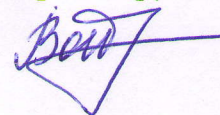


На правах рукописи



Войтович Юлия Валерьевна

**НОВЫЕ СЕЛЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ БРОМОДОМЕНОВ
ВЕТ-СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ: ДИЗАЙН, СИНТЕЗ,
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Нижний Новгород – 2018

Работа выполнена на кафедре органической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского»

Научный руководитель:

Фёдоров Алексей Юрьевич

доктор химических наук, профессор РАН, заведующий кафедрой органической химии химического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты:

Нифантьев Николай Эдуардович

член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией химии гликоконъюгатов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

Климочкин Юрий Николаевич

доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный технический университет»

Ведущая организация:

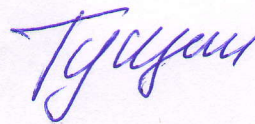
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Защита диссертации состоится «7» декабря 2018 года в 12 часов на заседании объединённого диссертационного совета Д 999.130.02 на базе Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и Института металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН по адресу: 603950, Нижний Новгород, ГСП-20, пр. Гагарина, 23, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/856>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор химических наук, профессор

 А.В. Гущин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В течение многих лет онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности, в связи с чем проблема рака оказывает большое влияние на общество во всём мире. По данным Всемирной Ассоциации здравоохранения число случаев диагностирования рака может достичь 22 миллионов в год к 2030 году, в то время как смертность в результате онкологических заболеваний может возрасти на 70% по сравнению с 2012 годом. В связи с этим поиск новых подходов к лечению рака является актуальной задачей современной химии, биологии и медицины.

Разработка новых лекарств является сложным и комплексным процессом, особенно в онкологии. Это связано, главным образом, с многочисленными препятствиями, замедляющими прогресс открытия лекарственных препаратов, такими как лекарственная устойчивость и возникновение побочных эффектов. Среди терапевтических мишеней для лечения рака в настоящее время наибольшее внимание уделяется ядерным рецепторам, активным сайтам ферментов, ионным каналам и рецепторам G-белков.

Ингибирование межбелковых взаимодействий (МБВ) также представляет собой многообещающую стратегию в онкологии, в особенности потому, что потенциально может привести к снижению вероятности появления нежелательных эффектов и резистентности. Привлекательной мишенью для ингибирования МБВ являются бромодомен-содержащие белки, что объясняется их вовлеченностью в многообразие нормальных и патологических процессов. Бромодомен – это белковый модуль, способный к специфичному распознаванию *N*-ацетилированных остатков лизина гистонов, и за счёт этого регулирующий экспрессию ряда генов. Человеческий геном кодирует 46 бромодомен-содержащих белков, классифицированных на 8 семейств в соответствии с их происхождением и структурой. Одно из наиболее изученных семейств – это BET (бромодомен и экстра-терминальный домен) семейство белков. Данное семейство представлено 4 членами: Brd2, Brd3, Brd4 и BrdT, каждый из которых в своей структуре содержит тандем из двух доменов (BD1 и BD2). Белки BET-семейства контролируют клеточный гомеостаз и множество биологических процессов, а также вовлечены в развитие различных патологий. Данное семейство играет ключевую роль в развитии рака, в связи с чем большое количество исследований посвящено поиску низкомолекулярных BET-ингибиторов для лечения онкологических заболеваний.

С момента открытия первого BET-ингибитора JQ1 в 2010 году, разработка малых молекул, способных нарушать взаимодействия BET-белков с гистонами, достигла значительного прогресса. К сегодняшнему дню более двухсот многообещающих BET-ингибиторов были представлены в литературе. При этом 18 из них находятся на различных стадиях клинических испытаний для лечения многочисленных типов опухолей, в том числе NUT-карциномы, очень агрессивного вида рака эпителия, невосприимчивого к стандартной химиотерапии.

К сожалению, несмотря на высокую эффективность и многообещающие результаты, демонстрируемые в ходе испытаний, все известные на данный момент BET-ингибиторы обладают общим недостатком, ставящим под вопрос их использование в клинической практике. Обладая высокой селективностью по отношению к BET-семейству белков, они не проявляют селективности внутри данного семейства, являясь так называемыми пан-ингибиторами. Использование пан-ингибиторов в лечении является спорным в связи с тем, что BET-белки влияют на многие процессы в клетке. Так, помимо пролиферации раковых клеток, они участвуют в производстве инсулина, транскрипции цитокинных генов, дифференциации Т лимфоцитов и реактивации

латентных форм вирусов, например, ВИЧ. Таким образом, принимая во внимание многообразие специфичных функций членов ВЕТ-семейства белков, пан-ингибирование может вести к ряду нежелательных побочных эффектов в клинической практике. Кроме того, изучение индивидуальной роли каждого из членов данного семейства до сих пор имеет ключевое значение для подтверждения необходимости разработки селективных ВЕТ-ингибиторов для использования в лечении онкологических заболеваний.

Вместе с тем, поиск селективных ВЕТ-ингибиторов остаётся довольно сложной задачей ввиду высокого сходства в аминокислотных последовательностях членов ВЕТ-семейства, особенно вблизи сайта связывания, где идентичность на аминокислотном уровне достигает 100%. Однако, в регионах, окружающих активный сайт связывания, были обнаружены несколько аминокислотных остатков, различающихся для первого и второго бромодоменов. Данные различия могут быть использованы в поиске селективных ВЕТ-ингибиторов. Ожидается, что разработка селективных ингибиторов семейства ВЕТ позволит выявить специфичный вклад каждого из белков в клеточные процессы, а также подготовить молекулы-кандидаты для доклинических и клинических испытаний.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что данная тема является новой, работа в этой области активно ведётся в научных лабораториях многих стран. Среди научных групп, занимающихся дизайном и синтезом ингибиторов ВЕТ-семейства белков, стоит отметить группу профессора П. Филиппакополоуса (Оксфордский университет, Великобритания), представившего пионерскую работу, посвящённую открытию первого ВЕТ-ингибитора JQ1. Кроме того, значительные результаты были достигнуты в группах Ч.Чунга (GSK, Великобритания), С.Кнаппа, С.Конвея и С.Пикод (Оксфордский университет, Великобритания), О.Миргуйе (GSK, Франция), Г. Джорджа (Университет Миннесоты, США), А.Тэйлора и В.Гелинга (Constellation Pharmaceuticals, США), О.Харенко (Zenith Epigenetics, Канада) и др. Однако, несмотря на многочисленные усилия исследовательских групп всего мира, до сегодняшнего дня считалось, что достижение селективности внутри ВЕТ-семейства белков невозможно, что обусловлено особенностями строения этих белков. К настоящему моменту известно всего три ингибитора, способных специфично связываться только с одним из двух бромодоменов, и ни одного ингибитора, селективного по отношению к единственному члену ВЕТ-семейства.

Цель работы заключалась в получении новых ингибиторов ВЕТ-семейства белков, способных селективно связываться с одним доменом белка, либо с индивидуальным членом данного семейства. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучение корреляций структура/активность и структура/селективность двух ВЕТ-ингибиторов, выявленных в результате скрининга химической библиотеки, ориентированной на МБВ;
2. Дизайн и синтез новых серий ингибиторов с улучшенными показателями активности и/или селективности на основе структур идентифицированных молекул;
3. Исследование биохимической и клеточной активности синтезированных ингибиторов, объяснение природы их активности и селективности;
4. Выбор молекулы-кандидата для последующих доклинических и клинических испытаний.

Научная новизна. В работе предложены и реализованы методологии синтеза двух новых ВЕТ-ингибиторов, идентифицированных в ходе скрининга химической библиотеки, ориентированной на межбелковые взаимодействия. Один из найденных ингибиторов является первым и на сегодняшний день единственным ВЕТ-ингибитором,

селективным по отношению к Brd4(BD1)-члену BET-семейства белков. Вторым ингибитор, наряду с описанным в тот же временной период Олиноном, является первым открытым BET-ингибитором, селективно связывающимся с BD1 в составе BET-белков.

Впервые был предложен механизм достижения селективного связывания лиганда с первым доменом Brd4. Было показано, что ключевую роль в данном процессе играет различная динамика ZA-петли членов BET-семейства, в связи с чем расположение лиганда в канале ZA белка с установлением специфичных водородных связей ведёт к преимущественному взаимодействию молекулы с единственным BET-членом.

Кроме того, было получено несколько серий новых BET-ингибиторов на основе структур идентифицированных молекул (всего около 150 производных), с использованием оригинальной методики DOTS (Diversity Oriented Target-Focused Synthesis).

Впервые была показана димеризация белка Brd4(BD1), индуцируемая триазолопиримидинил-содержащими производными ксантина.

Был получен первый и единственный BD1-селективный ингибитор, активный в наномолярном диапазоне концентраций. Было установлено, что данное соединение эффективно подавляет экспрессию протоонкогена *c-Myc*, являющегося основной мишенью противоопухолевых агентов, и удовлетворяет всем необходимым и достаточным критериям молекулы-кандидата для дальнейших доклинических и клинических испытаний.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выявленные корреляции структура/активность и структура/селективность BET-ингибиторов позволили выяснить механизмы достижения Brd4(BD1)- и Brds(BD1)-селективности. Это может послужить отправной точкой для дизайна новых селективных ингибиторов семейства BET. Кроме того, изучение влияния синтезированных селективных лигандов позволит определить транскрипционный эффект, достигаемый при селективном ингибировании, и тем самым ответить на вопрос, необходима ли разработка селективных молекул, связывающихся с BET-белками, в лечении онкологических заболеваний.

Методология и методы исследования. Объектами исследования являлись структурные аналоги ксантина, содержащие различные заместители в положениях 2, 3, 7 и 8 ксантинового ядра, а также структурные аналоги бензоазепинона, замещённые в положении 5. Дизайн химических библиотек новых ингибиторов проводился с использованием оригинального подхода DOTS (Diversity Oriented Target-Focused Synthesis). В работе были использованы современные методы тонкого органического синтеза, включая роботизированный синтез с использованием платформы Accelerator Synthesizer. При работе с веществами, обладающими высокой реакционной способностью, а также чувствительностью к кислороду и влаге, синтез проводили с использованием техники Шленка в инертной атмосфере (аргон). Состав и строение новых соединений устанавливали с помощью физико-химических методов (ЯМР, ВЭЖХ-МС, РСА). Для разделения соединений использовали хроматографические методы (ВЭЖХ, ТСХ, флэш-хроматография на силикагеле). Оценка активности синтезированных молекул проводилась методами HTRF, ITC, BROMOscan, BromoMELT, а также CellTiter-Glo.

Положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментальные данные о синтезе двух новых селективных BET-ингибиторов, идентифицированных в ходе скрининга химической библиотеки, ориентированной на МБВ.
2. Результаты исследования корреляции структура/активность и структура/селективность идентифицированных BET-ингибиторов.

3. Дизайн двух химических библиотек новых структурных аналогов идентифицированных ингибиторов методом DOTS с целью повышения активности и/или селективности.
4. Экспериментальные данные о синтезе ингибиторов разработанных химических библиотек.
5. Результаты исследования структуры полученных соединений физико-химическими методами.
6. Результаты исследования биологической активности полученных соединений.
7. Результаты исследования биохимической и клеточной активности оптимизированной молекулы-кандидата для последующих доклинических и клинических испытаний.

