

УДК 547.792.1: 615.012.1

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ ТРИАЗОЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ АРОМАТАЗЫ**  
**С.В. Адамчик, А.А. Гилеп, А.В. Иванчик, М.А. Кисель, А.Л. Михальчук, О.А. Рогова,**  
**Т.А. Сушко, С.А. Усанов, А.В. Янцевич***Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*  
*e-mail: asv@iboch.bas-net.by, kisel@iboch.bas-net.by***Введение**

Основной причиной развития гормон-зависимого рака молочной железы (РМЖ) у женщин в постменопаузе является синтез эстрогенов периферическими тканями и опухолевыми клетками [1]. В ткани молочной железы эстрогены играют роль факторов роста опухоли, стимулируя деление и рост клеток [2]. Для подавления стимулирующего влияния эстрогенов на рост клеток злокачественного новообразования молочной железы разработано два основных подхода: 1) предотвращение связывания эстрогенов с рецептором; 2) уменьшение концентрации циркулирующих в крови эстрогенов. При реализации первого подхода используются антиэстрогены. Данные соединения, являясь антагонистами эстрогенов, блокируют связывающий центр рецептора, тем самым предотвращая передачу сигнала [3]. Представителем антиэстрогенов является лекарственное средство *тамоксифен*. Второй подход заключается в уменьшении скорости биосинтеза эстрогенов, которое достигается при использовании ингибиторов ароматазы (цитохром P450<sub>аром</sub>, CYP19A1) - ключевого фермента, катализирующего образование женских половых гормонов из андрогенов [4]. Поиск эффективных ингибиторов ароматазы начался в 1970-х годах и активно продолжается в настоящее время [5].

Использование ингибиторов ароматазы для профилактики и лечения рака молочной железы позволяет существенно снизить уровень циркулирующих в крови эстрогенов. Изучение данной группы лекарственных веществ имеет большое практическое значение, так как рак молочной железы является одним из наиболее распространенных видов онкологических заболеваний среди женщин, а на гормон-зависимый тип приходится третья часть всех случаев. В настоящее время существуют три поколения ингибиторов ароматазы, отличающихся селективностью и эффективностью действия [5-7], но работы по поиску более активных соединений с отсутствием побочных эффектов продолжаются. В этой связи в данной работе обсуждается механизм действия ароматазы и пути ее ингибирования, осуществлен синтез ранее неизвестных триазольных ингибиторов фермента, относящихся к третьему поколению, и исследовано взаимодействие полученных соединений с высокоочищенной рекомбинантной ароматазой человека.

**Механизм ферментативного катализа и ингибиторы ароматазы**

Процесс биосинтеза эстрогенов из андрогенов включает три стадии (рисунок 1). На первых двух осуществляется гидроксирование C-19 метильной группы с образованием *гем*-диола, превращающегося в альдегид. На завершающей стадии происходит ароматизация цикла А с отщеплением C-19 метильной группы андрогена в форме муравьиной кислоты [1, 8, 9].

Установленная в 2009 году кристаллическая структура комплекса ароматаза-андростендион позволила определить топологию индивидуальных аминокислот, участвующих в протекании заключительного третьего этапа ароматизации (рисунок 2). Разработанная модель предполагает, что вначале происходит енолизация связи C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, а затем нуклеофильная атака C-19 карбонильной группы, которая ведет к отщеплению муравьиной кислоты и формированию двойной связи C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> [8].

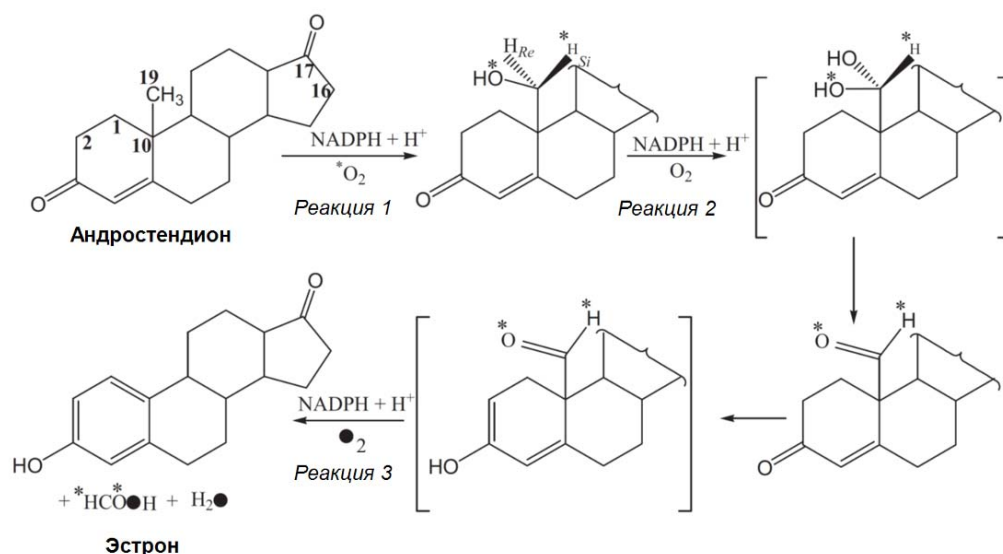


Рисунок 1 – Три стадии реакции образования эстрогенов, катализируемой ароматазой. Путь присоединения кислорода в Реакциях 1 и 3 показан звездочкой и закрашенным атомом, соответственно [9]

