabel [16], а файлы mol2 далее преобразованы в файлы pdbqt с использованием скрипта prepare_ligand4.py из пакета AutoDockTools [17]. Для получения файла рецептора из комплекса Hsp90 α с соединением **CXZ** (PDB-код : 3VMY) были удалены молекулы лиганда и воды, далее он был преобразован в файл pdbqt с использованием AutoDockTools. Для ячейки для докинга были установлены следующие параметры: $\Delta X = \Delta Y = \Delta Z = 24$ Å с центром $X = 3$ Å, $Y = 4$ Å, $Z = 19$ Å. Докинг осуществлялся с помощью QVina2 [18]. Для визуализации результатов докинга использовались Discovery Studio Visualizer и PyMol.

Заключение. Разработана эффективная схема получения 5-амино-4-метоксибензо[d]изоксазолов, которая была применена для синтеза перспективного ингибитора Hsp90 **Inh-1**, продемонстрировавшего высокий уровень антипролиферативной активности в отношении клеток рака молочной железы HER2-положительной линии BT-474. На основе синтезированного 5-амино-4-метоксибензо[d]изоксазола **5** в дальнейшем могут быть получены более эффективные аналоги соединения **Inh-1**, а разработанный подход к синтезу 4,5-замещенных бензизоксазолов может найти применение для получения лигандов к различным терапевтическим мишеням.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект X22MC-030).

Acknowledgments. The work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project X22MC-030).

Список использованных источников

1. Benzisoxazole: a privileged scaffold for medicinal chemistry / K. P. Rakesh, C. S. Shantharam, M. B. Sridhara [et al.] // *Medchemcomm.* – 2017. – Vol. 8, № 11. – P. 2023–2039. <https://doi.org/10.1039/c7md00449d>
2. Porter, J. R. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy / J. R. Porter, C. C. Fritz, K. M. Depew // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 2010. – Vol. 14, № 3. – P. 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.019>
3. Targeting HSP90 as a Novel Therapy for Cancer: Mechanistic Insights and Translational Relevance / J. Zhang, H. Li, Y. Liu [et al.] // *Cells.* – 2022. – Vol. 11, № 18. – P. 2778. <https://doi.org/10.3390/cells11182778>
4. Hoy, S. M. Pimitepsib: First Approval / S. M. Hoy // *Drugs.* – 2022. – Vol. 82. – P. 1413–1418. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01764-6>
5. Yu, J. Pan- and isoform-specific inhibition of Hsp90: Design strategy and recent advances / J. Yu, C. Zhang, C. Song // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2022. – Vol. 238. – P. 114516. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114516>
6. Combination therapy involving HSP90 inhibitors for combating cancer: an overview of clinical and preclinical progress / Y. Liu, C. Li, H. Liu, S. Tan [et al.] // *Archives of Pharmacal Research.* – 2024. – Vol. 47. – P. 442–464. <https://doi.org/10.1007/s12272-024-01494-1>

7. 4,5-Diarylisoxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer / P. A. Brough, W. Aherne, X. Barril [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 51, № 2. – P. 196–218. <https://doi.org/10.1021/jm701018h>
8. Activity of the Hsp90 inhibitor luminespib among non-small-cell lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions / Z. Piotrowska, D. B. Costa, G. R. Oxnard [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2018. – Vol. 29, № 10. – P. 2092–2097. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy336>
9. Luminespib plus pemetrexed in patients with non-squamous non-small cell lung cancer / Z. S. Noor, J. W. Goldman, W. E. Lawler [et al.] // *Lung Cancer*. – 2019. – Vol. 135. – P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.05.022>
10. Discovery of benzisoxazoles as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90 / A. Gopalsamy, M. Shi, J. Golas [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 51, № 3. – P. 373–375. <https://doi.org/10.1021/jm701385c>
11. Design and Synthesis of Novel 6,7-Dihydrobenzo[d]isoxazol-4(5H)-one Derivatives Bearing 1,2,3-Triazole Moiety as Potential Hsp90 Inhibitors and their Evaluation as Antiproliferative Agents / N. A. Varabyeva, D. I. Salnikova, S. K. Krymov [et al.] // *ChemistrySelect*. – 2024. – Vol. 9, № 12. – P. e202304812. <https://doi.org/10.1002/slct.202304812>
12. Markiewicz, J. T. Synthesis of primary aryl amines through a copper-assisted aromatic substitution reaction with sodium azide / J. T. Markiewicz, O. Wiest, P. Helquist // *Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – Vol. 75, № 14. – P. 4887–4890. <https://doi.org/10.1021/jo101002p>
13. Trott, O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A. J. Olson // *Journal of Computational Chemistry*. – 2010. – Vol. 31, № 2. – P. 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
14. De Mattos-Arruda, L. Breast cancer and Hsp90 inhibitors: is there a role beyond the HER2-positive subtype? / L. De Mattos-Arruda, J. Cortes // *Breast*. – 2012. – Vol. 21, № 4. – P. 604–607. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.04.002>
15. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis / T. Sander, J. Freyss, M. von Korff, C. Rufener [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2015. – Vol. 55, № 2. – P. 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
16. Open Babel: An open chemical toolbox / N. M. O’Boyle, M. Banck, C. A. James [et al.] // *Journal of Cheminformatics*. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
17. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 2009. – Vol. 30, № 16. – P. 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
18. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2 / A. Alhossary, S. D. Handoko, Y. Mu [et al.] // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31, № 13. – P. 2214–2216. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv082>