Личный вклад автора. Синтез всех новых соединений, представленных в диссертации, выполнен в полном объеме лично диссертантом. Соискатель принимал активное участие в постановке цели и задач исследования, разработке структур целевых биологически активных молекул и методологий их получения, анализе результатов биологических исследований синтезированных соединений и обобщении полученных данных. Подготовка публикаций проводилась совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Степень достоверности полученных результатов. Структуры всех синтезированных в работе соединений подтверждены с использованием современных физико-химических методов анализа, таких как ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия и рентгеноструктурный анализ. Определение биохимической активности и селективности молекул осуществлялось методами HTRF, ITC, BROMOscan, BromoMELT; клеточная активность определялась методом люминесцентного анализа и *c-Myc* HTRF. Все измерения проводились в трипликатах.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены в ходе ряда российских, зарубежных и международных конференций: «24th Annual Meeting of the Doctoral School in Biology and Health Science» (Марсель, Франция, 2015), «Chemoinformatics Strasbourg Summer School» (Страсбург, Франция, 2015), «14^{ème} Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Marseille» (Марсель, Франция, 2015), «15^{ème} Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Marseille» (Марсель, Франция, 2016), «20th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2017)» (Кёльн, Германия, 2017), «XXth Young Conference-School on Organic Chemistry» (Казань, Россия, 2017), «27th International Chugaev Conference on Coordination Chemistry» (Нижний Новгород, Россия, 2017), «ChemCYS. Chemistry Conference for Young Scientists» (Бланкенберг, Бельгия, 2018), «XXI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков» (Нижний Новгород, Россия, 2018).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 2 статьи в журнале Journal of Medicinal Chemistry, входящем в международные базы данных, а также один международный патент.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, списка литературы, списка наиболее важных молекул, списка рисунков, схем и таблиц и приложения. Работа изложена на 298 страницах машинописного текста, включает 68 рисунков, 29 схем и 28 таблиц. Список цитируемой литературы включает 306 наименований.

Соответствие диссертации паспорту специальности. Изложенный материал соответствует пунктам 1. «Выделение и очистка новых соединений», 3. «Развитие рациональных путей синтеза сложных молекул», 7. «Выявление закономерностей типа

«структура – свойство» и 8. «Моделирование структур и свойств биологически активных веществ» паспорта специальности 02.00.03 – органическая химия.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Мечников» (стипендия французского правительства на написание диссертации под совместным русско-французским научным руководством) и французского фонда АРК (индивидуальный грант молодым учёным, работающим в области исследования рака).

Благодарности. Автор выражает благодарность группе «Integrative Structural and Chemical Biology (iSCB)» (Центр исследования рака, Марсель, Франция) за возможность осуществления данного научного проекта, в частности Dr. Бригитт Ро и аспиранту Кендалю Карассо за проведение биохимических тестов синтезированных ВЕТ-ингибиторов, Dr. Стефану Бетзи за проведение рентгеноструктурного анализа молекул, Dr. Лорану Хофферу и Dr. Филиппу Роше за разработку стратегий виртуального скрининга, использовавшихся при создании химических библиотек, а также руководителям группы Dr. Ксавье Морелли и Dr. Иву Коллету за ценные научные консультации и участие в обсуждении результатов. Автор выражает искреннюю признательность Dr. Себастьяну Комбу (Университет Экс-Марсель, Марсель, Франция) за моральную поддержку в период пребывания в аспирантуре, всестороннюю помощь на всех этапах работы и ценные дискуссии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка химической библиотеки, ориентированной на межбелковые взаимодействия

С целью эффективного поиска новых селективных ВЕТ-ингибиторов проведён виртуальный скрининг большого числа соединений на основании заданных параметров. В качестве первичного фильтра для отбора молекул были использованы «правила четырёх»: $MM > 400$ Да, количество циклов > 4 , количество доноров водорода > 4 , количество акцепторов водорода > 4 , $LogP > 4$. Затем удалялись молекулы, не содержащие «привилегированных» фрагментов, т.е. фрагментов, наиболее часто встречающихся в биологически активных соединениях. К сокращённой библиотеке был применён коэффициент Танимото > 0.8 , после чего отбирались молекулы с индексом насыщенных углерод-углеродных связей $F_{sp3} > 0.4$. С использованием предложенного подхода было протестировано более 8 миллионов соединений из 25 коммерческих библиотек и получена новая химическая библиотека «2P2I3D», ориентированная на межбелковые взаимодействия (МБВ) и содержащая 1664 молекулы.

В ходе НТРФ (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) и ИТС (Isothermal Titration Calorimetry) анализов разработанной библиотеки было идентифицировано два ингибитора (**Рисунок 1**), активных в микромолярном диапазоне концентраций и обладающих непредвиденной селективностью. Производное ксантина **#1** является первым и на сегодняшний день единственным ингибитором, проявляющим селективность к одному члену ВЕТ-семейства белков, Brd4(BD1). Производное бензоазепинона **#2**, наряду с открытым в тот же период времени Олионом, является первым известным Brds(BD1)-селективным ингибитором.

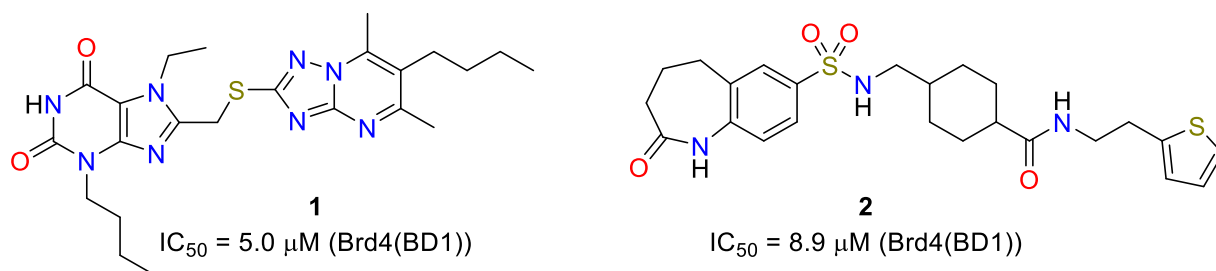


Рисунок 1. Селективные ингибиторы, идентифицированные в ходе скрининга 2P2I_{3D} химической библиотеки

Идентифицированные селективные ингибиторы **#1** и **#2** стали отправной точкой для дальнейших исследований. Главными задачами научного проекта было изучение корреляций структура/активность и структура/селективность этих молекул, а также дизайн и синтез новых серий ингибиторов на их основе с улучшенными показателями активности и/или селективности.

2. Исследование Brd4(BD1) селективного ингибирования на примере молекулы **#1**

Кристаллографический анализ полученного комплекса ингибитора **#1** с Brd4(BD1) показал, что ксантиновое ядро молекулы действует как миметик ацетилированного лизина, образуя канонические водородные связи с ключевыми аминокислотными остатками аспарагином N140 и тирозином Y97 (**Рисунок 2A**). Триазолопиримидинильный фрагмент образует водородную связь с основной цепью аспарагиновой кислоты D88, найденной во всех BET-членах (**Рисунок 2B**). Эта водородная связь направляет триазолопиримидин в канал ZA, где его циклическая система оказывается блокирована за счёт ван-дер-Ваальсовых контактов с одной стороны с лейцином L92, а с другой стороны с глутамином Q85 (**Рисунок 2C**). На основании анализа данного кристаллографического комплекса было высказано предположение о том, что ксантиновое ядро молекулы ответственно за аффинность ингибитора, в то время как триазолопиримидинильный фрагмент играет ключевую роль в установлении селективности.

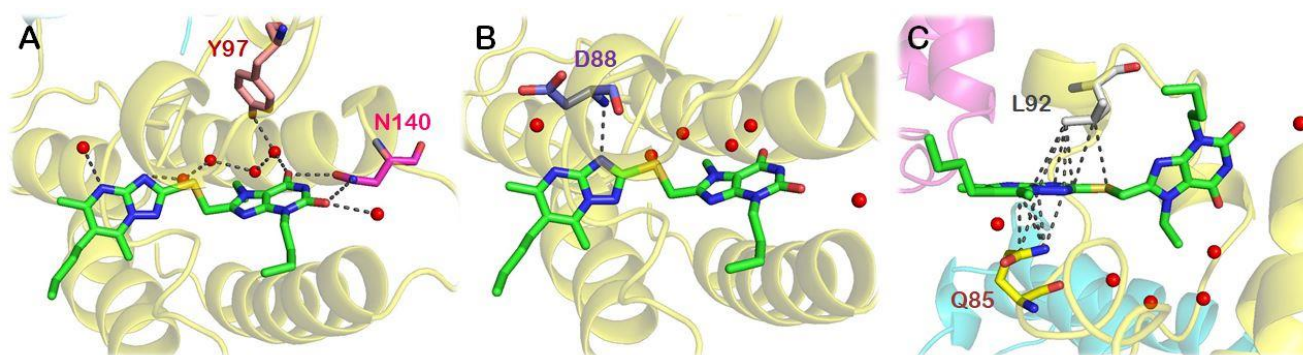


Рисунок 2. Взаимодействие ингибитора **#1 с сайтом связывания Brd4(BD1)** (A) Детальное изображение взаимодействий молекулы **#1** (зелёные линии) с ключевыми аминокислотными остатками N140 (пурпурные линии) и Y97 (розовые линии). Молекулы воды представлены в виде красных сфер. Водородные связи между **#1**, аминокислотными остатками и молекулами воды представлены в виде чёрных пунктирных линий (B) Водородная связь между **#1** и аспарагиновой кислотой D88 (фиолетовые линии) (C) Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (чёрные пунктирные линии) между **#1**, Q85 (жёлтые линии) и L92 (серые линии).

Для подтверждения этой гипотезы была предпринята стратегия фрагментации молекулы **#1** на соответствующие ксантин **#3** и триазол (**Рисунок 3**).

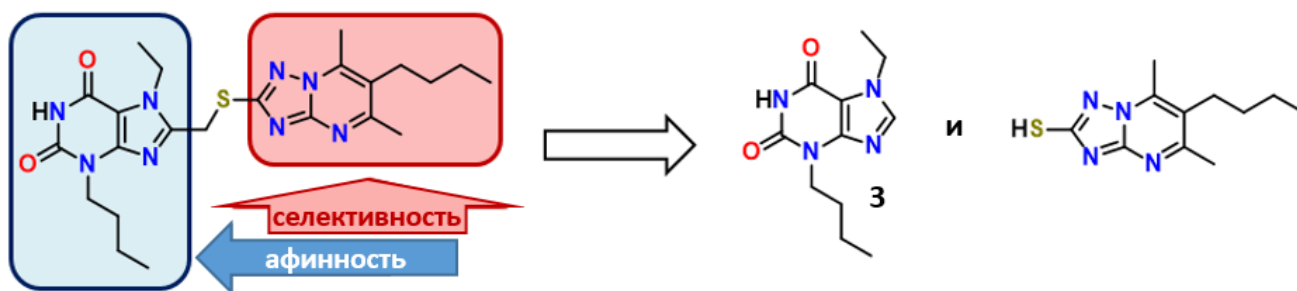


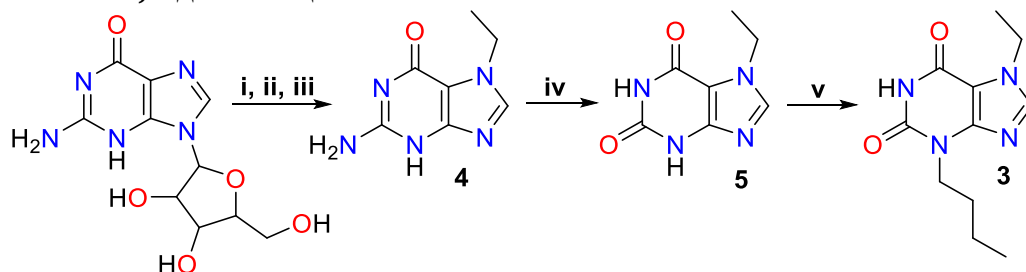
Рисунок 3. Фрагментация молекулы #1.