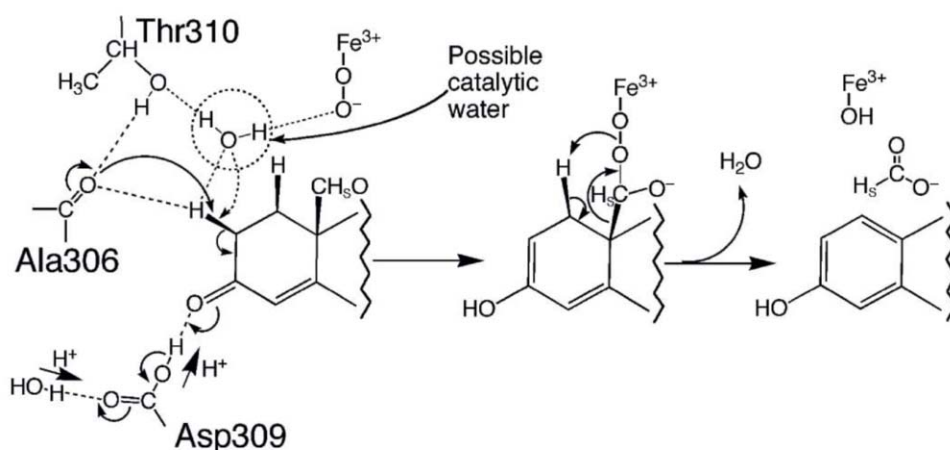


Рисунок 2 – Схема третьего этапа ароматизации и разрыва связи C<sub>10</sub>-C<sub>19</sub> с указанием аминокислот, принимающих участие в реакции [8]

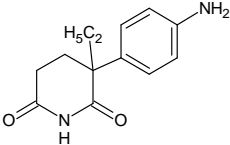
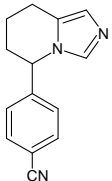
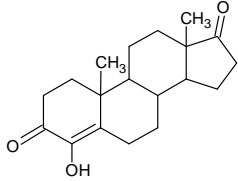
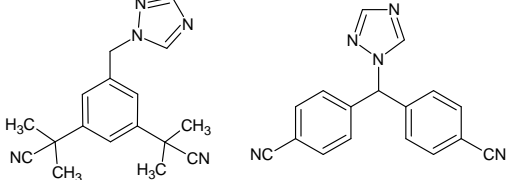
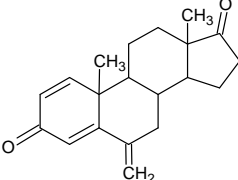
Ингибиторы ароматазы блокируют превращение андрогенов в эстрогены, тем самым снижая уровень эстрогенов в крови, что сопровождается торможением роста гормонально-положительных клеток рака. Среди лекарственных средств для лечения гормон-зависимого рака выделяют три поколения ингибиторов, при этом каждое действующее вещество имеет стероидную либо нестероидную природу (таблица 1) [10].

Представителем первого поколения ингибиторов ароматазы является *аминоглутетимид*. Помимо ароматазы аминоглутетимид ингибирует ряд других изоформ цитохрома P450, участвующих в биосинтезе глюко- и минералокортикоидов, в связи с чем необходима гормонозаместительная терапия глюкокортикоидами [11, 12]. В настоящее время данное лекарственное средство практически не используется при лечении РМЖ.

Ко второму поколению ингибиторов ароматазы относятся *фадрозол* и *форместан* (*4-гидроксиандростендион*). По структуре форместан представляет собой гидроксипроизводное андростендиона – стероида, который является естественным субстратом ароматазы.

Нестероидный ингибитор фадрозол обладает большей селективностью, а его ингибирующая активность в 700 раз выше чем у аминоклутетимида [13].

Таблица 1 – Стероидные и нестероидные ингибиторы ароматазы [10]

	Нестероидные ингибиторы ароматазы	Стероидные ингибиторы ароматазы
<b>Первое поколение</b>	 АМИНОГЛУТЕТИМИД	
<b>Второе поколение</b>	 Фадрозол	 Форместан
<b>Третье поколение</b>	 Анастрозол                      Летрозол	 Экземестан

Высокая активность фадрозола, как ингибитора ароматазы, основана на его структурно-функциональном подобии молекуле естественного субстрата фермента. Сравнение структур нестероидного **1** (фадрозол) и стероидного **2** ингибиторов ароматазы (рисунок 3) позволило определить три основных общих структурных элемента: во-первых, наличие гетероатома, за счет которого происходит взаимодействие с железом гема (N-3 имидазола и атом серы), во-вторых, положение цианогруппы аналогичное карбоксильной группе C-17 и, в-третьих, подобие гидрофобных фрагментов (фенильное кольцо **1** и C-кольцо стероидного ингибитора **2**, а также частично кольцо пиперидина **1** и А-кольцо **2**) [14].

