

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ
(наименование института полностью)
Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»
(наименование кафедры)
04.03.01 Химия
(код и наименование направления подготовки, специальности)
Органическая и биоорганическая химия
(направленность(профиль)/ специализация)

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему: Синтез и цитотоксичность LSD1 ингибиторов

Студент	Т.В. Гереженко	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Руководитель	Д.А. Хоченков	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)
Консультанты	О.А. Головач	_____
	(И.О. Фамилия)	(личная подпись)

Допустить к защите

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко _____
(ученая степень, звание, И.О. Фамилия) (личная подпись)

« _____ » _____ 2019 г.

АННОТАЦИЯ

В представленной работе описываются результаты исследования по разработке синтетического подхода к получению и цитотоксичности высокоаффинного LSD1 ингибитора, содержащего 4-аминопиримидиновый scaффорд, который был охарактеризован посредством ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ.

ABSTRACT

The title of the graduation work is "Synthesis and cytotoxicity of LSD1 inhibitors".

The aim of this work is to develop a synthetic approach to obtain the 4-aminopyrimidine framework and to obtain a new high-affinity LSD1 inhibitor.

This work is devoted to obtaining new 4-aminopyrimidine derivatives, assessing their cytotoxicity and biological activity. The key issue of the graduation work is the development of a methodology for these derivatives.

We studied a large literary corpus to find the best synthesis method. Then we perform the experimental part of the work and analyze the substances obtained.

The graduation work consists of an introduction, two chapters, a conclusion, list of 150 references, all of which are foreign sources. The text of the work contains 9 scheme of chemical reactions.

The first part of the work provides detailed information on approved and experimental preparations of kinase inhibitors.

The second part gives a detailed description of the structure of the new synthesized compound using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) on ^1H , ^{13}C , ^{19}F nuclei and their biological activity.

The third part represents the methods synthesis of inhibitors and their physical and chemical properties.

In conclusion, we emphasize that a synthetic approach to the design of these 4-aminopyrimidine derivatives was developed, and a new compound was obtained, which can be further functionalized to obtain biologically active substances.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ЛЕТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1. Структура и функции LSD1	10
1.1.1. Структура LSD1	10
1.1.2. Функции LSD1	12
1.1.2.1. LSD1 как ко-репрессор транскрипции.....	13
1.1.2.2. LSD1 как ко-активатор транскрипции	13
1.1.2.3. LSD1 как деметилаза негистоновых белков.....	13
1.2. LSD1 и рак.....	14
1.2.1. LSD1 при раке молочной железы.....	14
1.2.2. LSD1 при раке простаты	15
1.2.3. LSD1 в AML	15
1.3. Методы скрининга для ингибиторов LSD1	16
1.3.1. Целевой анализ	18
1.3.2. Анализ на основе субстрата.....	19
1.3.3. Анализ на основе побочных продуктов.....	20
1.3.4. Анализ на основе ИЦП.....	20
1.4. Фармакологическое ингибирование LSD1 для терапии рака	21
1.4.1. Инактиваторы MAO и их производные.....	21
1.4.2. Натуральные продукты и их производные.....	22
1.4.3. Ингибиторы на основе пептидов.....	23
1.4.4. Ингибиторы на основе полиаминов.....	23
1.4.5. Металло-комплексные ингибиторы	24
1.4.6. Другие	25
1.5. Заключительные замечания и перспективы.....	25
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	28

2.1. Синтез ингибиторов	28
2.2. Биологические испытания	31
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	32
3.1. Реагенты и оборудование	32
3.3. Синтез целевого соединения	35
3.4. Биологические испытания	36
3.4.1. Культивирование клеток.....	36
3.4.2. Исследования цитотоксичности.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	38