Данный подход был направлен на выявление минимальных фрагментов, необходимых для достижения эффективного и селективного связывания, а также оптимизацию структуры каждого из фрагментов с целью повышения их активности и/или селективности.

2.1. Модификация ксантинового фрагмента

Синтез соединения **#3** проводился согласно **Схеме 1**. На первой стадии коммерчески доступный защищённый гуанозин алкилировался этилиодидом, а затем гидролизовался в кислой среде, приводя к 7-этилгуанину **#4**. Реакция диазотирования образовавшегося амина с последующим гидролизом позволили получить 7-этилксантин **#5**. Далее проводили алкилирование полученного субстрата бутилбромидом в присутствии карбоната калия, что привело к целевому продукту 3-бутил-7-этилксантину **#3** с общим выходом 47%.

Схема 1. Синтез 3,7-дизамещенного ксантина **#3**^a



^a Реагенты и условия: i) *EtI*, ДМАА, 60 °C, 12 ч; ii) *HCl*_{aq.}, кипячение, 1 ч; iii) *NH*_{3aq.}, комн.т., 95%; iv) *NaNO*₂, *H*₂O-*AcOH*, 50 °C, 1 ч, 89%; v) *BuBr*, *K*₂*CO*₃, ДМФА, комн.т., 48 ч, 55%.

Полученная кристаллографическая структура комплекса **#3** с Brd4(BD1) выявила такой же тип связывания, как был показан для исходного ингибитора **#1** (**Рисунок 4А,В**), – наблюдалось образование водородных связей ксантинового фрагмента с аспарагином N140 и тирозином Y97. Значение активности **#3**, определённое методом HTRF, составило 13.0 μМ. С целью повышения афинности лиганда к Brd4(BD1) нами было предложено три направления модификации ксантинового ядра, соответствующие трём из четырёх направлений в активном сайте белка (**Рисунок 4С**) и не затрагивающие амидную группу, обеспечивающую ключевые взаимодействия с N140 и Y97.

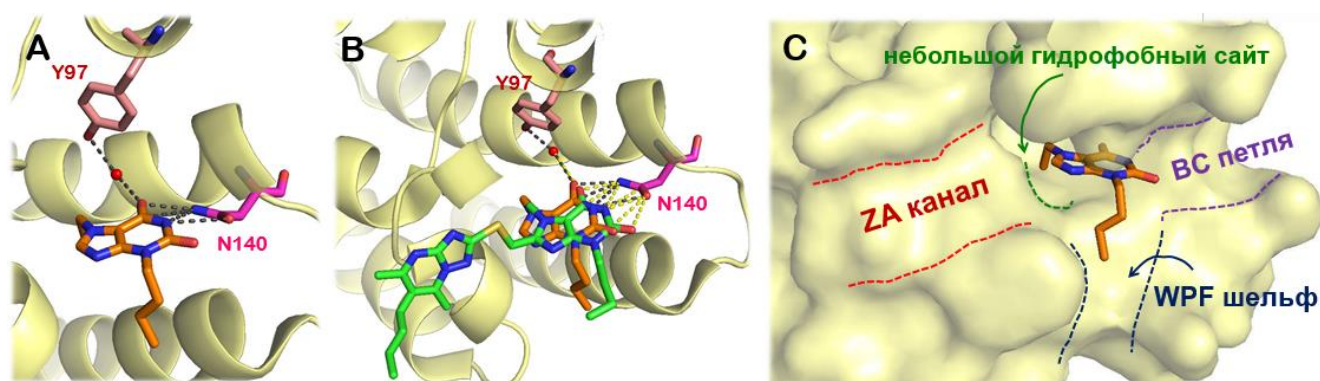


Рисунок 4. Исследование кристаллографической структуры комплекса производного ксантина #3 с Brd4(BD1) (A) Детальное изображение взаимодействий молекулы #3 (оранжевые линии) с ключевыми аминокислотными остатками N140 (пурпурные линии) и Y97 (розовые линии) (B) Суперпозиция молекул #1 и #3 в сайте связывания Brd4(BD1). Водородные связи показаны как жёлтые и серые пунктирные линии для молекул #1 и #3, соответственно (C) Возможные направления модификации молекулы #3.

Карбонильная группа в положении 2 ксантина, направленная в петлю BC, была замещена на имин с целью обеспечения дополнительной водородной связи с D144. Положение 7-этильной группы, располагающейся в небольшом гидрофобном кармане, обычно занятом метильной группой ацетилированного лизина, было модулировано путём введения небольших заместителей для исследования их влияния на закрепление лиганда в сайте связывания. 3-бутильный заместитель в WPF-шельфе замещался на ряд алкильных и бензильных групп также для дополнительной фиксации молекулы в активном сайте белка.

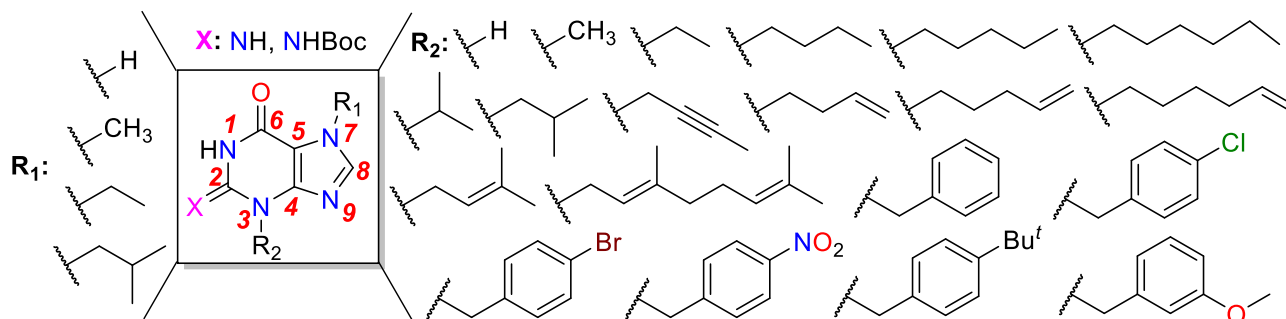


Рисунок 5. Модифицированные производные ксантина, полученные в ходе SAR исследований

Производные, соответствующие описанным направлениям модификации (Рисунок 5), были получены по ранее представленной Схеме 1 при использовании соответствующих алкилирующих агентов. Активность синтезированных соединений анализировалась методом НТНТ. Было показано, что для эффективного связывания с белком, положение 3 ксантинового ядра должно быть занято алкильной цепью, включающей не менее четырёх атомов углерода; дальнейшее удлинение цепи, а также введение кратных связей не вносит изменений в активность молекул. В случае бензильных заместителей наилучший результат был показан для групп, содержащих заместитель в *para*-положении бензольного кольца. Модификация положений 2 и 7 ксантина приводила к менее активным аналогам, по сравнению с исходной молекулой #3. Таким образом, для дальнейших исследований было выбрано производное #3,

соответствующее исходному ингибитору **#1**, и наиболее активное производное **#6**, содержащее 4-хлорбензильную группу в положении 3 ксантинового ядра (**Рисунок 6**).

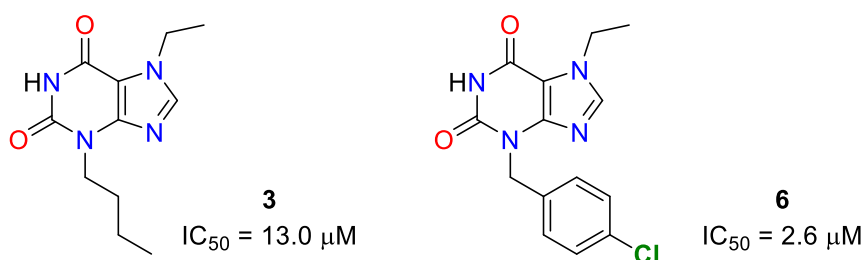


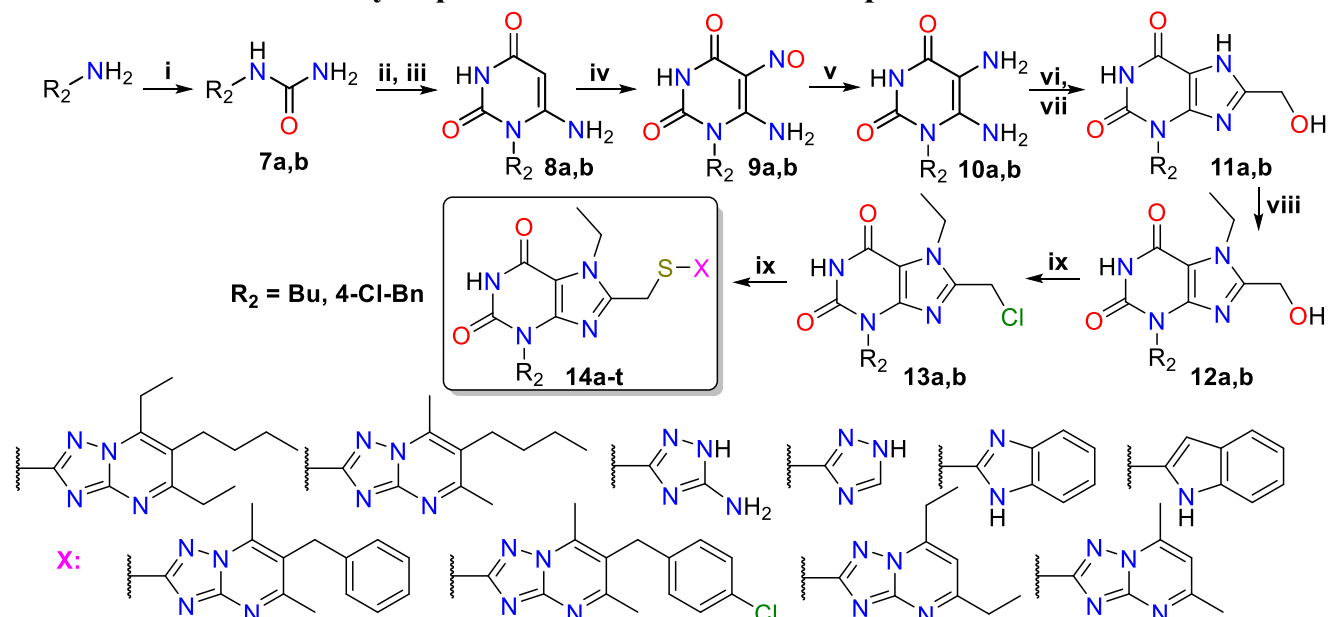
Рисунок 6. 3-алкил-7-этилксантины **#3** и **#6**, отобранные в ходе модификации ксантинового фрагмента

Оценка профилей селективности данных молекул методом HTRF показала, что оба соединения являются пан-ВЕТ ингибиторами, подтверждая предположение о том, что ксантиновое ядро играет роль только в установлении аффинности ингибитора к белкам ВЕТ, а селективность молекулы связана с наличием в ней триазолопиримидина.

2.2. Модификация триазолопиримидинильного фрагмента

Для решения вопроса, триазольный или пиримидинильный фрагмент является причиной необычной селективности ингибитора **#1**, была синтезирована серия 3,7-дизамещенных азолоксантинов **#14a-t** в десять стадий в соответствии со **Схемой 2**.

