

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Войтович Юлии Валерьевны на тему “Новые селективные ингибиторы бромодоменов ВЕТ-семейства белков: дизайн, синтез, химические свойства”, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 – Органическая химия

Актуальность темы исследования Работа Ю.В. Войтович выполнена в актуальной области органической химии и посвящена разработке селективных ингибиторов белков семейства ВЕТ, использование которых является одной из перспективных стратегий для лечения онкологических заболеваний - одной из основных причин смертности. По данным Всемирной Организации Здравоохранения число случаев диагностирования рака может достичь к 2030 году до 22 миллионов в год, а смертность в результате онкологических заболеваний может возрасти на 70% по сравнению с 2012 годом. Это показывает актуальность поиска новых противораковых агентов.

Среди терапевтических мишеней для лечения рака большое внимание уделяется ядерным рецепторам, активным сайтам ферментов, ионным каналам и рецепторам G-белков. В этих случаях соответствующие лекарственные соединения действуют как ингибиторы межбелковых взаимодействий (МБВ). Одной из перспективных мишеней являются бромодомен-содержащие белки, что объясняется их вовлеченностью в многообразие патологических процессов. Бромодомен – это белковый модуль, способный к специфичному распознаванию *N*-ацетилированных остатков лизина гистонов, и за счёт этого регулирующий экспрессию ряда генов. В геноме человека закодировано 46 бромодомен-содержащих белков, классифицированных в 8 семейств. Из них одно из наиболее изученных – ВЕТ (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 ВЕТ-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 ВЕТ-ингибиторов для лечения онкологических заболеваний.

С момента открытия первого ВЕТ-ингибитора JQ1 в 2010 году проводится активная разработка малых молекул, способных нарушать взаимодействия ВЕТ-белков с

гистонами. Сегодня уже 18 активных фармацевтических ингредиентов находятся на различных стадиях клинических испытаний для лечения ряда видов опухолей, в том числе NUT-карциномы, очень агрессивного вида рака эпителия, невосприимчивого к стандартной химиотерапии.

Несмотря на высокую эффективность и многообещающие результаты, демонстрируемые в ходе испытаний, все известные на данный момент ВЕТ-ингибиторы обладают общим недостатком, ставящим под вопрос их использование в клинической практике. Обладая высокой селективностью по отношению к ВЕТ-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 ВЕТ-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. Из-за этого пан-ингибирование ВЕТ-белков может приводить к нежелательным побочным эффектам. Поэтому ключевой задачей является разработка селективных ВЕТ-ингибиторов для использования в лечении онкологических заболеваний.

Цель диссертационной работы Войтович Ю. В. состояла в попытке получения селективных ВЕТ-ингибиторов, которые могли бы помочь выявить специфичный вклад каждого из белков в клеточные процессы.

Научная новизна диссертационной работы состоит в разработке и реализации методологии синтеза двух новых ВЕТ-ингибиторов, идентифицированных в ходе скрининга химической библиотеки, ориентированной на межбелковые взаимодействия. Одно из найденных соединений является первым и на сегодняшний день единственным селективным ингибитором белка Brd4(BD1). Второй ингибитор, наряду с описанным в тот же временной период Олиноном, является первым открытым ВЕТ-ингибитором, селективно связывающимся с BD1-доменом в составе ВЕТ-белков.

Впервые предложен механизм достижения селективного связывания лиганда с первым доменом белка Brd4. Показано, что ключевую роль в данном процессе играет различная динамика ZA-петли в белковой цепи, что является важным для планирования путей создания блокаторов ВЕТ-белков.

Важным результатом работы является получение серий новых ВЕТ-ингибиторов на основе структур идентифицированных молекул, с использованием оригинальной методики DOTS (Diversity Oriented Target-Focused Synthesis). Другим принципиальным результатом является и обнаружение димеризации белка Brd4(BD1), индуцируемой триазолопиримидинил-содержащими производными ксантина.

Также получен первый и единственный пока BD1-селективный ингибитор, активный в наномолярном диапазоне концентраций. 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 состоит в выявлении корреляции структура/активность и структура/селективность ВЕТ-ингибиторов, что позволило выяснить механизмы достижения Brd4(BD1)- и Brds(BD1)-селективности. Это может послужить отправной точкой для дизайна новых селективных ингибиторов семейства ВЕТ. 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 ВЕТ-белками, в лечении онкологических заболеваний.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 2 статьи в журнале *Journal of Medicinal Chemistry*, входящем в международные базы данных, а также один международный патент. Работа доложена на 11 научных конференциях.