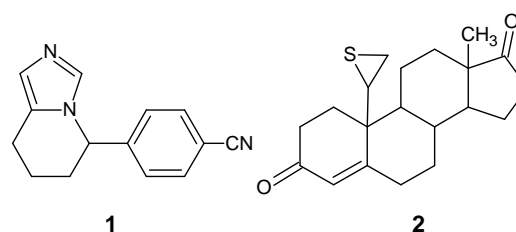
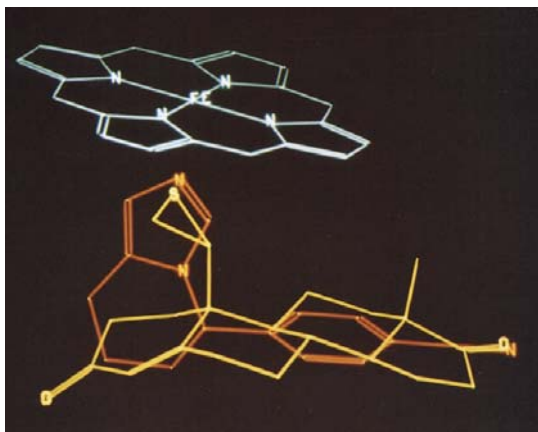


Рисунок 3 – Выравнивание структур имидазольного (фадрозол **1**) и стероидного ингибиторов ароматазы **2** [14]

Результатом дальнейших исследований по улучшению фармакологических характеристик фазрозол стало создание нового эффективного лекарственного средства *летрозол* (Femara®) [15]. Исследования показали, что летрозол не нарушает биосинтез других стероидов, таких как альдостерон, прогестерон, кортикостерон [16-18]. К третьему поколению ингибиторов ароматазы относятся также соединение *анастрозол* (Arimidex®) [19]. В таблице 2 приведены обобщенные данные о суточных дозах лекарственных средств трех поколений ингибиторов ароматазы и их эффективности [5].

Таблица 2 – Эффективность ингибирования и пероральные дозы трех поколений ингибиторов ароматазы

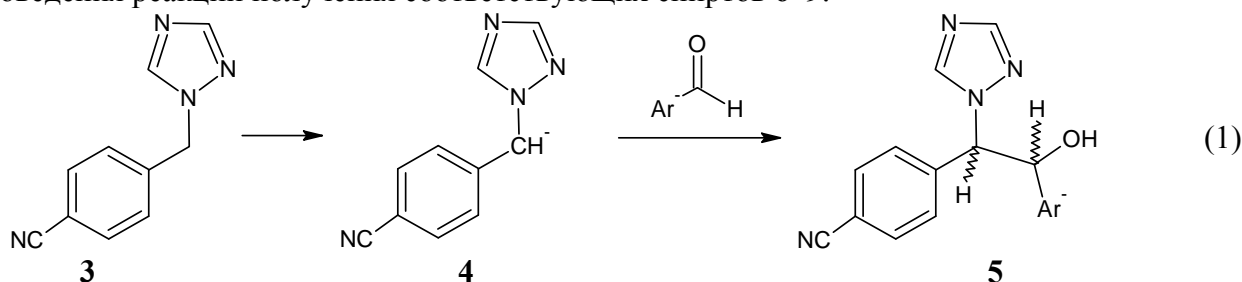
Ингибитор ароматазы		Пероральная доза, мг/день	% Ингибирования	K <sub>i</sub> , нМ	IC <sub>50</sub> , нМ
Первое поколение	Аминоглутетимид	1000	90,6	700	
Второе поколение	Фадрозол*	2	82,4	1,6	30
	4-гидроксиандростендион**	250	84,8	10,2	
Третье поколение	Летрозол	2,5	98,9		11
	Анастрозол	1	96,7		15
	Экземестан**	25	97,9	26	

Примечание: \* – для гидрохлорида, \*\* – стероидные ингибиторы ароматазы

Третье поколение ингибиторов ароматазы характеризуется большей специфичностью, которая выражается в отсутствии влияния на каталитическую активность других ферментов стероидогенеза, а активность данных соединений в 100-1000 раз выше, чем у аминоглутетимида (представитель первого поколения) [5]. Поэтому можно ожидать, что поиск новых аналогов ингибиторов третьего поколения может привести к еще большему уменьшению побочного действия с сохранением терапевтической активности.

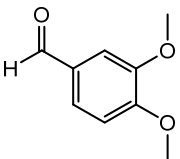
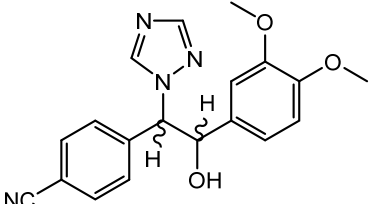
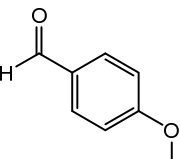
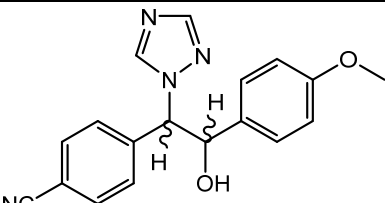
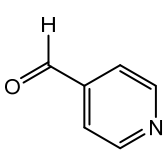
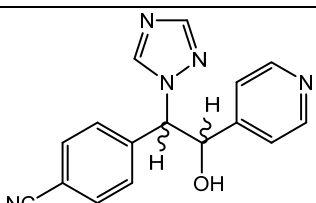
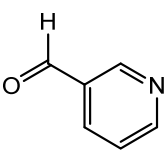
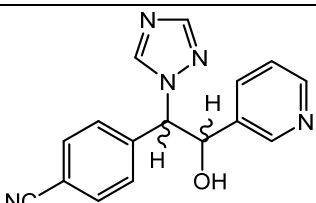
#### Синтез новых арильных производных триазилилметилбензонитрила как потенциальных ингибиторов ароматазы

В данной работе с целью поиска новых аналогов триазольных ингибиторов ароматазы осуществлен синтез производных триазилилметилбензонитрила по реакции нуклеофильного присоединения четырех ароматических альдегидов к генерируемому *in situ* карбаниону (схема 1). В качестве альдегидов использовали 3-пиридинкарбальдегид, 4-пиридинкарбальдегид, анисовый и вератровый альдегиды. В таблице 3 приведены условия проведения реакций получения соответствующих спиртов 6–9.