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- 2-PFPA - 2-пентафторфенилциклопропиламин
- ADT - андроген-депривационной терапии
- AML - острый миелобластный лейкоз
- AOD - аминоксидазный домен
- APL - острый промиелоцитарный лейкоз
- AR - андрогеновый рецептор
- ATRA - полностью транс-ретиноевая кислота
- BLI - биослойная интерферометрия
- CRPC - кастраторезистентный рак предстательной железы (Устойчивый к кастрации рак простаты)
- DCIS - протокового рака *in situ*
- EMT - эпителиально-мезенхимальный переход
- ER α – рецептор альфа эстрогена
- ESC –эмбриональные стволовые клетки
- FAD - флавинадениндинуклеотид
- FDH - формальдегиддегидрогеназа
- FRET - энергия флуоресцентного резонанса
- GGA - геранилгерановая кислота
- HDACs - гистондеацетилазы
- HIF-1 α - 1 α - гипоксия-индуцируемый фактор
- HRP–фермент пероксида хрена
- HSCs - гемопоэтические стволовые клетки
- HTRF - гомогенный анализ с разрешенной по времени флуоресценцией
- ITC - изотермическая титрационная калориметрия
- JMJC - семейство JumonjiC
- KDM - семейство лизин-специфических деметилаз
- LSCs - лейкозные стволовые клетки
- LSD1 - лизин-специфическая деметилаза 1A
- MAOs - моноаминоксидазы A и B
- NCL-1 – восковидный липофусциноз нейронов первого типа
- NCL-2 - Восковидный липофусциноз нейронов второго типа
- PPI - межбелковое взаимодействие
- SAM - S-(50-аденозил)-L-метионин
- SCLC - клетки мелкоклеточного рака легкого

SPA - анализ сцинтилляционной близости
SPR - поверхностный плазмонный резонанс
TSP - транилципромин
TD - башенный домен
Zn-CW – домен «цинкового пальца»
МС - масс-спектрометрия

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых подходов в терапии злокачественных новообразований является одной из важнейших задач современной медицинской химии. Особенных успехов в этом направлении за последние 20 лет удалось достигнуть с разработкой таргетной терапии, ориентированной на молекулярные механизмы в онкотрансформированных клетках. Несмотря на значительные успехи в этой области в последние годы отмечается резкий рост вторичной резистентности к таргетным противоопухолевым препаратам, что делает их использование в клинической практике затруднительным и требует разработки новых типов таргетных агентов. Несмотря на множество методологических подходов к преодолению вторичной резистентности одним из лидирующих подходов является создание таргетных ингибиторов дуального типа.

В представленной работе рассматриваются результаты исследований по изысканию новых дуальных ингибиторов, воздействующих на две важные биологические мишени участвующих в онкогенезе: EGFR – киназный домен эпидермального фактора роста и LSD1 – лизин специфическая гистон диметилаза.

1. ЛЕТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Лизин-специфическая деметилаза 1A (LSD1), также называемая KDM1A и AOF2, представляет собой флавин-зависимую деметилазу, которая впервые была идентифицирована в 2004 году [1]. LSD1 может удалять ди- и монометильные группы из четвертой и девятой позиций белка гистона 3 (H3K4me2/1 и H3K9me2/1), что приводит к репрессии или активации транскрипции соответственно [2–5]. Было также показано, что LSD1 удаляет моно- и диметилированные остатки лизина из негистоновых белковых субстратов, таких как p53 [6], DNMT1 [2], E2F1 [7], HIF-1 α [8] и STAT3 [9]. Недавно была идентифицирована изоформа LSD1, названная LSD1+8a, которая продуцируется альтернативным сплайсингом LSD1 и участвует в дифференцировке нейронов в нейронных клетках посредством деметилирования H3K9me2/1 [10,11]. Каталитический механизм LSD1 и его изоформы включает окисление FAD и потребление O₂ с образованием H₂O₂ и HCHO (Схема 1). Среди FAD-зависимых деметилаз LSD1 демонстрирует дифференциальную экспрессию во взрослых тканях [12]. Однако, было обнаружено, что LSD1 чрезмерно избыточно экспрессируется в ряде солидных опухолей и при остром миелобластном лейкозе, где он ингибирует дифференцировку и усиливает пролиферацию, инвазивность и подвижность клеток, а также ухудшает прогноз выживаемости [13,14]. Следовательно, разработка ингибиторов LSD1 является потенциальной противоопухолевой терапевтической стратегией.

