

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ
НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА-4(1H)-ОНА
В МОДЕЛЯХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКИХ IN VITRO**

**Кит О.И.¹, Франциянц Е.М.¹, Кодониди И.П.², Каплиева И.В.¹, Алексеев Э.К.¹,
Глушко А.А.², Качесова П.С.¹, Филиппова С.Ю.¹, Межевова И.В.¹,
Черяпкин А.С.², Шихлярова А.И.¹, Шалашная Е.В.¹, Волкова В.Л.¹**

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: vnp.kachesova@gmail.com;

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «ВолГМУ»
Минздрава России, Пятигорск

Протеинкиназы, в частности рецептор эпидермального фактора роста, играют ключевую роль в онкогенезе, что делает их мишенями для таргетной терапии. Разработка отечественных ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста актуальна для обеспечения лекарственной независимости России. Проблема преодоления резистентности к существующим ингибиторам также подчеркивает необходимость создания новых эффективных соединений. Целью работы явилась оценка противоопухолевой активности нового производного пиримидин-4(1H)-она на клеточных линиях немелкоклеточного рака лёгкого: A549 и NCI-H1299. Проведены *in vitro* тесты: анализ жизнеспособности клеток после 24, 48 и 72 часов инкубации с соединением (0,022–22,47 μ M) и анализ на апоптоз/некроз. Новое производное пиримидин-4(1H)-она проявило дозо- и времязависимую цитотоксичность в отношении NCI-H1299 (концентрация полумаксимального ингибирования $\sim$ 12 μ M), индуцируя некроз и апоптоз. Клеточная линия A549 имела низкую чувствительность к соединению (жизнеспособность клеток >75%), вероятно, из-за наличия мутации гомолога вирусного онкогена саркомы крысы Кирстена. Таким образом, новое производное обладает избирательной активностью против NCI-H1299, что указывает на его потенциал в качестве ингибитора рецептора эпидермального фактора роста. Для изучения механизмов действия, селективности и оптимизации структуры соединения необходимы дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: ингибитор рецептора эпидермального фактора роста, производное пиримидин-4(1H)-она, клеточная линия немелкоклеточного рака лёгкого человека.

**ANTITUMOR ACTIVITY OF A NOVEL PYRIMIDIN-4(1H)-ONE
DERIVATIVE IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER MODELS IN VITRO**

**Kit O.I.¹, Frantsiyants E.M.¹, Kodonidi I.P.², Kaplieva I.V.¹, Alexeev E.K.¹
Glushko A.A.², Kachesova P.S.¹, Filippova S.Yu.¹, Mezhevova I.V.¹, Chiryapkin A.S.²,
Shikhlyarova A.I.¹, Shalashnaya E.V.¹, Volkova V.L.¹**

¹National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Rostov-on-Don, e-mail: vnp.kachesova@gmail.com;

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of
Higher Education VolgGMU of the Ministry of Health of the Russian Federation, Pyatigorsk

Protein kinases, particularly the epidermal growth factor receptor, play a key role in oncogenesis, making them targets for targeted therapy. The development of domestic epidermal growth factor receptor inhibitors is crucial for ensuring Russia's drug independence. The challenge of overcoming resistance to existing inhibitors also highlights the need to create new effective compounds. The aim of this study was to evaluate the antitumor activity of a novel pyrimidin-4(1H)-one derivative on non-small cell lung cancer cell lines: A549 and NCI-H1299. *In vitro* tests were conducted: cell viability analysis after 24, 48, and 72 hours of incubation with the compound (0.022–22.47 μ M) and apoptosis/necrosis analysis. The novel pyrimidin-4(1H)-one derivative exhibited dose- and time-dependent cytotoxicity against NCI-H1299 (half-maximal inhibitory concentration $\sim$ 12 μ M), inducing necrosis and apoptosis. The A549 cell line showed low sensitivity to the compound (cell viability >75%), likely due to the presence of a Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog mutation. Thus, the novel derivative demonstrates selective activity against NCI-H1299, suggesting its potential as an epidermal growth factor receptor inhibitor. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to investigate its mechanisms of action, selectivity, and structural optimization.

Keywords: epidermal growth factor receptor inhibitor, pyrimidin-4(1h)-one derivative, human non-small cell lung cancer cell line.