Необходимый для синтеза триазилилметилбензонитрил **11** получали по известной методике [20] взаимодействием бромметилбензонитрила с аминотриазолом с последующим дезаминированием получаемой четвертичной аммониевой соли.

Таблица 3 – Условия проведения реакции нуклеофильного присоединения

Исходный альдегид	Продукт	Основание	Температура, °С
 Вератровый альдегид	 <b>6</b>	NaH	20-25
 Анисовый альдегид	 <b>7</b>	BuLi	-84
 <b>4-</b> пиридинкарбальдегид	 <b>8</b>		
 <b>3-</b> пиридинкарбальдегид	 <b>9</b>		

Для анисового и пиридиновых альдегидов, как соединений легко подвергающихся реакции диспропорционирования, в качестве основания при проведении реакции нуклеофильного присоединения был выбран бутиллитий. Он необратимо реагирует с **3** с образованием инертного бутана и литиевой соли, где противоионом выступает анион триазолилцианофенилметана **4**. Реакцию проводили в ТГФ при  $-84^{\circ}\text{C}$ . ТГФ обладает высокой растворяющей способностью и при температурах ниже  $-60^{\circ}\text{C}$  устойчив к бутиллитию.

При оптимизации условий проведения реакции (температура, время реакции, количество основания и альдегида, методы обработки реакционной смеси) оптимальными по выходу продукта оказались условия с 10-20% избытком основания (бутиллития) и 10-30% избытком альдегида. Оптимальное время реакции варьирует в пределах 2–4 ч (17–24 ч для анисового альдегида). Максимальные выходы в таких условиях составили 19, 20 и 13% для производных **7**, **8** и **9**, соответственно.

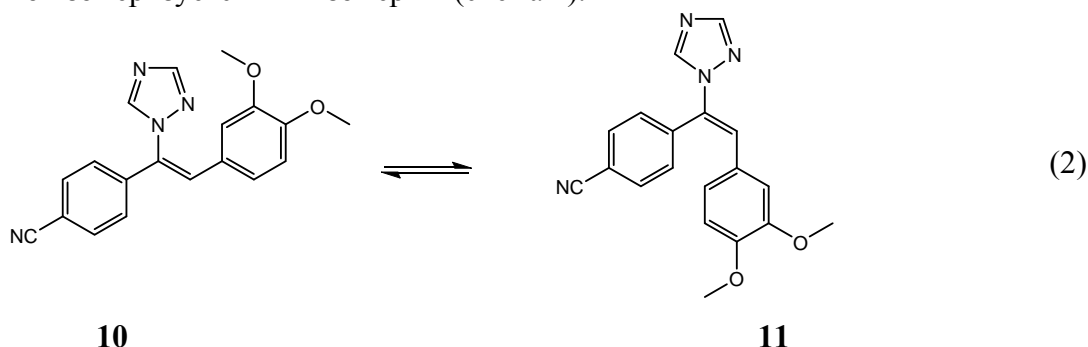
Относительно низкие выходы целевых продуктов можно объяснить протеканием побочных реакций, в первую очередь реакций Канниццаро и Тищенко, которые имеют механизм, аналогичный механизму реакции, используемой нами для получения соединений **6-9**. Высокая скорость побочных реакций (по сравнению с целевой) определяется, очевидно, стерическими факторами, в частности, меньшей доступностью карбонильной группы альдегида для нуклеофильной атаки объемным карбанионом по сравнению с гидроксил- или алколят-ионом.

В реакциях Канниццаро и Тищенко из использованных альдегидов в наименьшей степени диспропорционирует вератровый. Для реакции получения соответствующего спирта **6** удалось значительно повысить выход продукта за счет использования в качестве основания гидроксида натрия. При медленном (в течение 4-х ч) прибавлении разбавленного раствора альдегида к карбаниону удается достичь выхода более 50%.

Обработка реакционных смесей осуществлялась без изменения pH среды для спиртов **8** и **9**. Производное с анисовым альдегидом **7** получали в виде нерастворимого в воде гидрохлорида путем обработки реакционной смеси 0,1 М соляной кислотой с последующей перекристаллизацией продукта из этанола.

Из полученных в результате конденсации спиртов соединения **7–9** оказались достаточно устойчивыми. С кислотами они легко образуют соли и не дегидратируются даже при кипячении в *o*-ксилоле в присутствии соляной кислоты (при более высоких температурах в присутствии кислот соединения разлагаются). Производное **6** с вератровым альдегидом оказалось неустойчивым и легко подвергалось дегидратации в присутствии следовых количеств кислоты либо при кипячении в этаноле, что было использовано при получении конечных олефинов без выделения промежуточного спирта. При этом единственным продуктом дегидратации спирта является чистый (*Z*)-4-(2-(3,4-диметоксифенил)-1-(1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)винил)бензонитрил **10**.

В ходе работы обнаружено, что получаемый *Z*-олефин **10** в растворах при действии света обратимо изомеризуется в *E*-изомер **11** (схема 2).



Для исследования процесса фотоизомеризации *Z*-изомер **18** растворили в дейтерохлороформе и оставили полученный раствор на свету. За процессом взаимопревращения олефинов следили с помощью ЯМР-спектроскопии. Соотношение изомеров считали по интегральной площади пиков <sup>1</sup>H-спектра. Структуру изомеров определяли с помощью методов HSQC и NOESY двумерной ЯМР-спектроскопии. Полученные данные по соотношению изомеров приведены на рисунке 4. Как следует из рисунка, процесс изомеризации приводит к образованию равновесной смеси *Z*- и *E*-изомеров в соотношении 1:1.