Схема 2. Синтез азолосульфанилметил-замещённых производных ксантина^a



^a Реагенты и условия: i) KOCN, HCl_{aq}-EtOH, комн.т., 12 ч, 88-98%; ii) цианоуксусная кислота, Ac₂O, 0-60°C, 30 мин, 84-99%; iii) NaOH, H₂O-EtOH, 85°C, 45 мин, 68-96%; iv) NaNO₂, HCl_{aq}, ДМФА-H₂O, 70°C, 10 мин, 86-96%; v) Na₂S₂O₄, NH₃_{aq}, 70°C, 15 мин, 68-80%; vi) гликолевая кислота, 120°C, 30 мин, 93-95%; vii) NaOH_{aq}, H₂O-EtOH, 85°C, 2 ч, 72-81%; viii) EtI, K₂CO₃, ДМФА, 0°C-комн.т., 12 ч, 72-87%; ix) SOCl₂, CH₂Cl₂, кипячение, 15 мин, 88-100%; x) K₂CO₃, ДМФА, комн.т., 30 мин, 40-98%.

Синтез начинали с превращения коммерчески доступных бутил- и 4-хлорбензил аминов в соответствующие алкилмочевины **#7a,b** обработкой цианатом калия в кислой среде. Конденсация полученных продуктов с цианоуксусной кислотой в присутствии

уксусного ангидрида с последующей щелочной циклизацией позволила получить аминоурацилы **#8a,b**. На следующем этапе проводили нитрозилирование **#8a,b** нитритом натрия в водном растворе уксусной кислоты. Восстановление образующихся интермедиатов **#9a,b** гидросульфитом натрия привело к диаминоурацилам **#10a,b** с хорошими выходами. Взаимодействие **#10a,b** с гликолевой кислотой с последующей циклизацией приводило к гидроксиметилксантинам **#11a,b**. Ключевые интермедиаты для дальнейшего удлинения молекулы, 3-алкил-8-хлорметил-7-этилксантины **#13a,b**, были получены по реакции алкилирования с последующим нуклеофильным замещением гидроксильной группы на хлор. На последней стадии активированные ксантины **#13a,b** взаимодействовали с рядом тиолов, давая целевые меркаптопурины **#14a-t**, которые были использованы для SAR исследований.

Среди полученных соединений стоит отметить BD1-селективный ингибитор **#14a** (Рисунок 7А, В).

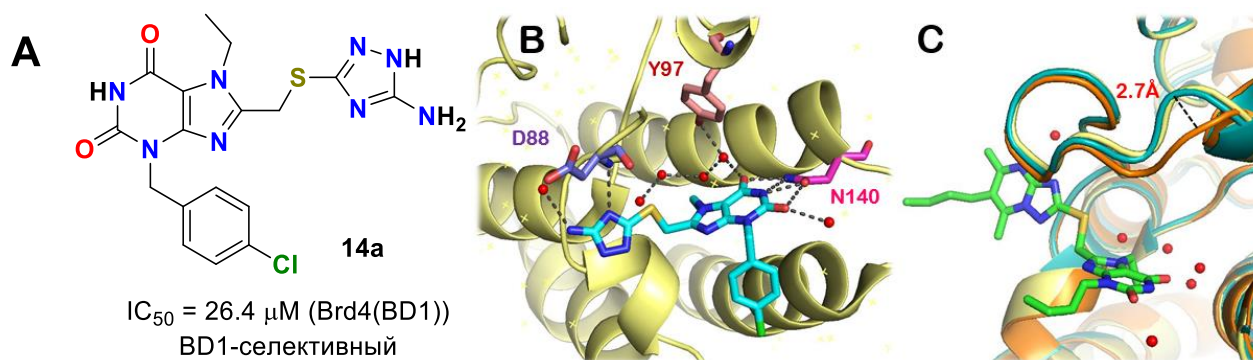


Рисунок 7. (А) Азолосульфанилметил-содержащий ингибитор **#14a** (В) Детальное изображение взаимодействий молекулы **#14a** (голубые линии) с аминокислотными остатками N140 (пурпурные линии), Y97 (розовые линии) и D88 (фиолетовые линии). Молекулы воды представлены в виде красных сфер. Водородные связи между **#14a** и аминокислотными остатками и молекулами воды представлены в виде чёрных пунктирных линий (С) Суперпозиция трёх структур: i) Brd4(BD1), не содержащий лиганда (голубой), ii) комплекс Brd4(BD1) с **#14a** (жёлтый), iii) комплекс Brd4(BD1) с **#1** (оранжевый), молекула **#1** представлена в виде зеленых линий, чёрной пунктирной линией показан сдвиг аминокислотной цепи белка.

На примере этой молекулы было показано, что введение триазолосульфанилметильного заместителя в положение 8 ксантинового цикла привносит лишь частичную селективность к первым бромодоменам членов ВЕТ-семейства белков. Дальнейшая конденсация с пиримидинильным кольцом приводит к селективности в отношении единственного члена ВЕТ, возникающей благодаря ван-дер-Ваальсовым контактам с боковой цепью глутамина Q85, являющегося характеристическим аминокислотным остатком первого бромодомена. Во вторых бромодоменах он замещен на лизин, взаимодействие с которым невозможно в виду стерических затруднений. Кроме того, было показано, что водородная связь с аспарагиновой кислотой D88, характерной для всех членов ВЕТ, может быть стабилизирована только для определённых бромодоменов, что связано с различиями в динамике ЗА-петли, ключевой для кинетики связывания белков ВЕТ. Суперпозиция комплексов Brd4(BD1) с молекулами **#1** и **#14a** иллюстрирует структурную перестройку белка со смещением петли ЗА на 2.7 Å (Рисунок 7С). Подобные перестройки не характерны для комплекса Brd4(BD1) ни с **#14a**, ни с пан-ингибитором **#3**. Эти данные подтверждают выдвинутое предположение о ключевой роли триазолопиримидинильного фрагмента в индивидуальной селективности

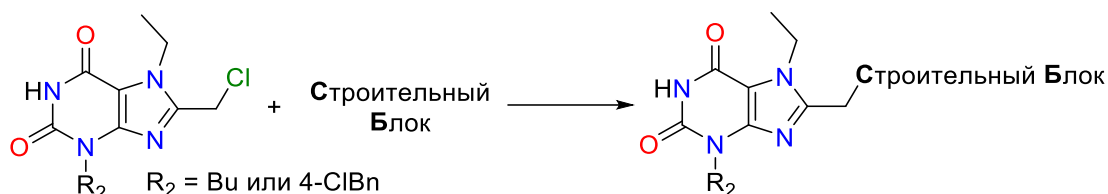
#1 и предлагают возможный путь достижения селективности при синтезе новых ингибиторов ВЕТ.

2.3. Оптимизация ингибитора **#1** с использованием DOTS-подхода

С целью получения новых ингибиторов, обладающих Brd4(BD1)-селективностью, а также улучшенной активностью, была создана химическая библиотека аналогов молекулы **#1** посредством подхода DOTS (Diversity Oriented Target-focused Synthesis).

На первом этапе генерировалась виртуальная библиотека путём объединения способного связываться с белком активного фрагмента, соответствующего ранее полученным 3-алкил-7-этилксантинам (**#3** и **#6**), с коллекцией функционализированных строительных блоков посредством *in silico* отобранных химических реакций, отвечающих требованиям медицинской химии (Схема 3). Компьютерный скрининг получающейся виртуальной библиотеки позволил отобрать молекулы, обладающие необходимыми структурными и физико-химическими свойствами.

Схема 3. Дизайн химической библиотеки, базирующейся на активном ксантиновом фрагменте



Для быстрого и эффективного получения серии выбранных производных была использована платформа роботизированного синтеза «Chemspeed Accelerator Synthesizer».

Анализ активности полученных 80 новых молекул показал сходную или до 5 раз улучшенную активность в случае R₂-хлорбензилсодержащих аналогов. Однако, все R₂-бутил-содержащие ингибиторы демонстрировали существенную потерю аффинности, что не соответствовало предсказанным результатам. Причина такого значительного снижения эффективности была выявлена при детальном анализе кристаллографической структуры комплекса **#1** с Brd4(BD1).

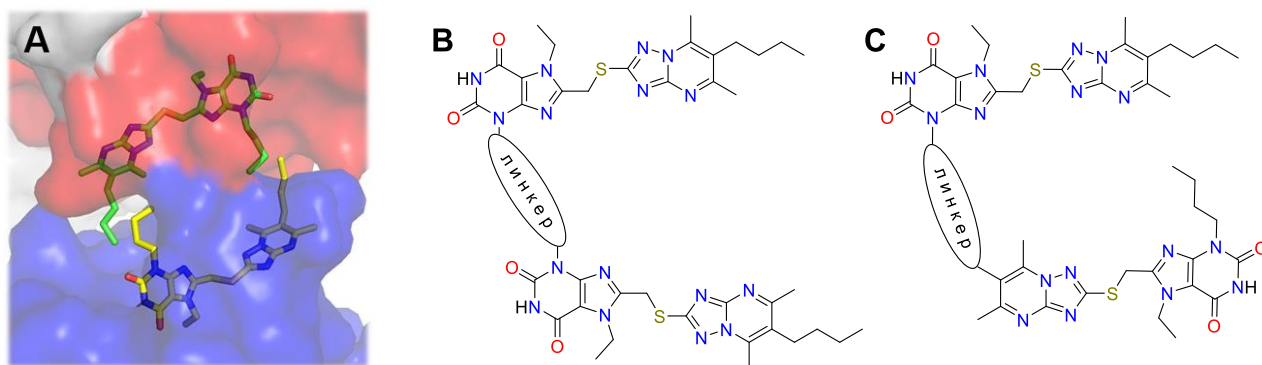


Рисунок 8. (А) Димеризация Brd4(BD1), индуцируемая связыванием с **#1**. (В) Общая структура гомобивалентных аналогов **#1** (С) Общая структура гетеробивалентных аналогов **#1**.

Показано, что связывание **#1** с Brd4(BD1) индуцирует димеризацию белка в кристаллической ячейке (Рисунок 8А), что значительно усиливает аффинность по сравнению с индивидуальным комплексом за счёт эффекта авидности (совокупного эффекта всех возникающих взаимодействий между лигандом и белком). Такой

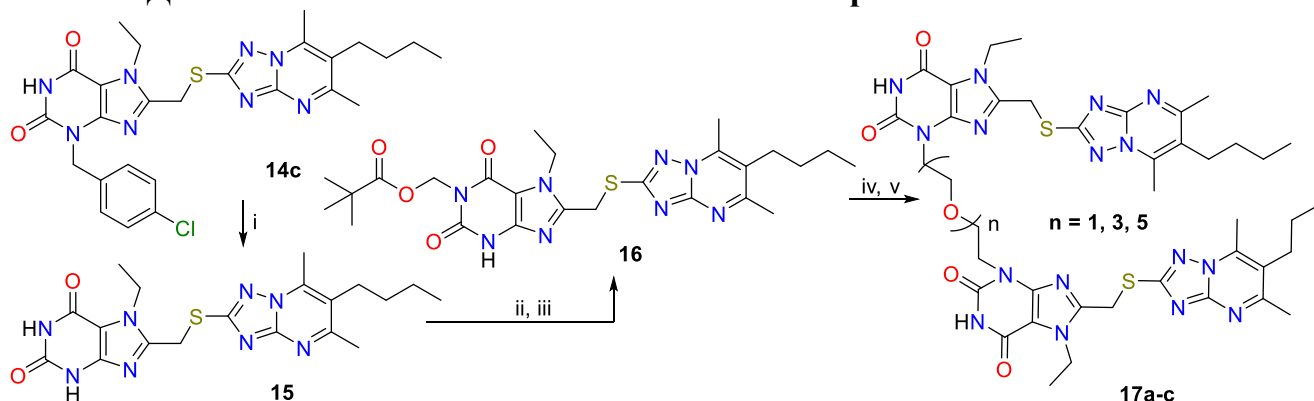
непредвиденный эффект не был учтён в подходе DOTS, и синтезированные молекулы библиотеки, очевидно, были неспособны обеспечить образование димера, что и привело к их более низкой активности.