Введение

Протеинкиназы, являясь ключевыми компонентами клеточных сигнальных путей, участвуют в регуляции гомеостаза (рост, пролиферация, апоптоз) и тесно связаны с процессами онкогенеза, что делает их перспективными мишенями для таргетной терапии онкологических заболеваний [1-3]. В частности, низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы (ИТК) рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), характеризующегося гиперэкспрессией или активирующими мутациями при различных типах опухолей, успешно применяются в клинической практике на протяжении нескольких десятилетий [4]. К таким препаратам относятся гефитиниб (ZD1839), эрлотиниб (CID176870), осимертиниб (AZD9291) и другие соединения, демонстрирующие высокую эффективность в терапии немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) [5; 6].

На российском фармацевтическом рынке представлены зарубежные оригинальные ИТК EGFR и их дженерики. В то же время разработка отечественных оригинальных таргетных препаратов является приоритетной частью стратегии развития фармацевтической отрасли РФ, направленной на обеспечение лекарственной независимости [7]. К настоящему времени зарегистрирована одна оригинальная российская фармацевтическая субстанция – алофаниб (RPT835), прошедшая первую фазу клинических испытаний и представляющая собой аллостерический низкомолекулярный ингибитор рецептора фактора роста фибробластов 2 типа (FGFR 2) [8].

Актуальность разработки новых ИТК EGFR также обусловлена проблемой резистентности. У большинства пациентов первоначальный ответ на ИТК EGFR сменяется развитием устойчивости, что приводит к прогрессированию заболевания [9]. Установленные механизмы резистентности к ИТК EGFR можно подразделить на две категории. К первой относится непосредственное изменение в целевом белке, например в результате потери сенсibiliзирующей мутации (T790M) или возникновения вторичных мутаций *EGFR* (C797S, L718Q, G724S и др.), ко второй – альтернативная активация внутриклеточных сигнальных путей, вызванная, например, хромосомными абберациями (амплификация *Met/HER2*) или мутациями (*KRAS/BRAF/PIK3CA*), а также фенотипическая трансформация опухоли [10; 11].

Поиск и создание новых противоопухолевых препаратов сопряжены с годами работы, высокими затратами, а также с высоким риском неудачи [12]. Однако методы компьютерного моделирования позволяют оптимизировать выявление перспективных молекул-кандидатов среди различных классов соединений [13-15]. Для разработки новых ИТК EGFR особый интерес представляет скрининг гетероциклических соединений, в частности пиримидина и его

производных [16-18]. В сотрудничестве с Пятигорским медико-фармацевтическим институтом был проведён *in silico* скрининг 17 соединений. На основании экспериментальных значений константы ингибирования (K_i) киназного центра EGFR отобрано новое производное пириимидина: 4-{2-[2-(2-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пириимидин-1-ил}-бензсульфамид (далее PMSoVn). Предварительные расчёты с использованием методов молекулярного докинга (Auto Dock GPU) и молекулярной динамики (GROMACS, BioEurica) выявили структурные особенности PMSoVn, обеспечивающие высокое сродство к внутриклеточному домену EGFR. В подтверждение *in silico* данных необходимо исследование противоопухолевой активности соединения в опытах *in vitro*.

Цель исследования – оценка противоопухолевой активности соединения PMSoVn в отношении клеточных линий НМРЛ человека A549 и NCI-H1299.

Материалы и методы исследования

Соединение PMSoVn (рис. 1) стабилизировали 1-этилпирролидин-2-оном (поливинилпирролидон (ПВП), (ГОСТ ФС 42-1194-98)); полученная мелкодисперсная коллоидная смесь была прозрачной, слабо-жёлтого цвета, не имела запаха и растворялась в воде.

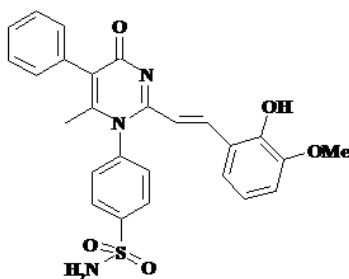


Рис. 1. Структурная формула 4-{2-[2-(2-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-метил-4-оксо-5-фенил-4Н-пириимидин-1-ил}-бензсульфамида (PMSoVn)

Клеточные линии и условия культивирования

В эксперименте использовали клеточные линии НМРЛ человека A549 (EGFR дикий тип, KRAS G12S) и NCI-H1299 (EGFR дикий тип, p53-null). Культивирование проводили в полной питательной среде на основе DMEM (Service Bio, Китай) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Hy Clone, США), 1% неосновных аминокислот (Gibco, США), 1% глутамина («Биолот», Россия) и 1% гентамицина («Биолот», Россия) во влажной атмосфере с 5,0% CO₂ при температуре 37 °С. После достижения логарифмической фазы роста клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10³ клеток на лунку) и культивировали в течение 24 часов для адгезии.