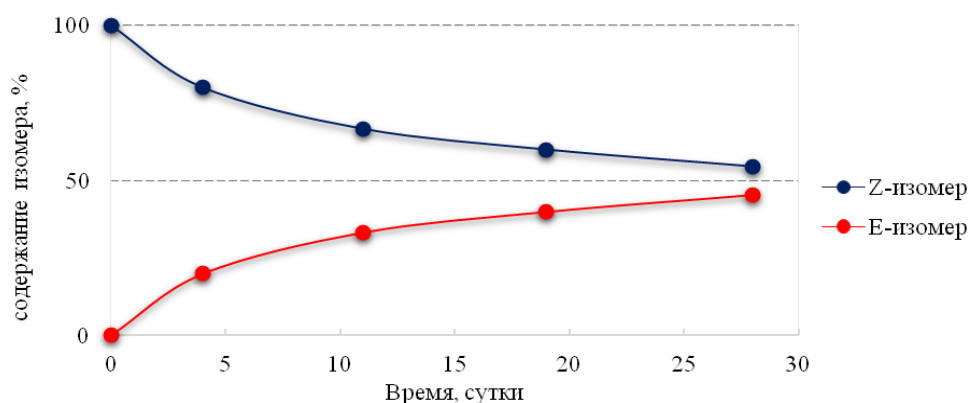
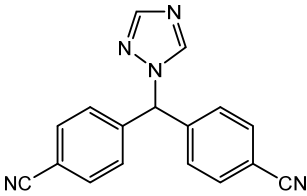
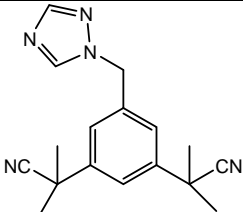
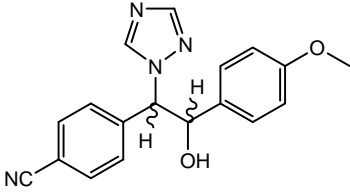
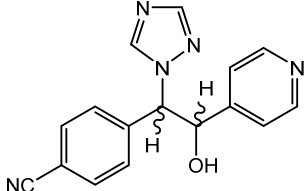
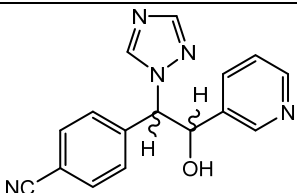
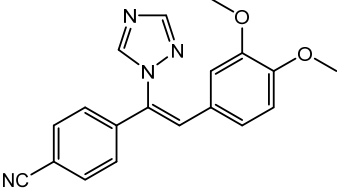
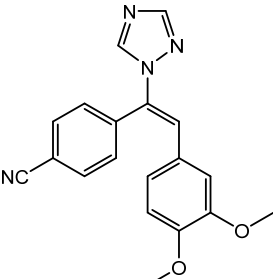


Рисунок 4 – Превращение *Z*-изомера **10** 4-[(2-(3,4-диметоксифенил)-1-(1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)винил] бензонитрила в *E*-изомер **11** при хранении раствора на свету

Заключительным этапом работы было проведение первичного скрининга, который состоял в определении констант диссоциации полученных соединений с рекомбинантной ароматазой человека. Константы диссоциации отражают прочность образуемого фермент-лигандного комплекса, а, следовательно, могут быть использованы как параметры для сравнения ингибирующей активности конкурентных ингибиторов. Среди исследованных соединений наибольшей способностью связываться с ароматазой обладает производное **11** ( $K_d=0,00271$ ). Полученные численные результаты оказались сопоставимы с таковыми для летрозолола ( $K_d=0,00303$ ).  $K_d$  для структур **7**, **8** и **9** равны 0,159, 0,885 и 2,29, соответственно, что указывает на более слабое связывание данных соединений с ароматазой по сравнению с летрозололом и анастрозолом (таблица 4). Способность связываться с ароматазой у изомеров **8** и **9** отличается более чем в 2 раза (производное 3-пиридинового альдегида **9** менее активно). Для *Z*-изомера **10** данных получить не удалось ввиду малой растворимости вещества. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при поиске новых триазольных ингибиторов ароматазы следует учитывать функциональные и пространственные особенности их структуры, которые определяют эффективное взаимодействие с активным центром фермента.

Таблица 4 – Константы диссоциации комплексов исследуемых веществ с ароматазой

Вещество		$K_d$ , мкМ
Зарегистрированные ЛС	 Летрозол	0,00303
	 Анастрозол	0,0153
Новые соединения	 <b>7</b>	0,159
	 <b>8</b>	0,885
	 <b>9</b>	2,29

<i>Продолжение таблицы 4</i>		
	<b>Вещество</b>	<b>K<sub>d</sub>, мкМ</b>
<b>Новые соединения</b>	 <p style="text-align: center;"><b>10</b></p>	–
	 <p style="text-align: center;"><b>11</b></p>	0,00271

### Экспериментальная часть

В экспериментальной работе использовали 4-бромметилбензонитрил, 4-фторбензонитрил, анисовый альдегид производства Aldrich, 4-амино-1,2,4-триазол производства Fluka, бутиллитий (2,5 М раствор), 4- и 3-пиридинкарбальдегиды производства Acros Organics. Вератровый альдегид дважды перекристаллизован из этанола. Все растворители перед использованием очищены перегонкой.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинах Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck.

Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре LCQ-Fleet в составе хромато-масс-спектрометрической системы Accela (Thermo Sci.). Для электронной спектроскопии использовали двухлучевой спектрофотометр Specord M400. Спектры <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР сняты на приборе AVANCE 500 фирмы Брукер-Биоспин. ВЭЖХ-анализ проводили на хроматографе Agilent 1200 (колонка Zorbax XDB C18; 4,6x50 мм; 1,8 мкм), оснащенный диодно-матричным детектором.

*(Z)*-4-(2-(3,4-диметоксифенил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)винил)бензо-нитрил **10**. 1,0 г (5,4 ммоль) триазилилметилбензонитрила растворили в 5 мл ТГФ и в полученном растворе суспензировали 0,389 г (16,2 ммоль) гидрида натрия в течение 1 ч. Затем в течение 4 ч по каплям добавляли раствор 1,795 г (10,8 ммоль) вератрового альдегида в 15 мл ТГФ. Реакционную смесь подкисляли до нейтральной реакции 0,1 М раствором соляной кислоты и разбавляли водой (10 мл). Непрореагировавший альдегид экстрагировали 5 мл диэтилового эфира. Затем экстрагировали продукт четырьмя объемами хлористого метилена по 5 мл. Экстракт сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель упаривали, получившееся масло растворяли в минимальном объеме кипящего этанола и охлаждали. Выпавшие кристаллы промывали 2 мл этанола, высушивали. Выход 0,502 г (53%). Температура плавления: 203-204 °С (из этанола). R<sub>f</sub>=0,61 (хлороформ/метанол 15:1, по объему). <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 8,11 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 7,66 (д, 2H, J=8,7 Гц), 7,30 (д, 2H, J=8,7 Гц), 7,26 (с, 1H), 6,79 (д, 1H, J=8,3 Гц), 6,65 (дд, 1H, J<sub>1</sub>=8,3 Гц, J<sub>2</sub>=1,7 Гц), 6,09 (д, 1H, J=1,7 Гц), 3,88 (с, 3H), 3,64 (с, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125МГц, CDCl<sub>3</sub>, TMS), δ (ppm): 153,36, 150,47, 149,06, 145,46, 140,65, 132,63, 130,86, 130,13, 125,80, 125,27, 123,62, 118,41, 112,27, 111,10, 110,24, 55,91, 55,58; Масс-спектр (m/z): 333,15 (MH<sup>+</sup>).

*(E)*-4-(2-(3,4-диметоксифенил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)винил)бензо-нитрил **11**. 200 мг *(Z)*-4-(2-(3,4-диметоксифенил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)винил)бензонитрила растворили в 10



мл ацетонитрила и выдерживали на свету 28 суток. Затем растворитель упаривали и остаток перекристаллизовали из кипящего этанола. Маточный раствор сконцентрировали и повторили процедуру кристаллизации. Выпавшие кристаллы отфильтровали и высушили. Выход: 70 мг (35 %). Чистота по данным ЯМР >99%. Температура плавления: 169-171°C (из этанола).  $R_f=0,57$  (хлороформ/метанол 15:1, по объему).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 8,11 (с, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,73 (д, 2H,  $J=8,3$  Гц), 7,49 (д, 2H,  $J=8,3$  Гц), 7,21 (с, 1H), 6,73 (д, 1H,  $J=8,3$  Гц), 6,69 (дд, 1H,  $J_1=8,3$  Гц,  $J_2=1,9$  Гц), 6,51 (д, 1H,  $J=1,6$  Гц), 3,87 (с, 3H), 3,59 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125МГц,  $\text{CDCl}_3$ , TMS),  $\delta$  (ppm): 152,51, 149,50, 148,68, 142,64, 138,42, 132,95, 131,84, 131,13, 125,61, 124,56, 123,06, 118,01, 113,37, 111,91, 111,03, 55,86, 55,48; Масс-спектр (m/z): 333,15 ( $\text{MH}^+$ ).

*4-(2-гидрокси-2-(4-метоксифенил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)этил) бензонитрил 7.* К раствору 1,0 г (5,4 ммоль) триазолилметилбензонитрила в 15 мл ТГФ при -84 °С добавили 3,2 мл 2,5 М раствора бутиллития и перемешивали 20 мин. Затем в течение 90 мин тремя равными порциями добавили 1,31 мл (10,8 ммоль) анисового альдегида в 5 мл ТГФ. Температуру постепенно повышали до комнатной и перемешивали реакционную смесь в течение 17 ч. Затем смесь подкисляли до pH=7 0,1 М раствором соляной кислоты, ТГФ упарили, остаток растворили в кипящем этаноле. Полученный раствор выдержали сутки при +5 °С, выпавшие кристаллы отфильтровали, промыли спиртом и высушили. Выход 0,383 г в виде гидрохлорида (19 %). Температура плавления 183 °С (из этанола).  $R_f=0,26$  (хлороформ/метанол 15:1, по объему).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $d_6$ -ДМСО),  $\delta$  (ppm): 8,99 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,70 (д, 2H,  $J=8,5$  Гц), 7,56 (д, 2H,  $J=8,5$  Гц), 7,21 (д, 2H,  $J=8,7$  Гц), 6,76 (д, 2H,  $J=8,7$  Гц), 5,94 (д, 1H,  $J=9$  Гц), 5,37 (д, 1H,  $J=9$  Гц), 3,67 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125МГц,  $d_6$ -ДМСО),  $\delta$  (ppm): 158,48, 150,26, 144,09, 142,13, 132,90, 132,03, 129,43, 128,30, 118,37, 113,28, 110,64, 73,19, 68,677, 54,87; Масс-спектр (m/z): 321,02 ( $\text{MH}^+$ ).