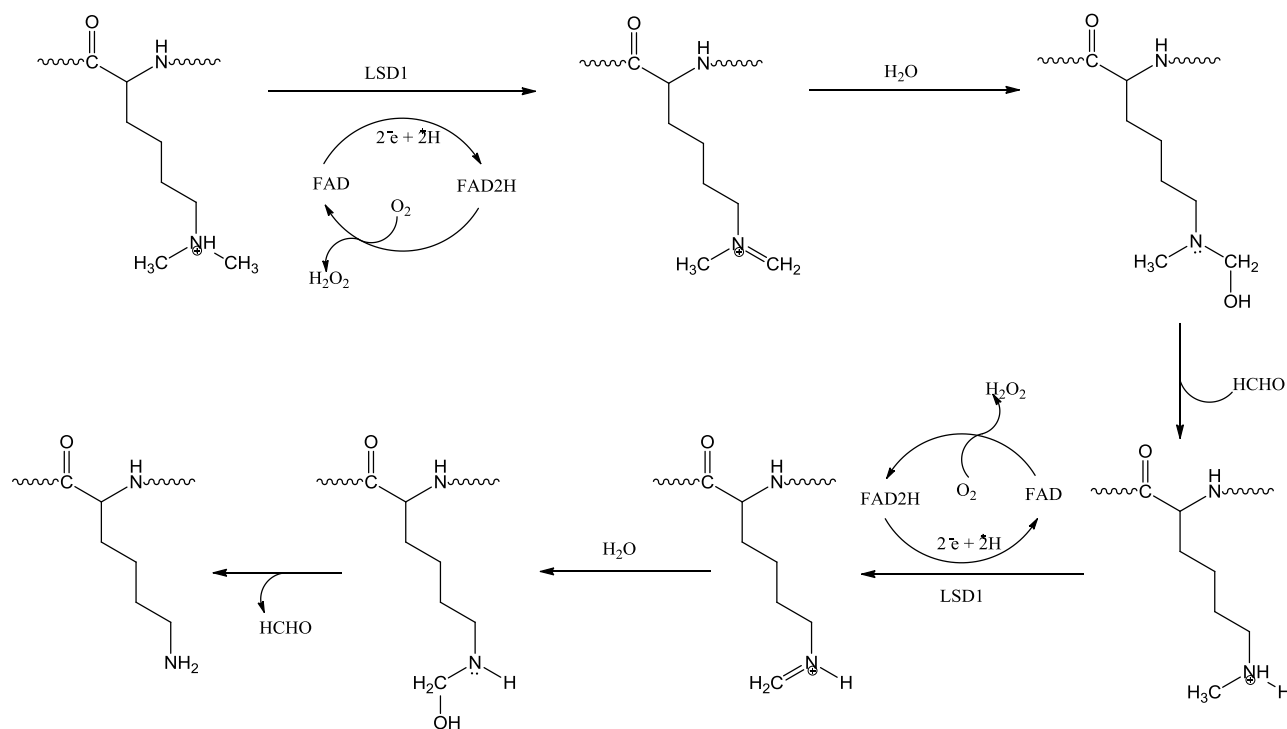


Схема 1 Каталитический механизм LSD1.

1.1. Структура и функции LSD1

1.1.1. Структура LSD1

На сегодняшний день было зарегистрировано два семейства лизин-специфических деметилаз (KDM): семейство JumonjiC (JMJC) и семейство LSD. Семейство JMJC включает 19 представителей и зависит от α -кетоглутарата и Fe(II) для удаления от одной до трех метильных групп из остатков лизина, в то время как семейство LSD состоит из трех членов (LSD1, LSD1+8a и LSD2) [15]. Все члены семейства LSD являются FAD-зависимыми ферментами окисления, так как их каталитический аминоксидазный домен (AOD) требует FAD в качестве кофактора, аналогичного моноаминоксидазам A и B (MAOs) (Рисунок 1, 2). LSD1 и LSD2 содержат FAD-связывающий мотив (FAD), домен SWI3 / Rac8 / Moira (SWIRM) (LSD1: остатки 166-260, LSD2: остатки 264-372) и каталитический домен AOD (LSD1: остатки 272-415 и 516-852, LSD2: остатки 373-822) (Рисунок 1 – 3A). Однако различия между этими двумя ферментами заключаются в том, что LSD2 обладает N-терминальным доменом цинкового пальца (Zn-CW) (остатки 50-190), в то время как AODLSD1 включает вставку, названную башенным доменом (остатки 416-515) (Рисунок 1, 3A) [1,16,17]. Ген LSD1 кодирует конструкцию из 852 аминокислотных остатков, и три ключевых структурных домена, домен SWIRM, домен башни и домен AOD. (Рисунок 1, 2) [18]. В отличие от других доменов SWIRM, домен SWIRM в LSD1, который напоминает небольшую альфа-спираль, не может связываться с ДНК, но все же способен участвовать в межбелковых взаимодействиях, которые необходимы для регулирования его функций ремоделирования хроматина и модификации гистонов [19,20]. Домен башни представляет собой особый домен, выступающий из AOD с двумя антипараллельными спиральями, который используется LSD1 для связывания с RCOR₁ и формирования транскрипционного репрессорного комплекса CoREST с другими белками [16,17]. Домен AOD регулирует ферментативную активность и нацеливание, и связывается с несколькими белками [18]. AOD состоит из двух лепестков, которые являются значительно более просторными и открытыми, чем соответствующие области других FAD-зависимых аминоксидаз. AODLSD1 состоит из двух четко определенных субдоменов: FAD-связывающего мотива (остатки 272-356, 559-657 и 770-833) и субдомена распознавания субстрата (остатки 357-417, 523-558 и 658-769) (Рисунок 5) [21,22]. FAD-связывающий мотив является высоко консервативным среди FAD-зависимых окислительных ферментов, которые могут быть ответственны за ингибирующую LSD1 активность некоторых ингибиторов MAO. Два субдомена образуют большую полость с центром активности фермента на их границе [23]. В третичной структуре LSD1 вторая доля AOD складывается и прилегает к домену SWIRM, где между этими двумя доменами образуется гидрофобный связывающий карман, который позволяет LSD1 охватывать