2.4. Дизайн и синтез бивалентных ингибиторов на основе молекулы #1

Обнаружение уникального эффекта индуцируемой димеризации белка позволило предложить серии ингибиторов, содержащих два активных ядра, соединённых гибким ПЭГ-линкером, для мультивалентного связывания с двумя доменами Brd4 (Рисунок 8В,С).

Синтез гомобивалентных ингибиторов осуществлялся в пять стадий, исходя из ранее полученного соединения **#14с** (Схема 4). На первой стадии 4-хлорбензильная группа соединения **#14с** удалялась действием трибромида бора. Получившийся 3-незамещённый ксантин **#15** вступал в реакцию с хлорметилпивалатом с образованием соответствующего 1,3-дипивалоилоксиметиламида. Затем осуществлялось селективное удаление защитной группы в положении 3 под действием мягкого основания DBU. Такое сочетание стадий введения и удаления защитных групп было необходимо для того, чтобы избежать внутримолекулярной циклизации **#15** при его реакции с дибромидом ПЭГ_n. Полученный в результате удаления одной пивалоилоксиметильной группы интермедиат **#16** затем алкилировался субстехиометрическим количеством ПЭГ_nBr₂ в присутствии NaI. Финальная стадия удаления защитной группы в положении 1 позволила получить **#17а-с** с общими выходами 8-29%.

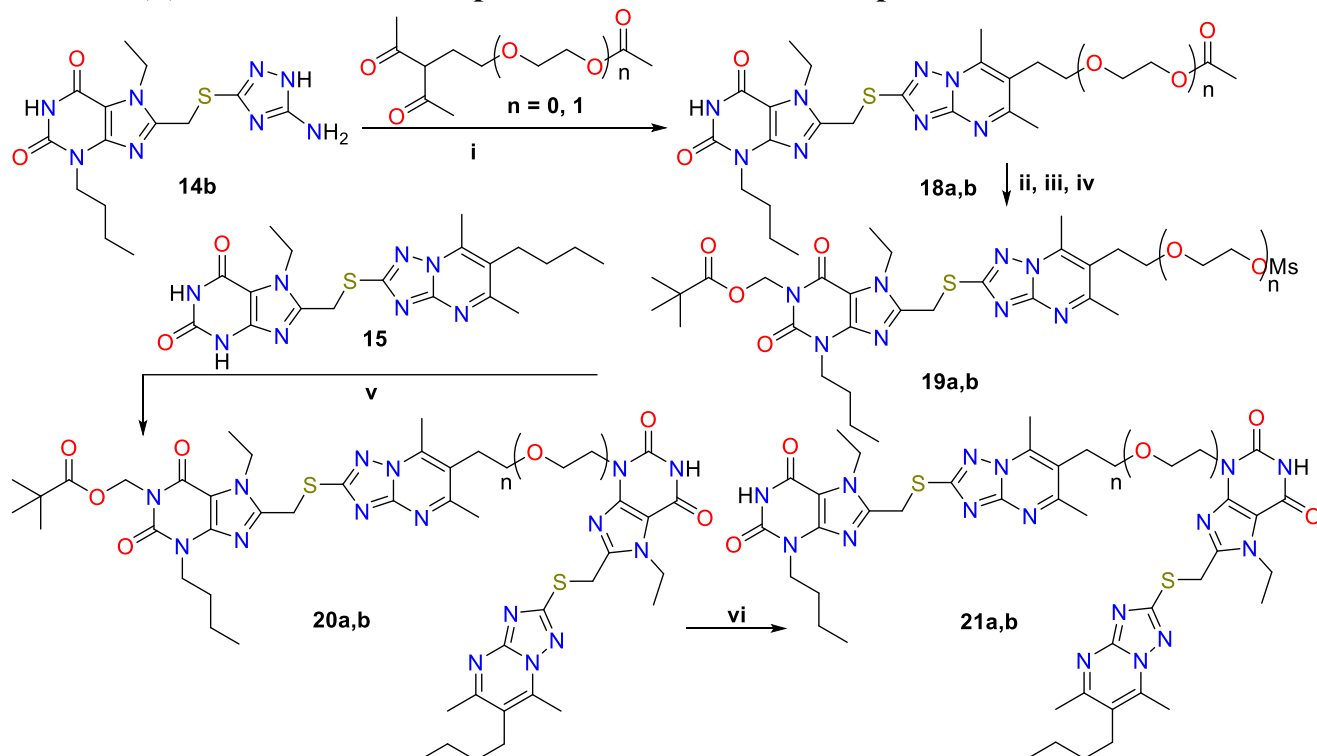
Схема 4. Дизайн и синтез гомобивалентных ингибиторов^а



^а Реагенты и условия: i) BBr_3 , TolH, кипячение, 6 ч, 80-83%; ii) $PivOCH_2Cl$, K_2CO_3 , ДМФА, комн.т., 5 дней, 55%; iii) DBU, ТГФ-МеОН, комн.т., 3 дня, 63%; iv) ПЭГ_nBr₂, K_2CO_3 , NaI, ДМАА, 50°C, 3 ч, 81-100%; v) NaH, MeOH, комн.т., 5 ч, 36-100%.

Для синтеза гетеробивалентных аналогов (Схема 5) проводилась циклизация аминотриазол-содержащего производного **#14b** с соответствующими дикетонами, содержащими ацетилированный ПЭГ-линкер. Последующее омыление полученных интермедиатов **#18a,b**, введение пивалатной защитной группы в положение 1 ксантинового ядра и активация гидроксильной группы приводили к соответствующим производным **#19a,b**. Далее проводили конденсацию полученных соединений с интермедиатом **#15**, общим для синтеза гомо- и гетеробивалентных ингибиторов. На последней стадии защитная амидная группа в положении 1 ксантина удалялась с образованием целевых гетеробивалентных производных **#21a,b** с общими выходами шести стадий 6-18%.

Схема 5. Дизайн и синтез гетеробивалентных ингибиторов^a



^a Реагенты и условия: i) пиперидин; AcOH, 120 °C, 12 ч, 76-99%; ii) LiOH, MeOH, комн.т., 1 ч, 89-92%; iii) PivOCH₂Cl, K₂CO₃, ДМФА, комн.т., 3 дня, 43-68%; iv) метансульфонил хлорид, TEA, CH₂Cl₂, 0°C-комн.т., 12 ч, 84-100%; v) K₂CO₃, ДМФА, комн.т.-80°C, 12 ч, 33-35%; vi) LiOH, MeOH, комн.т., 4 ч, 70-84%.

HTRF анализ полученных молекул показал выигрыш в аффинности до 1 порядка в случае гомобивалентных производных (наиболее активным оказался аналог, содержащий ПЭГ₁-линкер). Гетеробивалентные производные демонстрировали значения активности, сходные с полученными для ингибитора #1, что говорит об их неспособности одновременно связываться с двумя бромодоменами.

Несмотря на то, что идея повышения активности ингибиторов за счёт эффекта авидности является весьма многообещающей, для её реализации необходимо преодолеть ряд трудностей. Главным препятствием в достижении мультивалентного связывания является определение подходящего пространственного расположения двух активных фрагментов друг относительно друга. Предсказание типа одновременного связывания лиганда с двумя доменами является довольно сложной задачей, в виду того, что эффективное мультивалентное взаимодействие зависит от ряда параметров, таких как длина, природа и ориентация линкера, соединяющего два активных ядра. Для определения правил выбора подходящего линкера должен быть применён более систематизированный подход, что позволит обеспечить оптимальное взаимодействие ингибитора с двумя доменами.

3. Исследование Brds(BD1)-селективного ингибирования на примере молекулы #2

3.1. Предварительная программа SAR молекулы #2

Несмотря на достаточную аффинность ингибитора #2 к Brd4(BD1), не удалось получить его кристаллический комплекс с белком для рентгеноструктурного анализа. На основании изучения комплексов известных ВЕТ-ингибиторов с бромодоменом, представленных в базе PDB (Protein Data Bank), было высказано предположение о том,

что за афинность молекулы может быть ответственен бензоазепиноновый фрагмент, благодаря наличию в нем амидной группы, способной к установлению водородных связей с ключевыми аминокислотными остатками N140 и Y97.

В соответствии с этой гипотезой, был осуществлён дизайн и синтез серии производных с целью изучения корреляции структура-активность. Предполагалось сохранить бензоазепиноновое ядро без изменений, модифицируя оставшуюся часть молекулы, включая природу и положение гетероцикла, а также длину и природу линкера (Рисунок 9).

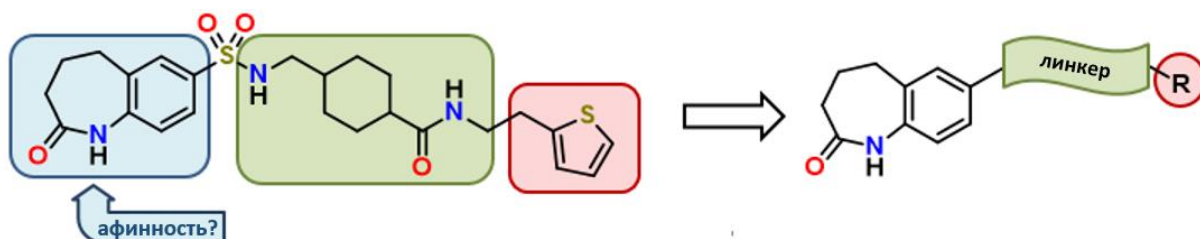
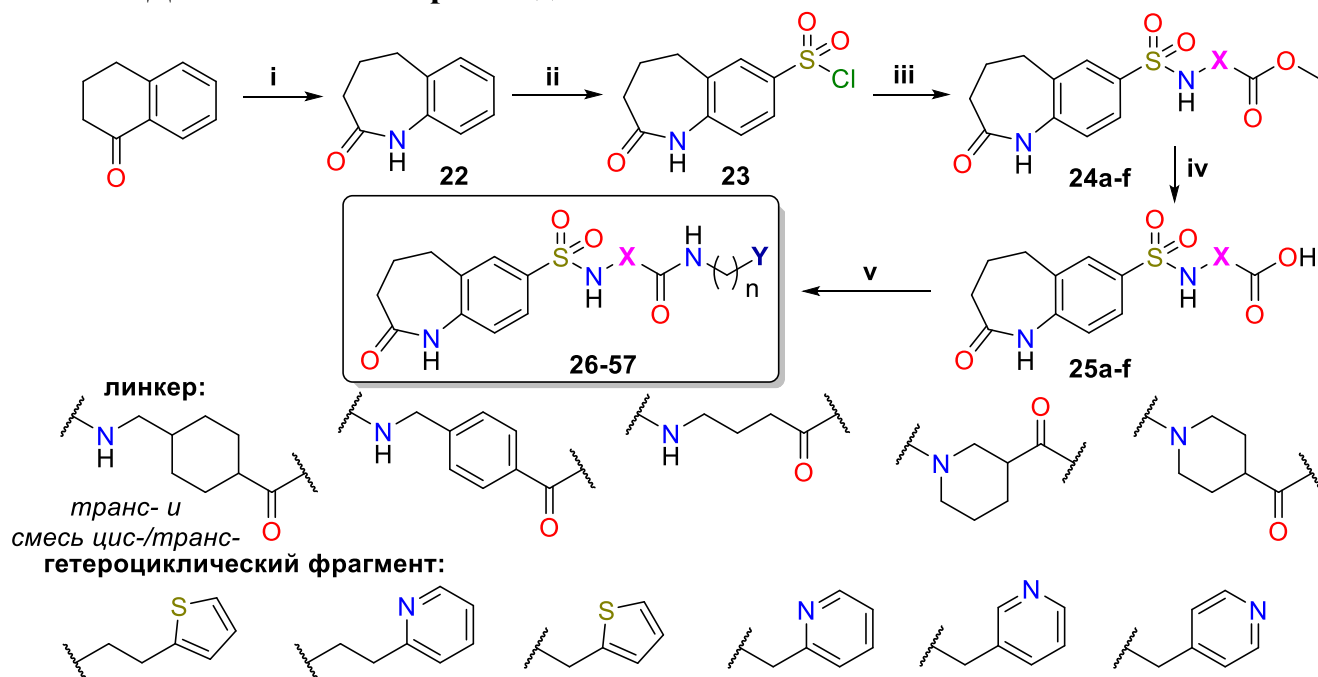