*4-(2-гидрокси-2-(пиридин-4-ил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)этил) бензонитрил 8.* К раствору 0,5 г (2,7 ммоль) триазолилметилбензонитрила в 20 мл ТГФ при -84 °С добавили 1,1 мл 2,5 М раствора бутиллития и перемешивали 20 мин. Затем в течение 90 мин по каплям добавили 0,274 мл (3,0 ммоль) 4-пиридинкарбальдегида в 2 мл ТГФ. Перемешивали 90 мин при постепенном повышении температуры реакционной смеси до комнатной. Растворитель упаривали, остаток растворяли в минимальном объеме ацетона и разбавили водой (20 мл). Полученный раствор выдержали сутки при +5 °С, выпавшие кристаллы отфильтровали, промыли водой и высушили. Выход 0,158 г (20%). Температура плавления 193-195°C.  $R_f=0,51$  (хлороформ/метанол 5:1, по объему).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  (ppm): 8,38 (д, 2H,  $J=5,8$  Гц), 8,35 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 7,77 (д, 2H,  $J=8,3$  Гц), 7,71 (д, 2H,  $J=8,3$  Гц), 7,31 (д, 2H,  $J=5,8$  Гц), 5,77 (д, 1H,  $J=8,0$  Гц), 5,57 (д, 1H,  $J=8,0$  Гц);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  (ppm): 152, 83, 152,63, 150,09, 145,32, 142,66, 133,29, 131,29, 123,40, 119,42, 113,58, 74,43, 69,29; Масс-спектр (m/z): 292,02 ( $\text{MH}^+$ ), 223,23.

*4-(2-гидрокси-2-(пиридин-3-ил)-1-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)этил) бензонитрил 9.* К раствору 0,5 г (2,7 ммоль) триазолилметилбензонитрила в 20 мл ТГФ при -84 °С добавили 1,1 мл 2,5 М раствора бутиллития и перемешивали 20 мин. Затем в течение 90 мин по каплям добавили 0,385 мл (4,1 ммоль) 3-пиридинкарбальдегида в 2 мл ТГФ. Перемешивали 60 мин при постепенном повышении температуры реакционной смеси до комнатной. Затем растворитель упарили до 1мл, остаток разбавили диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровали, промыли эфиром, растворили в минимальном объеме смеси ацетон/вода 5:1 и разбавили водой (20 мл). Полученный раствор выдержали сутки при +5 °С, выпавшие кристаллы отфильтровали, промыли водой и высушили. Выход 0,1 г (13 %). Температура плавления 192-193 °С.  $R_f=0,52$  (хлороформ/метанол 5:1, по объему).  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  (ppm): 8,36 (д, 1H,  $J=2,0$  Гц), 8,34 (дд, 1H,  $J_1=4,8$  Гц,  $J_2=1,4$  Гц), 8,32 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 7,77 (д, 2H,  $J=8,3$  Гц), 7,76 (д, 1H,  $J=7,7$  Гц), 7,71 (д, 2H,  $J=8,3$  Гц), 7,3 (м, 1H), 5,78 (д, 1H,  $J=8,3$  Гц), 5,57 (д, 1H,  $J=8,3$  Гц);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$  (ppm): 152,67, 149,76,

148,87, 145,28, 143,09, 138,94, 136,63, 133,32, 131,20, 125,08, 119,44, 113,56, 73,68, 69,52; Масс-спектр (m/z): 292,14 (МН<sup>+</sup>).

#### Определение констант диссоциации лиганд-ферментных комплексов

В качестве критерия для оценки перспективности применения новых соединений в качестве ИА выбрали константу диссоциации ( $K_d$ ) комплекса ароматаза-лиганд. В экспериментах использовали препарат высокоочищенной рекомбинантной ароматазы человека, синтезированной в клетках *E. coli* и очищенной с использованием металоаффинной хроматографии. Константы диссоциации комплекса определяли методом разностной спектрофотометрии на приборе Shimadzu UV3000 (Япония).

В две кварцевые кюветы помещали раствор фермента в 50 мМ калий-фосфатном буфере с концентрацией 1 мкМ и регистрировали базовую линию в оптическом диапазоне 350-500 нм. Затем в опытную кювету добавляли раствор ингибитора, последовательно увеличивая концентрацию, в контрольную – такой же объем растворителя исследуемого вещества (метанол). Растворы в кюветах тщательно перемешивали пипетированием и регистрировали разностный спектр в указанном оптическом диапазоне. Для титрования использовали концентрации ингибитора в диапазоне 0,1-50 мкМ. Шаг титрования выбирали в зависимости от интенсивности спектральных изменений. Для определения  $K_d$  концентрационную зависимость амплитуды спектральных изменений аппроксимировали уравнением для прочного связывания с помощью программы Origin.

$$A = \left( \frac{\Delta A_{\max} (S + E_t + K_d)}{2E_t} \right) \sqrt{(S + E_t + K_d)^2 - 4SE_t}, \text{ где}$$

S – общая концентрация лиганда, мкМ,

$E_t$  – общая концентрация фермента, мкМ,

A – амплитуда спектральных изменений,

$A_{\max}$  – амплитуда спектральных изменений при насыщающей концентрации лиганда,

$K_d$  – константа диссоциации комплекса фермент-лиганд, мкМ.