Оценка жизнеспособности клеток (МТТ-тест)

Цитотоксическое действие PMSoVn оценивали с использованием колориметрического МТТ-теста (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) в соответствии с методологией, описанной Kumar et al. [19]. После 24 часов культивирования среду в опытных лунках заменяли на свежую, содержащую PMSoVn в концентрациях: 22,47; 11,23; 5,62; 2,81; 1,40; 0,70; 0,35; 0,18; 0,088; 0,044 и 0,022 μM . В контрольные лунки добавляли среду, содержащую ПВП в концентрации, эквивалентной его содержанию в опытных лунках. Планшеты инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов. После указанной обработки в каждую лунку вносили 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл в фосфатном буфере) и инкубировали 2 часа для образования формазана. Затем среду в лунках удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере Infinite® M NanoPlus (Tecan, Швейцария) при длине волны 540 нм. Каждый вариант эксперимента включил 16 повторов, выполненных в трёх независимых сериях.

Жизнеспособность клеток в каждой лунке рассчитывали по формуле: $\text{жизнеспособность (\%)} = \left(\frac{\text{ОП лунки} - \text{ОП бланк}}{\text{ОП контроль} - \text{ОП бланк}} \right) \times 100$, где ОП лунки – оптическая плотность лунок, ОП контроль – среднее значение оптической плотности в контрольных лунках, ОП бланк – оптическая плотность лунок без клеток. Нормализованные значения выражали в процентах относительно контроля. Усреднённые результаты представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$) для трёх независимых серий опыта ($n=3$).

Значения IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) вычисляли с использованием логистической регрессионной модели в онлайн-калькуляторе QuestGraph™ IC_{50} Calculator (AAT bioquest, Inc., США) [20]. Результаты представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$) для трёх независимых серий опыта ($n=3$).

Оценка апоптоза/некроза

Для анализа форм клеточной гибели применяли двойное окрашивание клеток аннексином V-PE и DAPI. Клетки H1299 обрабатывали PMSoVn (12,5 μM) в течение 24 и 72 часов. В контрольные лунки добавляли среду, содержащую ПВП в концентрации, эквивалентной его содержанию в опытных лунках. Клеточную суспензию готовили согласно инструкции к набору реагентов для детекции апоптоза (Кат. № ALAP-100, Nano Entek, Корея). Окрашенные аннексином V-PE/DAPI образцы в объёме 25 мкл помещали на слайд ADAMII и анализировали на флуоресцентном анализаторе ADAMII LS (Nano Entek, Корея). Результаты представлены как среднее арифметическое значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) для трёх независимых серий опыта ($n=3$).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США) и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро - Уилка. Для множественных сравнений применяли однофакторный ANOVA с апостериорным тестом Даннета относительно контроля, для парных сравнений применяли двусторонний t -критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне достоверности 95% ($p<0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Соединение PMSoVn не проявляло значимого цитотоксического действия в отношении клеток линии A549 при всех трёх вариантах инкубации. Так, выживаемость клеток после 48 часов культивирования с PMSoVn в концентрациях 11,23 и 22,47 μM сохранялась на уровне $87,32\pm15,79\%$ и $87,87\pm10,74\%$ соответственно. При экспозиции в течение 72 часов максимальное ингибирование роста A549 не превышало 22%. Соответственно значение IC_{50} не установлено (рис. 2).