References

1. Rakesh K. P., Shantharam C. S., Sridhara M. B., Manukumar H. M., Qin H. L. Benzisoxazole: a privileged scaffold for medicinal chemistry. *Medchemcomm*, 2017, vol. 8, no. 11, pp. 2023–2039. <https://doi.org/10.1039/c7md00449d>
2. Porter J. R., Fritz C. C., Depew K. M. Discovery and development of Hsp90 inhibitors: a promising pathway for cancer therapy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, vol. 14, no. 3, pp. 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.019>
3. Zhang J., Li H., Liu Y., Zhao K., Wei S., Sugarman E. T., Liu L., Zhang G. Targeting HSP90 as a Novel Therapy for Cancer: Mechanistic Insights and Translational Relevance. *Cells*, 2022, vol. 11, no. 18. <https://doi.org/10.3390/cells11182778>
4. Hoy S. M. Pimipib: First Approval. *Drugs*, 2022, vol. 82, pp. 1413–1418. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01764-6>
5. Yu J., Zhang C., Song C. Pan- and isoform-specific inhibition of Hsp90: Design strategy and recent advances. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, vol. 238, pp. 114516. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114516>
6. Liu Y., Li C., Liu H., Tan S. Combination therapy involving HSP90 inhibitors for combating cancer: an overview of clinical and preclinical progress. *Archives of Pharmacal Research*, 2024, vol. 47, pp. 442–464. <https://doi.org/10.1007/s12272-024-01494-1>
7. Brough P. A., Aherne W., Barril X., Borgognoni J., Boxall K., Cansfield J. E. [et al.]. 4,5-diarylisoxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 51, no. 2, pp. 196–218. <https://doi.org/10.1021/jm701018h>
8. Piotrowska Z., Costa D. B., Oxnard G. R., Huberman M., Gainor J. F., Lennes I. T., Muzikansky A., Shaw A. T., Azzoli C. G., Heist R. S., Sequist L. V. Activity of the Hsp90 inhibitor luminespib among non-small-cell lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *Annals of Oncology*, 2018, vol. 29, no. 10, pp. 2092–2097. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy336>
9. Noor Z. S., Goldman J. W., Lawler W. E., Telivala B., Braiteh F., DiCarlo B. A., Kennedy K., Adams B., Wang X., Jones B., Slamon D. J., Garon E. B. Luminespib plus pemetrexed in patients with non-squamous non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2019, vol. 135, pp. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.05.022>
10. Gopalsamy A., Shi M., Golas J., Vogan E., Jacob J., Johnson M., Lee F., Nilakantan R., Petersen R., Svenson K., Chopra R., Tam M. S., Wen Y., Ellingboe J., Arndt K., Boschelli F. Discovery of benzisoxazoles as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 51, no. 3, pp. 373. <https://doi.org/10.1021/jm701385c>
11. Varabyeva N. A., Salnikova D. I., Krymov S. K., Bogdanov F. B., Shchekotikhin A. E., Puzanau R. M., Sorokin D. V., Lakhvich F. A., Scherbakov A. M., Piven Y. A. Design and Synthesis of Novel 6,7-Dihydrobenzo[d]isoxazol-4(5H)-one Derivatives Bearing 1,2,3-Triazole Moiety as Potential Hsp90 Inhibitors and their Evaluation as Antiproliferative Agents. *ChemistrySelect*, 2024, vol. 9, no. 12, pp. e202304812. <https://doi.org/10.1002/slct.202304812>
12. Markiewicz J. T., Wiest O., Helquist P. Synthesis of primary aryl amines through a copper-assisted aromatic substitution reaction with sodium azide. *Journal of Organic Chemistry*, 2010, vol. 75, no. 14, pp. 4887–4890. <https://doi.org/10.1021/jo101002p>

13. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, vol. 31, no. 2, pp. 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

14. De Mattos-Arruda L., Cortes J. Breast cancer and Hsp90 inhibitors: is there a role beyond the HER2-positive subtype? *Breast*, 2012, vol. 21, no. 4, pp. 604–607. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.04.002>

15. Sander T., Freyss J., von Korff M., Rufener C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2015, vol. 55, no. 2, pp. 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>

16. O'Boyle N. M., Banck M., James C. A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>

17. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

18. Alhossary A., Handoko S. D., Mu Y., Kwoh C. K. Fast, accurate, and reliable molecular docking with QuickVina 2. *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 13, pp. 2214–2216. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv082>

Информация об авторах

Воробьева Анастасия Олеговна – аспирант, младший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: varabyevana@iboch.by

Павлович Дмитрий Игоревич – магистрант, младший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dimapavlovich@gmail.com

Чукарина Татьяна Владимировна – научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chukagirl@gmail.com

Огурцова Светлана Эдуардовна – кандидат биологических наук, заведующий отделом. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: s.ogurtsova@iboch.by

Пивень Юрий Андреевич – кандидат химических наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: piven.ya@gmail.com

Лаквич Федор Адамович – академик, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lakhvich@iboch.by

Information about the authors

Varabyeva Nastassia A. – Postgraduate Student, Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: varabyevana@iboch.by

Paulovich Dzmitry I. – Master's Student, Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dimapavlovich@gmail.com

Chukarina Tatyana V. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chukagirl@gmail.com

Ogurtsova Svetlana E. – Ph. D. (Biology), Head of the Department. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s.ogurtsova@iboch.by

Piven Yuri A. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: piven.ya@gmail.com

Lakhvich Fedor A. – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Chief Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lakhvich@iboch.by