Рисунок 9. Возможные пути модификации ингибитора #2. Бензоазепиноновое ядро, предположительно ответственное за афинность молекулы к белку, выделено голубым цветом; гетероцикл выделен красным цветом; линкер выделен зелёным цветом.

Синтез серии бензоазепинонов #26-57 проводился, исходя из коммерчески доступного тетралона (Схема 6). Катализируемая серной кислотой реакция Шмидта с азидом натрия приводила к лактаму #22, который затем вступал в реакцию ароматического электрофильного замещения. Получающийся сульфонил хлорид #23 реагировал с рядом метиловых эфиров аминокислот с образованием сульфонамидов #24a-f. Образующиеся в результате омыления карбоновые кислоты #25a-f были использованы в реакции пептидного синтеза с рядом аминов в присутствии CDI или BOP реагентов, давая целевые ацетамиды #26-57 с общими выходами до 54%.

Схема 6. Дизайн и синтез производных бензоазепинона^a



^a Реагенты и условия: i) NaN_3 , H_2SO_4 конц., 0°C -комн.т., 48 ч, 93%; ii) HSO_3Cl , комн.т., 20 ч, 72%; iii) метиловый эфир аминокислоты, TEA, CH_2Cl_2 , комн.т., 6 ч, 49-99%; iv) 1M KOH, MeOH, 60°C , 4 ч, 56-90%; v) амин, CDI или BOP, комн.т., 48 ч, 26-90%.

Большая часть производных оказалась неактивна, что поставило под сомнение гипотезу о ключевой роли бензоазепинового ядра в афинности ингибитора #2. Разрешённая кристаллографическая структура комплекса одного из производных (#40) с Brd4(BD1) показала, что сайт связывания белка, действительно, оказывается занят гетероциклическим фрагментом, а не бензоазепином, как предполагалось ранее (**Рисунок 10**). При этом гетероцикл не образует водородных связей с ключевыми аминокислотными остатками N140 и Y97, лишь механически занимая сайт связывания, что и объясняет низкую активность полученных производных.

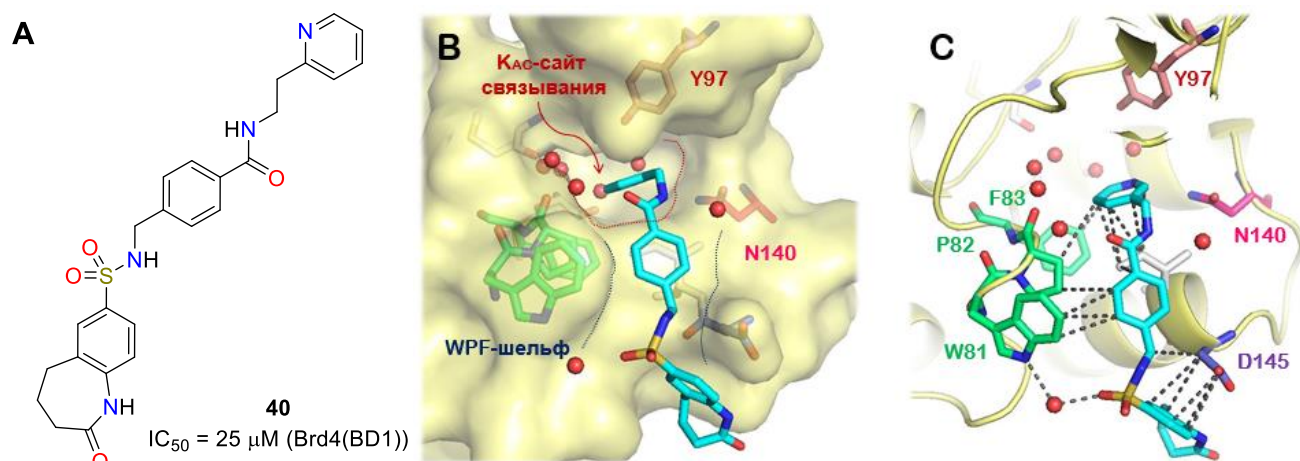


Рисунок 10. Взаимодействие ингибитора #40 с сайтом связывания Brd4(BD1) (А) Структура 4-(((2-оксо-2,3,4,5-тетрагидро-1H-бензо[*b*]азепин)-7-сульфонамидо)метил)-N-(2-(пиридин-2-ил)этил)бензамида **#40** (В) Положение ингибитора **#40** в сайте связывания ацетил-лизина (С) Детальное изображение взаимодействий молекулы **#40** (голубые линии) с аминокислотными остатками W81, P82, F83 (зелёные линии), D145 (фиолетовые линии). Ключевые аминокислотные остатки сайта связывания Brd4(BD1) N140 и Y97 представлены как пурпурные и розовые линии. Молекулы воды представлены в виде красных сфер. Водородные связи и ван-дер-Ваальсовы контакты между **#40** и аминокислотными остатками и молекулами воды представлены в виде чёрных пунктирных линий.

3.2. Модификация ядра, ответственного за активность

Принимая во внимание несоответствие лиганда сайту связывания белка, был предпринят поиск более подходящих активных фрагментов, способных обеспечивать образование водородных связей с аспарагином N140 и тирозином Y97. Так, суперпозиция структуры ранее полученного ксантинового ингибитора **#6** со структурой **#40** выявила их довольно хорошую совместимость (**Рисунок 11А**). Бензильная группа **#6**, по-видимому, может быть легко объединена с бензоазепином через сульфонамидную группу (соединение **#63**, **Рисунок 11В**) без смещения лиганда в активном сайте белка.

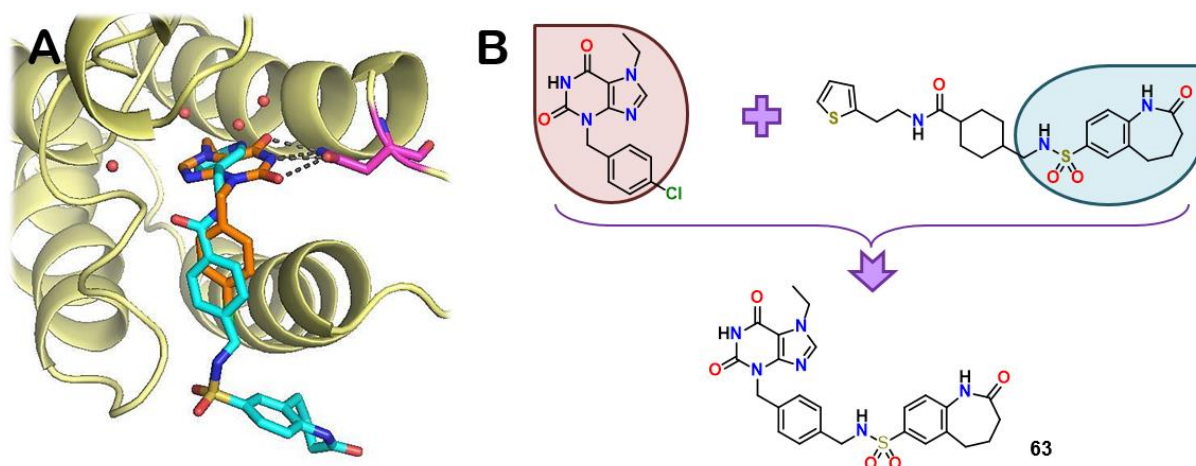
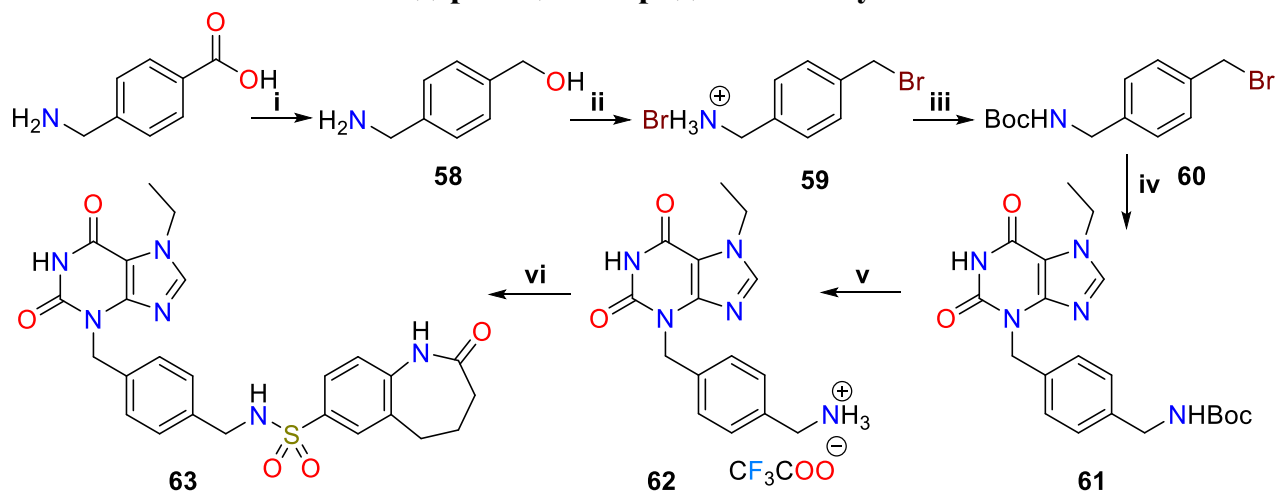


Рисунок 11. Дизайн молекулы-гибрида соединений #2 и #6 (А) Суперпозиция молекул #2 и #6 в сайте связывания Brd4(BD1) (В) Объединение бензилксантина, выделенного бордовым, с бензоазепинон сульфонамидом (выделенным синим) для получения гибридной молекулы #63.