большую часть хвоста гистона H3 (Рисунок 4) [24]. Этот связывающий карман также обеспечивает структурную основу для разработки ингибиторов LSD1 [25].

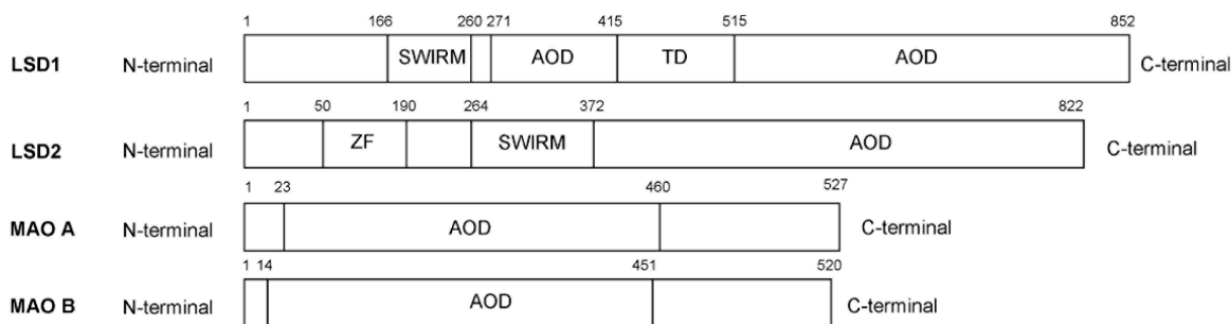


Рисунок 1. Доменные архитектуры четырех человеческих FAD-зависимых ферментов окисления: LSD1, LSD2, MAO A и MAO B.