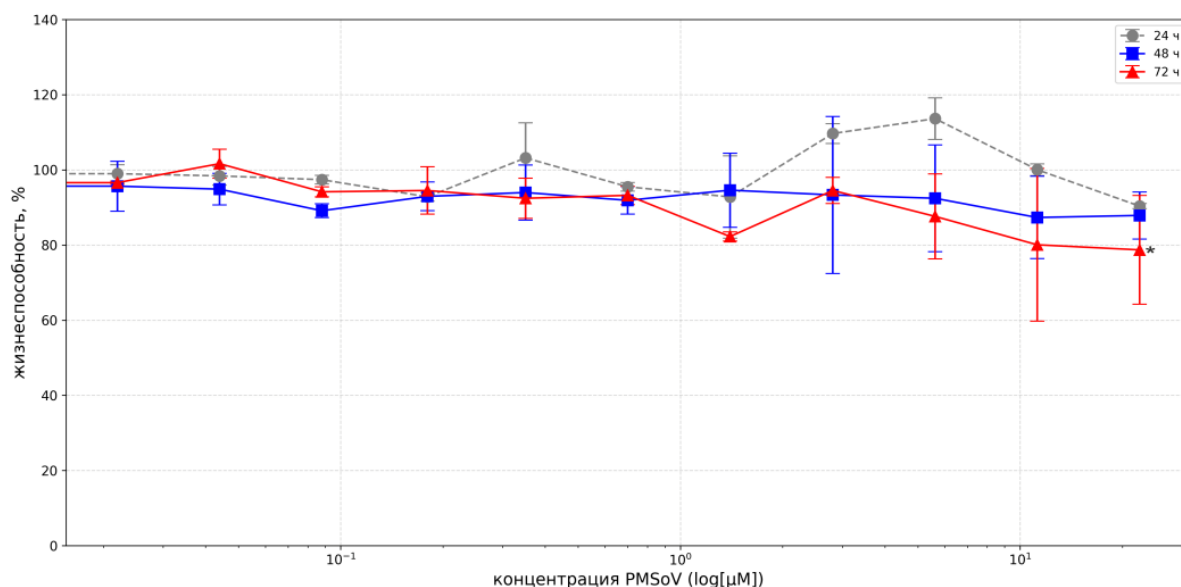


Рис. 2. Цитотоксическое действие PMSoVn на клетки линии A549 в МТТ-тесте после инкубации в течение 24, 48 и 72 часов

Примечание: * уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем $p<0,05$. Каждая точка данных представлена как среднеарифметическое значение (M) и стандартное отклонение ($\pm\text{SD}$).

Источник: составлено авторами на основе полученных данных в ходе исследования.

В отношении линии NCI-H1299 соединение проявляло время- и дозозависимый цитотоксический эффект. Результаты МТТ-теста при 24 часах инкубации продемонстрировали отсутствие 50% торможения роста клеток (рис. 3). Кроме того, на графике наблюдалось увеличение показателя жизнеспособности клеток (в диапазоне доз 0,35-5,62 μM), что, однако, не имело статистически значимых различий относительно контроля.

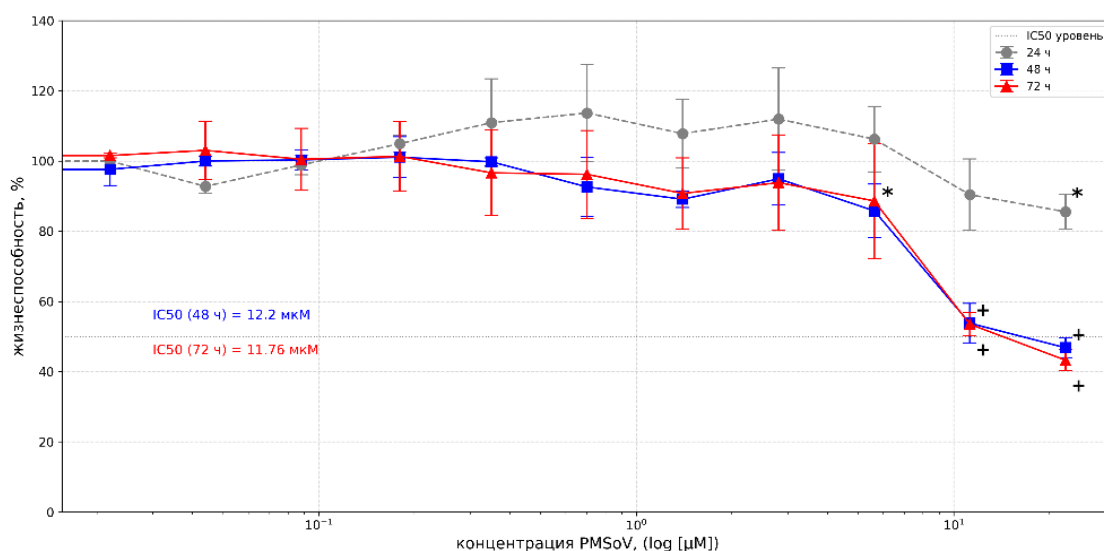


Рис. 3. Цитотоксическое действие PMSoVn на клетки линии NCI-H1299 в MTT-тесте после инкубации в течение 24, 48 и 72 часов

Примечание: * и + уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем при $p < 0,05$ и $p < 0,0001$ соответственно. Каждая точка данных представлена как среднеарифметическое значение (M) и стандартное отклонение ($\pm SD$).

Источник: составлено авторами на основе полученных данных в ходе исследования.