Синтез соединения #63 был осуществлён в соответствии со **Схемой 8**. На первом этапе из коммерчески доступной 4-(аминометил)бензойной кислоты в три стадии получали Вос-защищённый 4-бромметилбензиламин #60 путём восстановления литий алюминий гидридом с последующим нуклеофильным замещением гидроксильной группы на бром и введением *N*-защитной группы. Конденсация #60 с 7-этилксантином #5 позволила получить 3-бензил-содержащий ксантин #61. Затем проводилось удаление защитной Вос-группы в кислой среде, и образовавшийся амин #62 вступал в реакцию конденсации с сульфонилхлоридом #23, давая целевую гибридную молекулу #63 с суммарным выходом шести стадий 22%.

Схема 8. Синтез ксантин-содержащей гибридной молекулы #63^a



^a Реагенты и условия: i) ЛАГ, ТГФ, 0°C-кипячение, 12 ч, 97%; ii) 46% HBr, H₂O, кипячение, 3.5 ч, 89%; iii) Вос₂O, NaHCO₃, H₂O-диоксан, комн.т., 18 ч, 73%; iv) 7-этил-1H-пурин-2,6(3H,7H)-дион #5, K₂CO₃, ДМФА, комн.т., 12 ч, 51%; v) CF₃COOH, CH₂Cl₂, комн.т., 2 ч, 100%; vi) 2-оксо-2,3,4,5-тетрагидро-1H-бензо[b]азепин-7-сульфонилхлорид #23, TEA, CH₂Cl₂, комн.т., 1 ч, 68%.

Анализ полученного гибридного производного #63 показал, что данное соединение активно в наномолярном диапазоне концентраций, демонстрируя IC₅₀ = 283 нМ, т.е. в 30 и 10 раз выше, чем у оригинальных ингибиторов #2 (8.9 μМ) и #6 (2.6 μМ). Кроме того,

методами HTRF, BROMOscan и BromoMELT было показано преимущественное связывание **#63** с первым бромодоменом ВЕТ-белков, однако селективность не превышала 10 единиц. Разрешенная кристаллографическая структура данного ингибитора с Brd4(BD1) подтвердила образование ксантиновым фрагментом водородных связей с ключевыми аминокислотными остатками N140 и Y97. Бензоазепиноновый фрагмент в свою очередь взаимодействовал с F79 и D145 посредством ван-дер-Ваальсовых контактов, а также водородной связи с D145, что вносило дополнительный вклад в афинность данного лиганда (**Рисунок 12**).

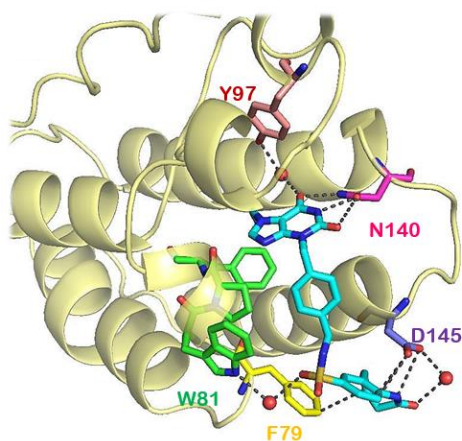


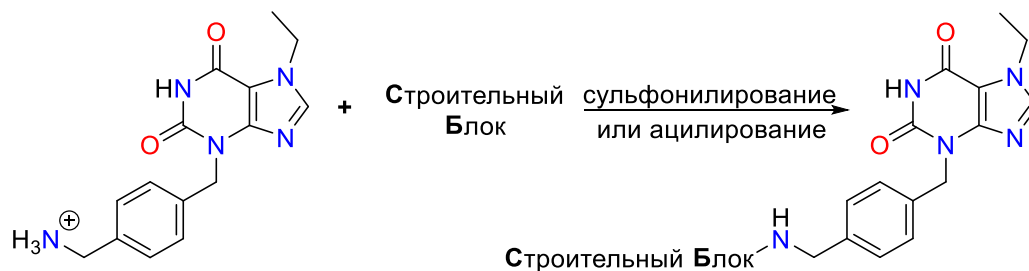
Рисунок 12. Взаимодействие ингибитора #63 с сайтом связывания Brd4(BD1) Детальное изображение взаимодействий молекулы **#63** (голубые линии) с аминокислотными остатками N140 (пурпурные линии), Y97 (розовые линии), W81 (зеленые линии), F79 (жёлтые линии) и D145 (фиолетовые линии). Молекулы воды представлены в виде красных сфер. Водородные связи и ван-дер-Ваальсовы контакты между **#63** и аминокислотными остатками и молекулами воды представлены в виде чёрных пунктирных линий

3.3. Оптимизация ингибитора **#63** с использованием DOTS-подхода

С целью повышения селективности полученного ингибитора была предложена идея модуляции заместителя направленного в канал WPF, в частности заполняющего небольшой подсайт, представленный аминокислотными остатками F79, D145 и L148 (Brd4(BD1)). Данные аминокислотные остатки характерны исключительно для первых бромодоменов ВЕТ, и связывание ингибитора с ними может обеспечить лучшую BD1-селективность.

Дизайн химической библиотеки ингибиторов, содержащих модифицированный фрагмент, направленный в WPF-шелф, осуществлялся с использованием описанного ранее подхода DOTS, объединяющего компьютерные и автоматизированные экспериментальные методы. В качестве активного исходного фрагмента был выбран ранее полученный 4-аминометилбензилксантин **#62**. Затем ряд коммерчески доступных строительных блоков (сульфонилхлоридов, хлорангидридов и карбоновых кислот) виртуально объединяли с активным фрагментом для получения химической библиотеки, содержащей 576 молекул (**Схема 9**).

Схема 9. Дизайн химической библиотеки производных ксантина с использованием подхода DOTS



После всех стадий виртуального скрининга полученной библиотеки, 56 структур были отобраны для дальнейшего роботизированного синтеза и анализа. Среди синтезированных производных 8 молекул показали наномолярную активность в HTRF-тестах и до 39 раз более сильное связывание с первым бромодоменом Brd4 по сравнению со вторым (**Рисунок 13**).

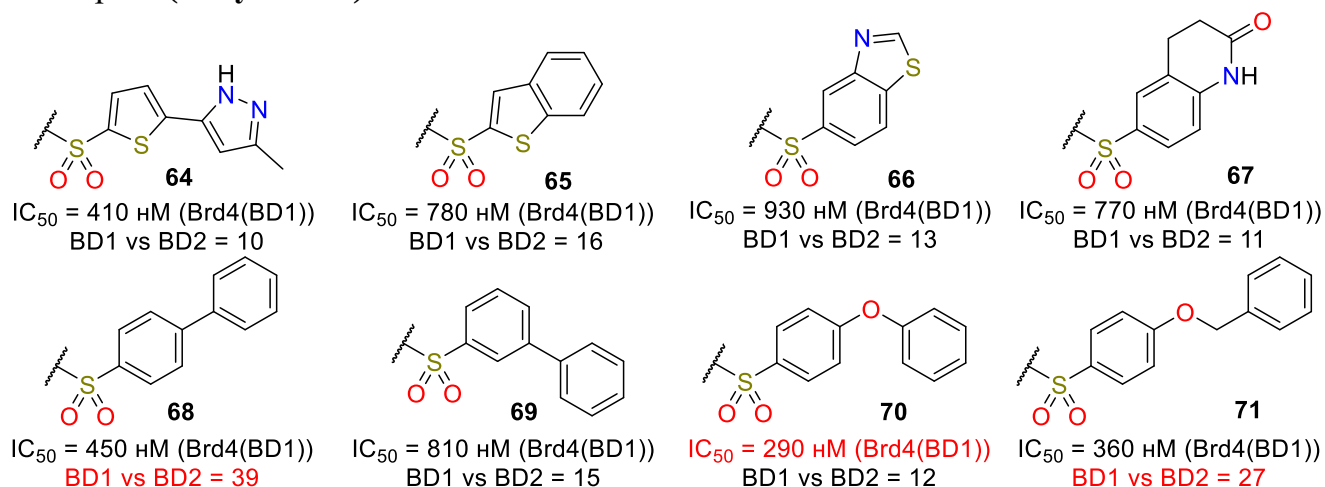


Рисунок 13. Избранные ингибиторы, синтезированные с использованием подхода DOTS

Для того, чтобы идентифицированные эффективные ингибиторы могли стать молекулами-кандидатами для дальнейших доклинических испытаний, они должны удовлетворять ряду условий, таких как: высокая биохимическая и клеточная активность, селективность внутри семейства, биофизические доказательства взаимодействия с мишенью, отсутствие PAINS (Pan-Assay Interference Compounds), наличие неактивного контроля, хорошая растворимость в воде и органических растворителях и химическая стабильность. Найденные молекулы обладали достаточной биохимической активностью и селективностью, поэтому были проведены исследования их эффективности на клеточных линиях лейкоза человека Jurkat и MOLM14. Однако, анализ показал, что все соединения имеют низкую антипролиферативную активность со значениями EC_{50} от 5.2 до $> 50 \mu\text{M}$. Такой незначительный эффект в клеточных тестах не соответствовал высокой *in vitro* активности, продемонстрированный молекулами в ходе HTRF анализа на белках.

При проведении клеточных испытаний была зафиксирована низкая растворимость соединений даже при небольших концентрациях, что могло бы объяснить полученные значения EC_{50} . Для проверки этого предположения была проведена оценка максимальной концентрации молекул в растворе H_2O -ДМСО (99:1) методом ВЭЖХ (**Таблица 1**), подтвердившая низкую растворимость.

Таблица 1. Растворимость производных ксантина в смеси H_2O -ДМСО (99:1)

	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70	#71
$C_{\text{max}} (\mu\text{M})^a$	8	7	9	17	1	5	1	1

^a Растворимость соединений была определена с помощью ВЭЖХ в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера

Вместе с тем, достаточная растворимость в воде – одно из ключевых требований к лекарственным молекулам, и улучшение растворимости, зачастую, одна из наиболее важных задач в медицинской химии. С этой целью параллельно были предприняты (а) введение в структуру молекулы гидрофильной группы и (б) снижение планарности

молекулы, приводящее к менее плотной упаковке молекул в кристаллической решетке. В соответствии с этим подходом были получены шесть новых производных (**Рисунок 14**).

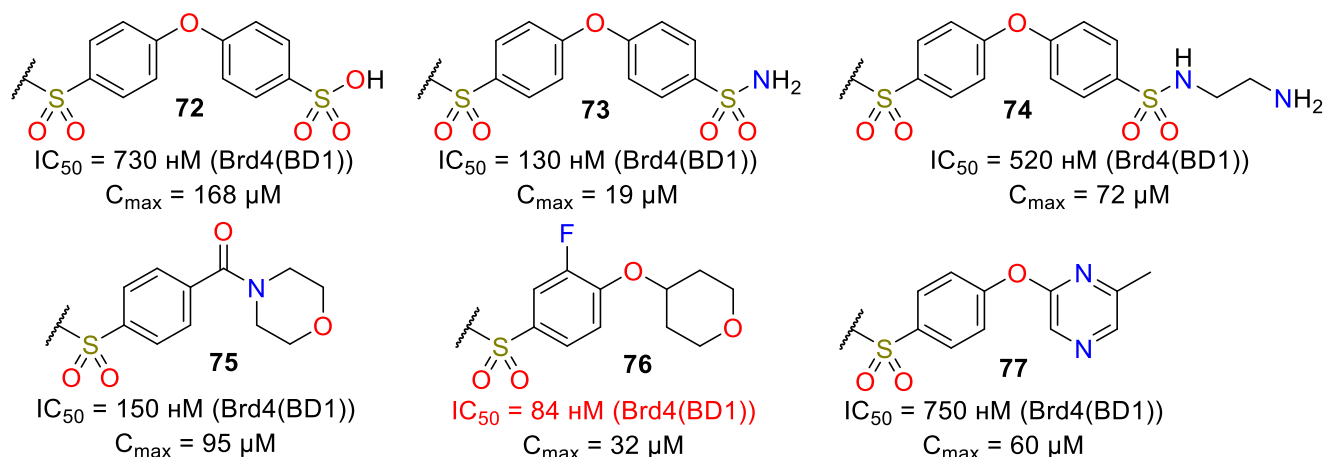


Рисунок 14. Производные ксантина с улучшенной растворимостью в воде

Все полученные производные демонстрировали улучшенную растворимость в воде, при этом соединение **#76** показало непредвиденно высокую активность ($IC_{50} = 84$ нМ) в HTRF-тестах. Клеточная активность данной молекулы была подтверждена люминесцентным анализом ($EC_{50} = 1.6$ μ М, MOLM14) и методом *c-Myc* HTRF, оценивающим влияние ингибитора на экспрессию гена *c-Myc* в живых клетках ($EC_{50} = 2.4$ μ М, Jurkat).