Структура диссертации. Диссертационная работа Войтович Ю. В. состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы (306 источников) и приложение. Работа изложена на 298 страницах, включает 68 рисунков, 29 схем и 28 таблиц.

В главе «Литературный обзор» проанализированы 238 статей, опубликованных в течение последних 10 лет и посвящённых поиску агентов для эпигенетической терапии рака, основанной на ингибировании бромодомен-содержащих белков. В обзоре освещаются биологические и молекулярные аспекты устройства и функционирования хроматина, роль гистонов в эпигенетических процессах, а также структура и функции бромодомена, белкового модуля, найденного в многообразии белков, вовлечённых в ряд ключевых процессов клеточной регуляции. Кроме того, рассмотрена история создания низкомолекулярных ингибиторов бромодоменов ВЕТ-семейства белков, а также пути их синтеза. И, наконец, представлены ключевые структурные различия между двумя бромодоменами белков ВЕТ, которые могут быть использованы в дизайне селективных ВЕТ-ингибиторов. Литературный обзор является содержательным, отражает глубокое понимание автором биологических аспектов, лежащих в основе ВЕТ-ингибирования, а также позволяет оценить не только путь, уже пройденный в данной области, но и

наметить новые перспективные направления в синтезе селективных ингибиторов белков семейства ВЕТ.

Вторая глава диссертации, «Обсуждение результатов», состоит из трёх разделов и описывает основную часть работы: дизайн и синтез селективных ингибиторов Brd4(BD1) члена ВЕТ-семейства белков.

Первый раздел посвящён разработке первой тематической библиотеки, ориентированной на модуляторы межбелковых взаимодействий. Анализ данной библиотеки методами НТRF и ИТС позволил обнаружить два ингибитора, проявляющих селективность в отношении Brd4(BD1) и Brds(BD1) членов ВЕТ-семейства белков. Стоит отметить, что данные молекулы стали одними из первых известных селективных ингибиторов бромодоменов ВЕТ-семейства белков. Ранее считалось, что достижение селективности внутри этого белкового семейства невозможно ввиду высокого сходства в аминокислотных последовательностях его членов. Исследование корреляций структура-активность каждого из идентифицированных ингибиторов, а также создание структурных аналогов описывается автором в следующих разделах обсуждения результатов.

Второй раздел описывает исследование Brd4(BD1)-селективного ингибитора, являющегося производным 3,7-дизамещенного ксантина, соединённого с триазолопиримидинильной циклической системой сульфонилметильным линкером. Установлено, что активность молекулы определяется наличием в ней ксантинового фрагмента, в то время как триазолопиримидин привносит селективность к первому бромодомену Brd4, что связано с различиями в динамике петли ZA членов ВЕТ-семейства белков. С целью изучения влияния каждого из заместителей ксантинового кольца на закрепление лиганда в сайте связывания, соискателем был проведён синтез ряда структурных аналогов исходной молекулы, что позволило предложить 4-хлорбензил-содержащий 7-этилксантин в качестве активного фрагмента для дальнейшей оптимизации. Предпринятая стратегия DOTS, объединяющая виртуальный скрининг и автоматизированные синтетические методы, привела к созданию более ста новых производных, в которых триазолопиримидинильная группа была заменена на другие гетероциклические фрагменты для установления дополнительных контактов с белком.

Кроме того, в работе показана уникальная лиганд-индуцируемая димеризация Brd4(BD1), обнаружение которой позволило создать две серии бивалентных ингибиторов. Данный тип молекул объединяет два разных активных центра, способных одновременно связываться с двумя доменами, что приводит к более высокой эффективности по сравнению с моновалентными ингибиторами.

На следующем этапе работы, описанном в третьем разделе обсуждения результатов, соискатель представляет исследование Brds(BD1)-селективного ингибитора, производного бензоазепинона, также идентифицированного в результате виртуального скрининга. Исследование корреляций структура-активность, а также рентгеноструктурный анализ показали, что сайт связывания белка занимается фрагментом, не являющимся миметиком ацетилированного лизина. Поиск более подходящего лиганда для сайта связывания привёл к дизайну гибридного производного, объединяющего активный ксантиновый и бензоазепиновый фрагменты. Последний отвечает за селективность к первым бромодоменам. Полученный ингибитор демонстрировал активность в наномолярном диапазоне концентраций. Дальнейшая его оптимизация с использованием метода DOTS позволила создать химическую библиотеку новых ингибиторов, включающую более 50 соединений, а также предложить молекулу, отвечающую всем требованиям, предъявляемым к молекулам-кандидатам для доклинических испытаний, включая высокую биохимическую и клеточную активность, селективность к первым бромодоменам ВЕТ и растворимость в воде и органических растворителях. Разработанная молекула является на сегодняшний день наиболее эффективным ВЕТ-ингибитором, селективным к первым бромодоменам белков ВЕТ-семейства.