После 48 часов инкубации жизнеспособность клеток снижалась до $53,81 \pm 5,6\%$ и $46,82 \pm 2,82\%$ при концентрациях 11,23 и 22,47 μM соответственно, со значением IC_{50} в пределах $12,2 \pm 3,74 \mu M$. Увеличение времени экспозиции до 72 часов незначительно повышало эффективность воздействия, снизив значение IC_{50} до $11,76 \pm 2,2 \mu M$ (рис. 3). Отсутствие эффекта при 24 часах экспозиции и значимое снижение жизнеспособности к 48–72 часам свидетельствует о накопительном эффекте действия PMSoVn.

Для оценки гибели клеток культуру H1299 инкубировали с PMSoVn в дозе, близкой к IC_{50} (12,5 μM). Эффект PMSoVn через 24 часа инкубации характеризовался снижением количества живых клеток с 92,60% до 77,41% ($p < 0,01$), увеличением в 3 раза уровня некроза (с 4,92% до 14,76%, $p < 0,01$) и раннего апоптоза (с 2,08% до 6,14%, $p < 0,01$), повышением уровня позднего апоптоза более чем в 4 раза (с 0,39% до 1,69%, $p < 0,01$) (табл. 1, рис. 4).

Влияние PMSoVn на гибель клеток линии NCI-H1299 ($M \pm SD$)

Параметр	24 часа		72 часа	
	контроль	PMSoVn	контроль	PMSoVn
Живые (%)	92,61 $\pm$ 2,27	77,41 $\pm$ 2,86*	92,8 $\pm$ 11,23	49,93 $\pm$ 0,92** ††
Ранний апоптоз (%)	2,08 $\pm$ 0,88	6,14 $\pm$ 1,16*	3,09 $\pm$ 1,22	11,37 $\pm$ 1,13** †
Поздний апоптоз (%)	0,39 $\pm$ 0,36	1,69 $\pm$ 0,22*	0,28 $\pm$ 0,09	3,94 $\pm$ 0,87*†

Некроз (%)	4,92±1,95	14,76±1,87*	3,83±0,88	35,37±1,19** ††
------------	-----------	-------------	-----------	-----------------

Примечание: данные в таблице представлены как среднеарифметическое значение (М) и стандартное отклонение ($\pm$ SD). Уровень статистической значимости различий: по сравнению с контролем в те же сроки * $p<0,01$ и ** $p<0,001$; по сравнению с эффектом PMSoVn через 24 часа † $p<0,01$ и †† $p<0,001$.

Источник: составлено авторами на основе полученных данных в ходе исследования.

Через 72 часа доля живых клеток снижалась на 46,2% ($p<0,001$) по сравнению с контролем ($92,8\pm11,23$) и на 35,5% по сравнению с показателем через 24 часа ($p<0,01$). При этом доля клеток в некрозе увеличивалась в 9 раз ($p<0,001$) по сравнению с контролем и более чем в два раза относительно показателя при инкубации 24 часа ($p<0,01$). Ранний апоптоз повышался относительно контроля в 3,7 раза ($p<0,001$) и инкубации 24 часа (на 85,5%; $p<0,01$). Поздний апоптоз вырос вдвое по сравнению с 24 часами ($p<0,01$) и в 14 раз по сравнению с контролем ($p<0,001$).

Из представленных данных видно, что PMSoVn через 24 часа стимулирует все формы клеточной гибели NCI-H1299. Увеличение продолжительности инкубации до 72 часов усиливает цитотоксическое действие соединения, сокращая долю живых клеток вдвое. При всех вариантах инкубации гибель клеток происходит преимущественно путём некроза, с дополнительной индукцией раннего и позднего апоптоза.

Таким образом, данные МТТ-теста свидетельствуют о различной чувствительности A549 (рис. 2) и NCI-H1299 (рис. 3) к цитотоксическому действию PMSoVn. Для клеток линии NCI-H1299 была установлена умеренная кумулятивная цитотоксичность со значениями IC_{50} в пределах $12,2\pm3,74 \mu M$ (48 часов) и $11,76\pm2,2 \mu M$ (72 часа). Результаты, полученные авторами, согласуются с данными о цитотоксической активности осимертиниба (производное пиримидина) в отношении NCI-H1299 ($IC_{50}\sim 10 \mu M$) [21] и аналогичны результатам оценки цитотоксичности потенциальных ингибиторов EGFR дикого типа на основе пиридо[2,3-*d*]пиримидин-4(3H)-она, отобранных из ряда соединений, в отношении A549 (IC_{50} в диапазоне $7,23-16,2 \mu M$) [22]. Для A549 50% ингибирования роста клеточной популяции в тестируемом диапазоне доз получено не было. Однако для этой линии клеток показатели IC_{50} стандартных ИТК EGFR могут иметь высокие значения, в частности IC_{50} gefитиниба может достигать $18,9-32,0 \mu M$ [23-25].