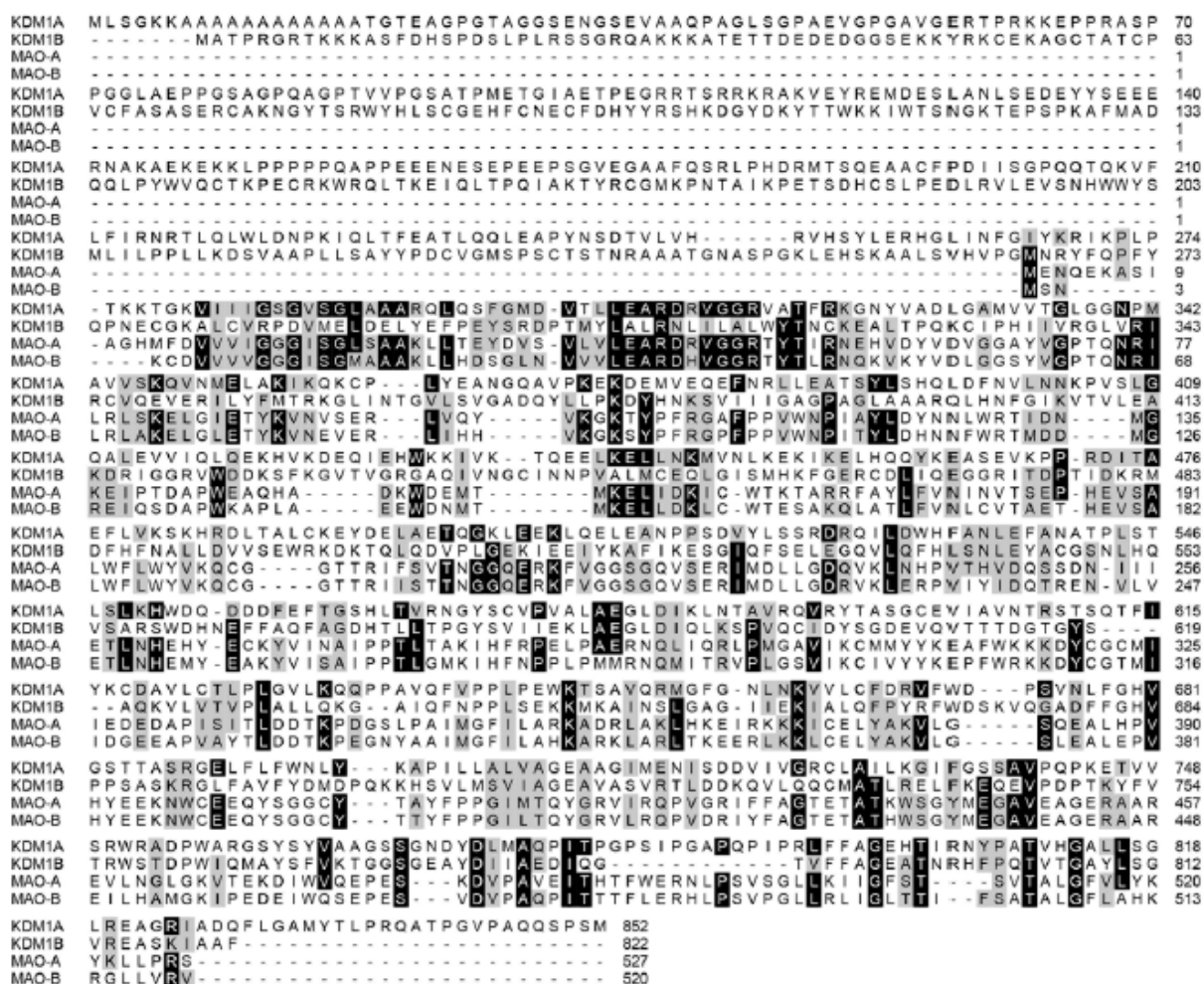


Рисунок 2. Многократное выравнивание между аминоксидазными доменами семейства LSD и MAOs от людей.

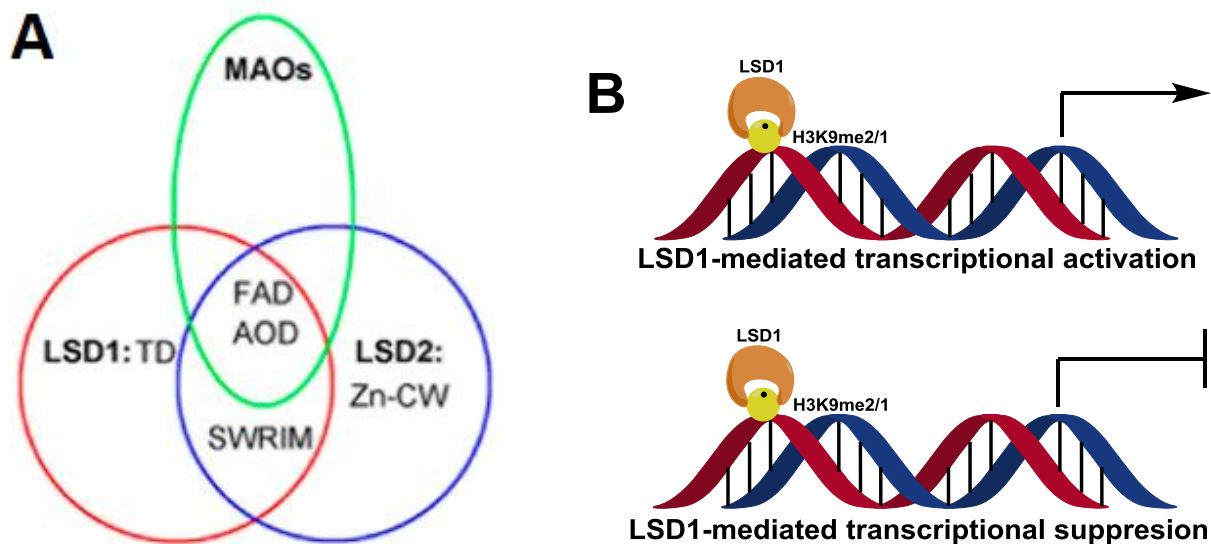


Рисунок 3. (А) Сравнение доменов семейства LSD и MAO. FAD: мотив связывания FAD; TD: башенный домен; Zn-CW: домен с цинковыми пальцами. (В) LSD1-опосредованная транскрипционная модуляция.