Таким образом, можно констатировать, что соискателем выполнен большой объем оригинальных исследований, в том числе, синтезирована широкая группа весьма нетривиальных органических соединений, что говорит о высоком уровне владения Войтович Ю.В. синтетическими методами органической химии, а также подходами современной медицинской химии к разработке новых лекарственных молекул.

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов не вызывают сомнений, поскольку они сделаны на основе квалифицированного применения современных методов органического синтеза и физико-химических исследований, прежде всего, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа. Определение биохимической активности и селективности молекул осуществлялось методами НТRF, ИТС, BRMOscan, BromoMELT; исследования на культурах клеток проводились методами люминесцентного анализа и *c-Myc* НТRF.

Диссертационная работа соответствует заявляемой специальности 02.00.03-органическая химия. В ходе её выполнения Ю.В. Войтович синтезировала и охарактеризовала большую серию неизвестных ранее производных, способных взаимодействовать с белками ВЕТ, а также изучила влияние структуры молекул на их активность и селективность внутри ВЕТ-семейства белков. Всё перечисленное

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. Автореферат диссертации оформлен аккуратно и содержит изложение основных результатов исследований, заключений и выводов, содержащихся в диссертационной работе.

По диссертационной работе Войтович Ю. В. отсутствуют какие-либо принципиальные замечания, а есть только следующие, имеющие, большей частью, редакционный характер:

- 1) При описании виртуального скрининга химической библиотеки с использованием программы S4MPLE (стр. 78 диссертации), присутствует фраза: "...применение программного обеспечения ... S4MPLE..., основанного на ламарковском генетическом алгоритме конформационного отбора и определения силового поля при оценке энергии связывания." Известно, что ламарковский генетический алгоритм действительно используется для конформационного отбора, но не имеет никакого отношения к определению силового поля. Наиболее вероятно, что в части предложения «и определения силового поля» содержится какая-то смысловая ошибка.
- 2) В описании физико-химических свойств всех синтезированных веществ отсутствуют данные масс-спектров высокого разрешения или элементного анализа, что является обязательным для описания вновь полученных соединений. В некоторых случаях (например, соединения № 162, 163 и другие) нет данных по ВЭЖХ-МС для определения чистоты полученного продукта.
- 3) В тексте автореферата в приводимом списке публикаций автора неточно указаны ссылки на две работы в журнале *Journal of Medical Chemistry*, когда том издания обозначен как номер выпуска.
- 4) В диссертации используется аббревиатура ВЕТ, вместо которой правильнее было бы БЭТ, которая обозначает «бромодомен и экстра-терминальный» домен.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Войтович Ю. В., которая является законченной научно-квалификационной работой, содержащей фундаментальное исследование в области дизайна и синтеза новых селективных ингибиторов бромодоменов белков семейства ВЕТ, а также оценки их биологических свойств.

Печатные работы и автореферат в полной мере отражают содержание диссертационной работы.

Представленная Ю.В. Войтович работа является завершенным исследованием, сочетающим высокий теоретический и экспериментальный уровень и практическую значимость. Материал в диссертации и автореферате подан четко и логично – цель каждого раздела диссертации обоснована и каждый раздел является закономерным продолжением предыдущего. Диссертация написана квалифицированным научным языком, оформлена аккуратно.

Диссертационная работа Войтович Ю.В. «Новые селективные ингибиторы бромодоменов ВЕТ-семейства белков: дизайн, синтез, биологические свойства» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне безусловно удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842), а ее автор – **Войтович Юлия Валерьевна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности **02.00.03 – Органическая химия.**

Заведующий лабораторией
химии гликоконъюгатов ИОХ РАН
д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН

Н.Э. Нифантьев

специальность – 02.00.03 – органическая химия.

Почтовый адрес 119991 Москва, Ленинский пр. 47

Телефон +7-(499)1356390

Адрес электронной почты nep@ioc.ac.ru

Наименование организации (полное/сокращенное) – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

09.11.2018 год

Подпись чл.-корр. РАН Н.Э. Нифантьева заверяю:

Ученый секретарь ИОХ РАН, к.х.н.



И.К. Коршевец