Низкая, по сравнению с NCI-H1299, чувствительность клеток линии A549 к исследуемому соединению может быть обусловлена особенностями её генетического профиля (*KRAS* G12S), поскольку известно, что наличие мутаций *KRAS* может влиять на устойчивость к ИТК EGFR [26; 27]. В частности, сообщалось, что у больных аденокарциномой лёгких мутации *KRAS* (G12X, G13C) ассоциировались с устойчивостью к ИТК EGFR хиназолинового ряда (гефитиниб/эрлотиниб) [28]. В клеточных же линиях НМРЛ (РС-9 и NCI-H1975), чувствительных к осимертинибу, развивалась резистентность к препарату после возникновения мутации *KRAS* G12V [29]. У мышей линии Balb/c nude ксенографт A549 использовался для моделирования опухоли, устойчивой к гефитинибу [30].

Результаты, полученные на клеточных линиях НМРЛ с различными механизмами резистентности к ИТК EGFR, обосновывают возможность дальнейшего изучения PMSoVn как потенциального ингибитора тирозинкиназы EGFR, на чувствительных к ИТК EGFR иммортализованных клеточных линиях НМРЛ человека, в частности РС-9 (*Ex19del* E746-A750), H820 (*Ex19del* E746-E749/T790M), NCI-H1975 (L858R/T790M) и др., а также исследований на первичных культурах клеток рака лёгкого [31].

Заключение

Предварительная оценка нового производного пиримидина-4(1H)-она (PMSoVn) выявила избирательную противоопухолевую активность в отношении клеточной линии НМРЛ NCI-H1299. Клетки линии A549 оказались малочувствительными к соединению. Умеренный цитотоксический эффект PMSoVn проявлялся в дозо- и времязависимом режиме с IC₅₀~12 мМ, сопровождаясь индукцией как некроза, так и апоптоза. Отсутствие значимой активности в отношении A549, вероятно, связано с наличием мутации *KRAS*, ассоциированной с резистентностью к ингибиторам EGFR. Для установления точных механизмов действия, селективности и выявления направлений структурной оптимизации PMSoVn с целью повышения его эффективности требуются дополнительные исследования.

Список литературы

1. Massacci G., Perfetto L., Sacco F. The Cyclin-dependent kinase 1: more than a cell cycle regulator // Br J Cancer. 2023. Vol. 129. Is. 11. P. 1707-1716. DOI: 10.1038/s41416-023-02468-8.
2. Yang J., Liu Y., Geng Q., Wang B. Death associated protein kinase 1 predicts the prognosis and the immunotherapy response of various cancers // Mol Biol Rep. 2024. Vol. 51. N 1. 240. DOI: 10.1007/s11033-024-09240-y.
3. Харагезов Д.А., Лазутин Ю.Н., Мирзоян Э.А., Милакин А.Г., Статешный О.Н., Лейман И.А., Чубарян А.В., Иозефи К.Д. Молекулярные мишени немелкоклеточного рака

легкого вне «главной тройки» // Южно-Российский онкологический журнал. 2021. Т. 2. № 4. С. 38-47. DOI:org/10.37748/2686-9039-2021-2-4-5.

4. Bhullar K.S., Lagarón N.O., McGowan E.M., Parmar I., Jha A., Hubbard B.P., Rupasinghe H.P.V. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions // *Molecular cancer*. 2018. Vol. 17. N 1. 48. DOI:org/10.1186/s12943-018-0804-2.

5. Кузьмина В.А., Лактионов К.К., Реутова Е.В., Ардзинба М.С., Денисова Е.С. Клинический случай длительного контроля над заболеванием у пациентки с EGFR-позитивным немелкоклеточным раком легкого // *Медицинский совет*. 2022. Т. 16. № 22. С. 154–159. DOI:org/10.21518/2079-701X-2022-16-22-154-159.

6. Богданов А.А., Моисеенко Ф.В., Егоренков В.В. Богданов А.А., Волков Н.М., Федянин М.Ю. // Сравнение эффективности первой линии терапии разными поколениями ингибиторов EGFR-тирозинкиназы у пациентов с распространенным EGFR-ассоциированным немелкоклеточным раком легкого: сетевой метаанализ данных общей выживаемости // *Современная Онкология*. 2021. Т. 23. № 1. С. 116-120. DOI: 10.26442/18151434.2021.1.200731.

7. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 07 июня 2023 г. № 1495-р «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года» [Электронный ресурс]. URL: <http://static.government.ru/media/acts/files/1202306190013.pdf> (дата обращения: 30.04.2025).