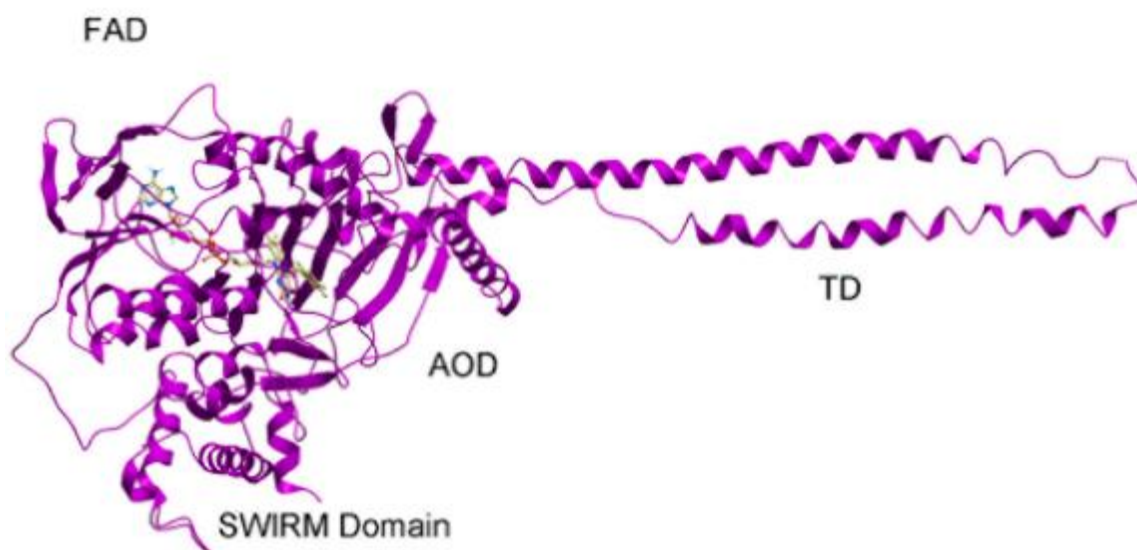


Рисунок 4. Общая структура LSD1 с транс-2-пентафторфенилциклопропиламином (2-PFPA); домены помечены как на рисунке 1.

1.1.2. Функции LSD1

LSD1 участвует в регуляции многих типичных биологических процессов, включая эпителиально-мезенхимальный переход, стволовость, подвижность клеток, а также благодаря своей способности подавлять или активировать транскрипцию путем деметилирования H3K4me2/1 или H3K9me2/1 соответственно (Рисунок 3А) [26]. LSD1 также деметирует некоторые негистоновые белки и опосредует прогрессирование некоторых видов рака [2,6–9].

1.1.2.1. LSD1 как ко-репрессор транскрипции

Метилирование гистона 3 на четвертом сайте является признаком активации транскрипции. LSD1 собирается вместе с несколькими белками в различные комплексы, которые деметилируют H3K4me2/1 и формируют хроматин в репрессивную конформацию. Репрессивная конформация может вызывать молчание генов посредством образования комплексов HP1/SU (VAR) 3–9 или HOTAIR/PCR2, репрессировать экспрессию специфических генов в форме комплексов ядерной-BRAF35 или CoREST [27,28], регулировать стволовые клетки свойства через комплексы TLX и RCOR2 [29–31], или осуществляют ремоделирование нуклеосом через комплексы NuRD [17].

1.1.2.2. LSD1 как ко-активатор транскрипции

LSD1 также функционирует как ко-активатор транскрипции, способствуя деметилированию H3K9me2/1. Он может способствовать транскрипции гормональных генов в клетках рака предстательной железы и молочной железы путем взаимодействия с рецепторами андрогена и эстрогена [32,33]. Как ко-активатор, LSD1 также обеспечивает контроль репликации, импринтинга и распространения гетерохроматина.