#### Список литературы

1. Subramanian, A. Oestrogen producing enzymes and mammary carcinogenesis: a review / A. Subramanian, M. Salhab, K. Mokbel // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2008. – Vol. 111. – P. 191–202.
2. Dickson, R.B. Growth factors in breast cancer / R.B. Dickson, M.E. Lippman // *Endocr. Rev.* – 1995. – Vol. 16. – P. 559–589.
3. Ponzzone, R. Antihormones in prevention and treatment of breast cancer / R. Ponzzone [et al.] // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1089. – P. 143–158.
4. Brodie, A. M. H. Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment / A.M.H. Brodie, V. C. O. Njar // *Steroids.* – 2000. – Vol. 65. – P. 171–179.
5. Brueggemeier, R. W. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer / R.W. Brueggemeier, J. C. Hackett, E. S. Diaz-Cruz // *Endocr. Rev.* – 2005. – Vol. 26, №3. – P.331–345.
6. Recanatini, M. Nonsteroidal aromatase inhibitors: recent advances / M. Recanatini, A. Cavalli, P. Valenti // *Med. Res. Rev.* – 2002. – Vol. 22, № 3. – P. 282–304.
7. Schneider, R. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in post-menopausal female patients: an update / R. Schneider, A. Barakat, J. Pippen, C. Osborne // *Breast Cancer: Targets & Therapy.* – 2011. – Vol. 3. – P. 113–125.
8. Ghosh, D. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase / D. Ghosh, J. Griswold, M. Erman, W. Pangborn // *Nature.* – 2009. – Vol. 457. – P. 219–223.

9. Akhtar, M. A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17 $\alpha$ -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) / M. Akhtar, J. Neville Wright, P. Lee-Robichaud // *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* – 2011. – Vol. 125, № 1–2. – P. 2–12.
10. Hong, Y. Aromatase inhibitors. Structural features and biochemical characterization / Y. Hong, S. Chen // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 1089. – P. 237–251.
11. Pittman, J. A. Antithyroid and antiadrenocortical activity of aminoglutethimide / J.A. Pittman, R. W. Brown // *J. Clin. Endocrin. Metab.* – 1966. – Vol. 26. – P. 1014–1016.
12. Антоненкова, Н. Н. Эндокринотерапия больных раком молочной железы путем ингибирования и инактивации фермента ароматазы / Н. Н. Антоненкова // *Медицина.* – 2006. – Т. 1. – С. 42–45.
13. Coombes, R.C. 4-Hydroxyandrostendione in treatment of post-menopausal patients with advanced breast cancer / R.C. Coombes [et al.] // *Lancet.* – 1984. – Vol. 2. – P. 1237–1239.
14. Lang, M. Structure-activity relationships and binding model of novel aromatase inhibitors / M. Lang [et al.] // *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* – 1993. – V. 44. N. 4–6. – P. 421–428.
15. Bhatnagar, A.S. The discovery and mechanism of saction of letrozole / A.S. Bhatnagar // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2007. – Vol. 105. – P. 7–17.
16. Bhatnagar, A. S. Highly selective inhibition of estrogen biosynthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor / A. S. Bhatnagar [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990. – Vol. 37, № 6. – P. 1021–1027.
17. Bisagni, G. Letrozole, a new oral non-steroidal aromastase inhibitor in treating postmenopausal patients with advanced breast cancer. A pilot study / G. Bisagni [et al.] // *Ann. Oncol.* – 1996. – Vol. 7, № 1. – P. 99–102.
18. Bajetta, E. Double-blind, randomised, multicentre endocrine trial comparing two letrozole doses, in postmenopausal breast cancer patients / E. Bajetta [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 35, № 2. – P. 208–213.
19. Plourde, P.V. Arimidex: a potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor / P.V. Plourde, M. Dyroff, M. Dukes // *Breast Cancer Res. Treat.* – 1994. – Vol. 30, № 1. – P. 103–111.
20. Патент WO2004/076409 / H. Patel et al. 2004.

## SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NEW TRIAZOLE AROMATASE INHIBITORS

S. Adamchik, A. Gilep, A. Ivanchik, M. Kisel, A. Mihalchuk, A. Rohava, T. Sushko,  
S. Usanov, A. Yantsevich

*Institute of Bioorganic Chemistry NAS Belarus, Minsk, Belarus*  
*e-mail: asv@iboch.bas-net.by, kisel@iboch.bas-net.by*

Nowadays aromatase inhibitors are widely used for the treatment of hormone responsible breast cancer. The aim of the research was to study the synthesis and properties of novel triazole aromatase inhibitors. As a criterion for estimate the prospects of the use of the synthesized compounds was chosen the constant of dissociation of the complex aromatase-ligand. The constant of dissociation of the complex was determined by differential spectrophotometry. The result of the work is the synthesis of novel triazole aromatase inhibitors - products of reaction triazolymethylbenzotrile with aromatic aldehydes (anisic, veratric, pyridine-4-carbaldehyde and pyridine-3-carbaldehyde). Among the obtained substances for 4-[(*E*)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)ethenyl]benzotrile the constant of dissociation is comparable to that of known aromatase inhibitors - letrozole and anastrozole which are used in medical practice. The obtained results show the prospects of further research to find new aromatase inhibitors among triazole derivatives which structurally similar to letrozole.