8. Tsimafeyeu I., Statsenko G., Vladimirova L., Besova N., Artamonova E., Raskin G., Rykov I., Mochalova A., Utyashev I., Gorbacheva S., Kazey V., Gavrilova E., Dragun N., Moiseyenko V., Tjulandin S. A phase 1b study of the allosteric extracellular FGFR2 inhibitor alofanib in patients with pretreated advanced gastric cancer // *Invest New Drugs*. 2023. Vol. 41. N 2. P. 324-332. DOI:10.1007/s10637-023-01340-z.

9. Suryavanshi M., Jaipuria J., Mattoo S., Dhandha S., Khatri M. Audit of molecular mechanisms of primary and secondary resistance to various generations of tyrosine kinase inhibitors in known epidermal growth factor receptor-mutant Non-small cell lung cancer patients in a Tertiary Centre // *Clin Oncol (RCollRadiol)*. 2022. Vol. 34. N 11. P. e451-e462. DOI: 10.1016/j.clon.2022.06.003.

10. Ferro A., Marinato G.M., Mulargiu C., Marino M., Pasello G., Guarneri V., Bonanno L. The study of primary and acquired resistance to first-line osimertinib to improve the outcome of EGFR-mutated advanced Non-small cell lung cancer patients: the challenge is open for new therapeutic strategies // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2024. Vol. 196. 104295. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2024.104295. Epub 2024 Feb 20. PMID: 38382773.

11. Sun C., Gao W., Liu J., Cheng H., Hao J. FGL1 regulates acquired resistance to Gefitinib by inhibiting apoptosis in non-small cell lung cancer // *Respir Res*. 2020. Vol. 21. N 1. 210. DOI: 10.1186/s12931-020-01477-y.

12. Sun D., Macedonia C., Chen Z., Chandrasekaran S., Najarian K., Zhou S., Cernak T., Ellingrod V.L., Jagadish H.V., Marini B., Pai M., Violi A., Rech J.C., Wang S., Li Y., Athey B., Omenn G.S. Can Machine Learning Overcome the 95% Failure Rate and Reality that Only 30% of Approved Cancer Drugs Meaningfully Extend Patient Survival? // *J Med Chem*. 2024. Vol. 67. Is. 18. P. 16035-16055. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c01684.
13. Radwan A.A., Alanazi F., Al-Dhfyan A. Bioinformatics-driven discovery of novel EGFR kinase inhibitors as anti-cancer therapeutics: In silico screening and in vitro evaluation // *PLoS One*. 2024. Vol. 19. N 4. P. e0298326. DOI: 10.1371/journal.pone.0298326.
14. Rehman Z.U., Najmi A. Exploring EGFR inhibitors with the aid of virtual screening, docking, and dynamics simulation studies // *J Biomol Struct Dyn*. 2024. Vol. 42. Is. 19. P. 10489-10509. DOI:10.1080/07391102.2023.2256887
15. da Rocha M.N., de Sousa D.S., da Silva Mendes F.R., Dos Santos H.S., Marinho G.S., Marinho M.M., Marinho E.S. Ligand and structure-based virtual screening approaches in drug discovery: mini review // *Mol Divers*. 2025. Vol. 29. Is. 3. P. 2799-2809. DOI: 10.1007/s11030-024-10979-6.
16. Mahapatra A., Prasad T., Sharma T. Pyrimidine: a review on anticancer activity with key emphasis on SAR // *Futur J Pharm*. 2021. Vol. 7. 123. DOI: [org/10.1186/s43094-021-00274-8](https://doi.org/10.1186/s43094-021-00274-8).
17. Raghunath Khedkar N., Sindkhedkar M., Joseph A. Computational design, synthesis, and bioevaluation of 2-(pyrimidin-4-yl)oxazole-4-carboxamide derivatives: dual inhibition of EGFR WT and EGFR T790M with ADMET Profiling // *Bioorg Chem*. 2024. Vol. 153. 107910. DOI: 10.1016/j.bioorg.2024.107910.
18. Song M., Elkamhawry A., Noh W., Abdelazem A.Z., Park Y., Sivaraman A., Bertleuova A., Atef D., Lee K. Pyrimidine scaffold dual-target kinase inhibitors for cancer diseases: A review on design strategies, synthetic approaches, and structure-activity relationship (2018–2023) // *Arch Pharm (Weinheim)*. 2025. Vol. 358. N 1. e2400163. DOI: 10.1002/ardp.202400163.
19. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay // *Cold Spring Harb Protoc*. 2018. Vol. 2018. N 6. DOI: 10.1101/pdb.prot095505.
20. AAT bioquest, Inc. калькулятор QuestGraph™ IC50. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (2024). (дата обращения: 29.04.2025)
21. Li S., Zhang T., Zhu S.J., Lei C., Lai M., Peng L., Tong L., Pang Z., Lu X., Ding J., Ren X., Yun C.H., Xie H., Ding K. Optimization of Brigatinib as New Wild-Type Sparing Inhibitors of EGFR T790M/C797S Mutants // *ACS Med Chem Lett*. 2022. Vol. 13. N 2. P. 196-202. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.1c00555.
22. Elzahabi H.S.A., Nossier E.S., Alasfoury R.A., El-Manawaty M., Sayed S.M., Elkaeed E.B., Metwaly A.M., Hagraas M., Eissa I.H. Design, synthesis, and anti-cancer evaluation of new