1.1.2.3. LSD1 как деметилаза негистоновых белков

Помимо гистоновых белков, LSD1 может также удалять моно- и диметилирование из негистоновых белков, что может быть связано с прогрессированием рака. Например, LSD1 увеличивает экспрессию гликолитических генов за счет увеличения гипоксии-индуцируемого фактора-1 α -опосредованной транскрипционной активации [34]. LSD1 также может снижать взаимодействие гена-супрессора опухолей p53 и 53BP1, удаляя метильную группу из p53K370me2, таким образом подавляя функцию p53 [35]. Кроме того, LSD1 регулирует ангиогенез, остановку клеточного цикла, повторное связывание хроматина и пролиферацию раковых клеток путем деметилирования HIF-1 α [9], E2F1 [7], DNMT1 [3] и STAT3 [10]. Краткое описание субстратов LSD1 и регулирующих функций представлено в таблице 1.

Таблица 1 LSD1 субстраты и регуляторные функции.

Тип подложек	Белок	Подразделения комплекса	Функции
Гистоновые	H3K4me2/me1	RCOR2	Регулирует свойство ESC и перепрограммирует соматические клетки в плюрипотентность
		NuRD (MTA3)	Ремоделирование нуклеосом и деметилирование H3K4
		TLX	Регуляция пролиферации нейрональных стволовых клеток
		CtBP/CoREST	Репрессия экспрессии гормона роста в гипофизе
		HDAC/CoREST	Регуляция плюрипотентности клеток

			эмбриональных стволовых клеток / карциномы
		HDAC/SIN3A	Поддержание чувствительности к химиотерапии при раке молочной железы
		Core-BRAF35	Опосредует репрессию нейрональных специфических генов в ненейрональных тканях
		HP1/SU (VAR) 3-9	Заглушает гетерохроматический ген
		HOTAIR/PRC2	Заглушает ген HOX
	H3K9me2/me1	ER α	Активация альфа-зависимых генов рецептора эстрогена
		spLSD1/2	Контроль репликации, импринтинга и пропаганды гетерохроматина
AR		LSD1 функционирует как активатор генов, чувствительных к андрогеновым рецепторам	
Негистоновые	p53	-	Подавляет опухоль и активирует транскрипцию
	DNMT1	-	Поддерживает метилирование ДНК
	E2F1	-	Регулирует стабилизацию и апоптотическую функцию, вызванную повреждением ДНК.
	HIF-1 α	-	Регулирует транскрипцию VEGF
	STAT3	-	Регулирует экспрессию генов через образование димеров

1.2. LSD1 и рак

1.2.1. LSD1 при раке молочной железы

Рак молочной железы - это рак, возникающий в результате злокачественной пролиферации тканей молочной железы [36,37]. Повышенная регуляция уровней LSD1 способствует развитию протокового рака *insitu* в инвазивный протоковый рак [38], а также ускоряет развитие, пролиферацию и метастазирование клеток рака молочной железы [39]. При воздействии канцерогенов LSD1 будет активироваться и может способствовать возникновению рака молочной железы на ранней стадии [40]. Основная цель ER-позитивного лечения рака молочной железы, рассчитана на активность деметилазы LSD1, для управления раком молочной железы [41]. ER α вовлекает LSD1 и другие белки для сборки комплекса, которые связываются с промоторами эстроген-зависимых и эстроген-чувствительных генов, способствуя тем самым пролиферации клеток рака молочной железы [42–45]. Тем не менее, CAC1 может взаимодействовать с LSD1 и негативно регулировать функцию ER α [46]. Другой белок -ASXL2, напротив, может образовывать комплекс с LSD1, UTX и MLL и опосредует активацию ER α , чтобы способствовать пролиферации клеток рака молочной железы [47]. Кроме того, LSD1 также взаимодействует с α -катенином для снижения уровней белка-супрессора опухоли Lefty1 при раке молочной железы [48]. LSD1 также контролирует рост клеток рака молочной железы, взаимодействуя с гистондеацетилазами [49,50]. LSD1 также может поддерживать чувствительность к

химиотерапии посредством координации с комплексом SIN3A/HDAC при раке молочной железы [51]. Кроме того, LSD1 был связан с метастазированием рака молочной железы. Семейство транскрипционных факторов цинкового пальца Snail/Slug регулирует эпителиально-мезенхимальный переход, что имеет решающее значение для усиления инвазивности и подвижности метастатических клеток [52–54]. Исследования показали, что Snail вовлекает LSD1 в промоторы эпителиальных генов для деметилирования H3K4me2, что приводит к молчанию ключевых генов, приводящему к метастазированию раковых клеток [55–57]. Кроме того, Slug также взаимодействует с LSD1 для усиления метастазирования опухоли [58]. Интересно, что LSD1 также может играть роль опухоли в некоторых комплексах [59]. В комплексе LSD1/NuRD (MTA3) он может вовлекаться гомеотическим белком SIX3 для ингибирования канцерогенеза и метастазирования при раке молочной железы.