Был проведён более детальный анализ свойств **#76**. Высокая афинность лиганда к Brd4(BD1) была подтверждена методом ИТС ($K_D = 90$ нМ). Оценка селективности методом HTRF показала, что молекула в 22 раза сильнее связывается с первым бромодоменом Brd4 по сравнению со вторым. BROMOscan анализ, проведённый на всех членах ВЕТ, также продемонстрировал преимущественное связывание соединения **#76** с Brd4(BD1) с $K_D = 32$ нМ и непредвиденно высокую селективность с соотношением афинностей к первому и второму бромодоменам достигающим 313. Кроме того, селективность **#76** была изучена по отношению к 61 бромодомену с использованием анализа BromoMELT. Было показано, что **#76** стабилизирует только ВЕТ-семейство белков, в особенности Brd4(BD1) ($\Delta T_{пл} = +5.25^\circ\text{C}$) и Brd3(BD1) ($\Delta T_{пл} = +4.5^\circ\text{C}$).¹

Для объяснения высокой селективности соединения **#76** был получен кристаллографический комплекс молекулы с белком. Показано, что фенилокситетрагидропирановый фрагмент устанавливает значительное количество ван-дер-Ваальсовых контактов с каждым из трёх характеристических аминокислотных остатков первого бромодомена F79, D145 и L148, замещённых во вторых бромодоменах на Y372, E438 и A441, очевидно, неспособных к необходимым взаимодействиям, что и приводит к преимущественному связыванию молекулы с Brds(BD1)-доменами. Полученные результаты предлагают потенциальный механизм достижения селективности внутри ВЕТ-семейства белков.

Таким образом, молекула **#76** является на сегодняшний день наиболее эффективным и селективным ингибитором первого бромодомена ВЕТ, и удовлетворяет всем необходимым критериям, включая клеточную активность, чтобы стать молекулой-кандидатом для последующих доклинических и клинических испытаний на более сложных биологических системах.

¹ $\Delta T_{пл}$ – разница в температурах плавления белка в свободном состоянии и в комплексе с лигандом

Одной из основных задач дальнейших биологических исследований является определение эффекта селективного ингибирования на функцию генов посредством геномных и протеомных подходов на живых клетках методами FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) и CHIP-seq. Кроме того, критической частью разработки новых лекарственных молекул являются исследования ADMET (абсорбция, распределение, метаболизм, выведение и токсичность) и сравнительной растворимости. Данные исследования будут проведены на платформе TechMed (Страсбург) для подготовки доклинических испытаний молекулы #76. Тесты на клеточных и животных моделях будут осуществляться в сотрудничестве с платформой TrGET (Марсель) с целью оценки биологической активности молекулы *ex vivo* и *in vivo*.

Таким образом, вышеупомянутые исследования разработанного нами эффективного и селективного соединения #76 позволят подготовить дальнейшие доклинические и клинические испытания и сделать вывод о преимуществах использования селективно действующих молекул вместо пан-BET ингибиторов в клинической практике с точки зрения эффективности, селективности транскрипционного эффекта и толерантности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Созданы первые селективные ингибиторы BET-белков, специфично связывающиеся с Brd4(BD1)-доменом белков BET (с одним из восьми доменов BET), на основе соединений, включающих в состав замещенные ксантиновые и триазолопиримидиновые фрагменты, связанные посредством тиометиленового линкера. Синтезированы библиотеки аналогов указанных BET-ингибиторов (более 100 молекул). Методом РСА установлено, что в комплексах BET-белок/ингибитор ксантиновый фрагмент образует водородные связи с ключевыми аминокислотными остатками N140 и Y97, тем самым играя основную роль в аффинности полученных ингибиторов. Триазолопиримидинильный фрагмент, связываясь с характеристическими аминокислотными остатками D88, Q85 и L92, отвечает за индивидуальную селективность ингибиторов к Brd4(BD1).
2. Показано, что связывание триазолопиримидинил-замещенных ксантинов с Brd4(BD1) вызывает лиганд-индуцируемую димеризацию белка. Синтезированы серии гомо- и гетеробивалентных ксантиновых BET-ингибиторов, демонстрирующих улучшенную аффинность и селективность к Brds(BD1).
3. Созданы первые низкомолекулярные ингибиторы, селективные к Brds(BD1)-членам BET-семейства белков (ингибируют четыре из восьми бромодоменов белков BET), путём объединения ксантинового ядра с бензоазепиноновым, арильными и гетероарильными фрагментами посредством бензилсульфонамидного линкера. Синтезирована новая химическая библиотека, включающая 54 молекулы. Методом РСА комплексов BET-белок/ингибитор показано, что образование контактов с характеристическими аминокислотными остатками первых бромодоменов (F79, L148, D145) приводит к селективности ингибиторов к Brds(BD1).
4. Получен ингибитор, удовлетворяющий ключевым критериям лекарственных молекул, включая высокую биохимическую и клеточную активность, селективность к Brds(BD1), дозозависимое подавление экспрессии важнейшего протоонкогена *c-Myc*, а также хорошую растворимость в воде. Синтезированная молекула направлена на доклинические испытания.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Voitovich, Yu.** Integrated Strategy for Lead Optimization Based on Fragment Growing: The Diversity-Oriented-Target-Focused-Synthesis Approach / L. Hoffer, **Yu. Voitovich**, B. Raux, K. Carrasco, C. Muller, A. Fedorov, C. Derviaux, A. Amouric, S. Betzi, D. Horvath, A. Varnek, Y. Collette, S. Combes, P. Roche, X. Morelli // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – №61. – P. 5719-5732.
2. **Voitovich, Yu.** Exploring Selective Inhibition of the First Bromodomain of the Human Bromodomain and Extra-terminal Domain (BET) Proteins / B. Raux, **Yu. Voitovich**, C. Derviaux, A. Lugari, E. Rebuffet, S. Milhas, S. Priet, T. Roux, E. Trinquet, J.-C. Guillemot, S. Knapp, J.-M. Brunel, A. Fedorov, Y. Collette, P. Roche, S. Betzi, S. Combes, X. Morelli // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016 – №59. – P. 1634-1641.
3. Morelli, X. Xanthine derivative inhibitors of BET proteins / X. Morelli, S. Combes, J.-C. Guillemot, S. Betzi, Y. Collette, P. Roche, A. Lugari, S. Milhas, B. Raux, **Iu. Voitovich** // Международный патент, WO2016EP82731 20161227, 2015-12-29.
4. Hoffer, L. Diversity-Oriented Target-focused Synthesis (DOTS): A hit optimization strategy combining molecular modeling and automated synthesis platform / L. Hoffer, **Yu. Voitovich**, C. Derviaux, B. Raux, K. Barral, JM Brunel, S. Betzi, A. Varnek, D. Horvath, P. Roche, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «Chemoinformatics Strasbourg Summer School», 2015, Strasbourg, France, P. 9.
5. **Voitovich, Yu.** Exploring Selective Inhibition of the First Bromodomain of the Human Bromodomain and Extra-terminal Domain (BET) Proteins / Yu. Voitovich, B. Raux, C. Derviaux, S. Milhas, S. Knapp, J.-M. Brunel, A. Fedorov, Y. Collette, P. Roche, S. Betzi, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «24th Annual Meeting of the Doctoral School in Biology and Health Science», 2015, Marseille, France, P. 138.
6. Hoffer, L. Diversity-Oriented Target-focused Synthesis (DOTS): A hit optimization strategy combining molecular modeling and automated synthesis platform / L. Hoffer, **Yu. Voitovich**, C. Derviaux, B. Raux, K. Barral, JM Brunel, S. Betzi, A. Varnek, D. Horvath, P. Roche, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «14ème Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Marseille», 2015, Marseille, France, P. 36.
7. **Voitovich, Yu.** Exploring Selective Inhibition of the First Bromodomain of the Human Bromodomain and Extra-terminal Domain (BET) Proteins / **Yu. Voitovich**, B. Raux, C. Derviaux, S. Milhas, S. Knapp, J.-M. Brunel, A. Fedorov, Y. Collette, P. Roche, S. Betzi, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «14ème Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Marseille», 2015, Marseille, France, P. 37.
8. **Voitovich, Yu.** Coordination features of the first BRD4(BD1) selective inhibitor with BET-proteins / **Yu. Voitovich**, A. Fedorov, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «27th International Chugaev Conference on Coordination Chemistry», 2017, Nizhny Novgorod, P. Y53.
9. Hoffer, L. Diversity-Oriented Target-focused Synthesis (DOTS): A hit optimization strategy combining molecular modeling and automated synthesis platform / L. Hoffer, **Yu. Voitovich**, C. Derviaux, B. Raux, K. Barral, JM Brunel, S. Betzi, A. Varnek, D. Horvath, P. Roche, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «15ème Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Marseille», 2016, Marseille, France, P. 30.
10. **Voitovich, Yu.** Exploring Selective Inhibition of the First Bromodomain of the Human Bromodomain and Extra-terminal Domain (BET) Proteins / **Yu. Voitovich**, B. Raux, C. Derviaux, S. Milhas, S. Knapp, J.-M. Brunel, A. Fedorov, Y. Collette, P. Roche, S. Betzi, S.

- Combes, X. Morelli // Book of abstracts «15ème Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie de Marseille», 2016, Marseille, France, P. 31.
11. **Войтович, Ю.** Синтез и исследование структурных особенностей первого селективного BRD4(BD1)-ингибитора / **Ю. Войтович**, А. Фёдоров, С. Комб, К. Морелли // Сборник тезисов «XX молодёжная школа конференции по органической химии», 2017, Казань, С. 112.
 12. **Voitovich, Iu.** The First Selective BET-Inhibitor Targeting BRD4(BD1) / **Iu. Voitovich**, A. Fedorov, S. Combes, X. Morelli // Book of abstracts «20th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2017)», 2017, Cologne, Germany, P.MCB015.
 13. **Voitovich, Iu.** The First Selective BET-Inhibitor Targeting BRD4(BD1) / **Iu. Voitovich**, B. Raux, S. Combes, X. Morelli, A. Fedorov // Book of abstracts «Chemistry Conference for Young Scientists (ChemCYS)», 2018, Blankenberg, Belgium, P. 84.
 14. **Voitovich Yu.** Exploring Selective Inhibition of the First Bromodomain of the Human Bromodomain and Extra-terminal Domain (BET) Proteins / **Yu. Voitovich**, A. Fedorov, S. Combes, X. Morelli // Сборник тезисов «XXI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием)», 2018, Нижний Новгород, С. 34.