pyrido[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one derivatives as potential EGFR WT and EGFR T790M inhibitors and apoptosis inducers // J Enzyme Inhib Med Chem. 2022. Vol. 37. N 1. P. 1053-1076. DOI: 0.1080/14756366.2022.2062752.

23. Liu Z., Gao W. Leptomycin B reduces primary and acquired resistance of gefitinib in lung cancer cells // Toxicol Appl Pharmacol. 2017. Vol. 335. P.16-27. DOI: 10.1016/j.taap.2017.09.017. 32.0.

24. Wang M., Yuang-Chi Chang A. Molecular mechanism of action and potential biomarkers of growth inhibition of synergistic combination of afatinib and dasatinib against gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells // Oncotarget. 2018. Vol. 9. N 23. P. 16533-16546. DOI: 10.18632/oncotarget.24814.

25. Sun C., Gao W., Liu J., Cheng H., Hao J. FGL1 regulates acquired resistance to Gefitinib by inhibiting apoptosis in non-small cell lung cancer // Respir Res. 2020. Vol. 21. N 1. 210. DOI: 10.1186/s12931-020-01477-y.

26. Gao Q., Ouyang W., Kang B., Han X., Xiong Y., Ding R., Li Y., Wang F., Huang L., Chen L., Wang D., Dong X., Zhang Z., Li Y., Ze B., Hou Y., Yang H., Ma Y., Gu Y., Chao C.C. Selective targeting of the oncogenic KRAS G12S mutant allele by CRISPR/Cas9 induces efficient tumor regression // Theranostics. 2020. Vol. 10. N 11. P. 5137-5153. DOI: 10.7150/thno.42325.

27. Zheng J., Dou Y., Huang D., Wang Y., Han R., Hu C., Zhu M., Lu C., Lin C., Wu D., Liu Y., Tang H., He T., Jiang W., He Y. Overall signature of acquired KRAS gene changes in advanced non-small cell lung cancer patient with EGFR-TKI resistance // Jpn J Clin Oncol. 2024. Vol. 54. N 1. P. 89-96. DOI: 10.1093/jjco/hyad123.

28. Pao W., Wang T.Y., Riely G.J., Miller V.A., Pan Q., Ladanyi M., Zakowski M.F., Heelan R.T., Kris M.G., Varmus H.E. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib // PLoS Med. 2005. Vol 2. Is. 1. e17. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020017.

29. Fukuda K., Otani S., Takeuchi S., Arai S, Nanjo S., Tanimoto A., Nishiyama A., Naoki K., Yano S. Trametinib overcomes KRAS-G12V-induced osimertinib resistance in a leptomeningeal carcinomatosis model of EGFR-mutant lung cancer // Cancer Sci. 2021. Vol. 112. Is. 9. P. 3784-3795. DOI: 10.1111/cas.15035.

30. Zhou L.-N., Wu N., Liang Y., Gao K., Li X.Y., Zhang L.F. Monitoring response to gefitinib in nude mouse tumor xenografts by (18)F-FDG microPET-CT: correlation between (18)F-FDG uptake and pathological response // World J Surg Oncol. 2015. Vol. 13. 111. DOI: 10.1186/s12957-015-0505-x.

31. Межевова И.В., Ситковская А.О., Филиппова С.Ю., Шамова Т.В., Тимофеева С.В., Гненная Н.В., Новикова И.А., Харагезов Д.А., Милакин А.Г., Лейман И.А., Статешный О.Н.,

Росторгуев Э.Е., Атмачиди Д.П., Лаптева Т.О., Волошин М.В., Еремин К.С., Сухарь И.А. Опыт создания коллекции клеточных культур немелкоклеточного рака легкого в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России // Южно-Российский онкологический журнал. 2022. Т. 3. № 4. С. 14-25. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-2.