1.2.2. LSD1 при раке простаты

Простата является крайне необходимой железой в мужской репродуктивной системе, и злокачественная пролиферация ее тканей может привести к раку простаты [60]. Исследования показали, что LSD1 тесно связан с клеточной пролиферацией, ангиогенезом, миграцией и инвазией при раке предстательной железы [61–64], включая кастраторезистентный рак предстательной железы, который характеризуется устойчивостью к андроген-депривационной терапии [65]. LSD1 сверхэкспрессируется в CRPC и модулирует экспрессию андрогеновых рецепторов– не зависимых или зависимых генов выживания в клетках CRPC деметилазозависимым образом [20,66–70]. Кроме того, LSD1 активирует генную сеть летального рака простаты, связанную со связывающим белком ZNF217 [71]. Ap53 взаимодействует с LSD1 и модулирует клеточный цикл и апоптоз клеток CRPC посредством LSD1-опосредованного деметилирования [6,20]. Сообщалось также, что LSD1 способствует метастазированию и инвазии через повышение PXN и LRP6 в андроген-независимых клетках рака предстательной железы [63].

1.2.3. LSD1 в AML

Острый миелоидный лейкоз является патологией гемопоэза, характеризующейся быстрым самообновлением и пролиферацией в лейкозных стволовых клетках и подавлением нормальных гемопоэтических стволовых клеток [72]. LSD1 является важным модулятором кроветворения и лейкемогенеза [73–75]. LSD1 сверхэкспрессируется в HSC и ранних миелобластах, где он поддерживает самообновление стволовых клеток и регулирует дифференцировку клеток [75,76] посредством регуляции факторов транскрипции и хроматин-модифицирующих ферментов [13,77]. Исследования показали, что LSD1 подавляет

гены стволовых клеток и клеток-предшественников посредством деметилирования H3K4 в областях промотора и энхансера, что приводит к регуляции гематопозитической дифференцировки, особенно в линии эритроцитов [55,78–81]. LSD1 также участвует в регуляции прогрессирования AML с помощью различных механизмов из нормального кроветворения и лейкогенеза [13,14]. В мышинной модели MLL-AF9 AML LSD1 действовал как существенный модулятор дифференцировки LSC [13]. Устойчивая экспрессия онкогенной программы MLL-AF9 необходима для потенциала LSC MLL-AF9. Снижение активности LSD1 или химическое ингибирование может нарушить дифференцировку клеток MLL-AF9 и вызвать апоптоз *in vitro* и *in vivo* зависимым от деметилазы образом. Острый промиелоцитарный лейкоз, подтип AML, был успешно вылечен с использованием полностью транс-ретиноевой кислоты для дифференциации лейкозных бластов. Однако это соединение неэффективно при AML без APL [82]. Ингибирование LSD1 может реактивировать путь дифференцировки ATRA в AML через активацию H3K4me2 и генов, связанных с дифференцировкой миелоида, что свидетельствует о возможности комбинированной терапии с использованием ингибиторов LSD и ATRA. В модели мышей NOD-SCID эта комбинированная терапия показала потенциальный антилейкозный эффект [14]. Дополнительные эксперименты также показали, что LSD1 также может регулировать AML независимо от его активности деметилазы [83]. Например, ингибирование LSD1 значительно активировало гены, связанные с миелоидной транскрипцией, без каких-либо значительных общегеномных изменений в H3K4me2/1 и H3K9me2/1 в клеточной линии AML человека THP-1. Дальнейшие исследования показали, что LSD1 был необходим для поддержания блокады миелоидной дифференцировки посредством связывания с факторами транскрипции, такими как GFI1. Интересно, что ингибиторы LSD1, полученные из транилципромина, могли эффективно преодолеть этот блок и восстановить дифференцировку, независимо от его активности гистон-деметилазы.

1.3. Методы скрининга для ингибиторов LSD1

Учитывая важнейшую функцию LSD1 в онкогенезе, обнаружение и разработка новых ингибиторов LSD1 могут стать жизнеспособной противораковой терапевтической стратегией. В последнее время сообщалось о многих методах скрининга для быстрого и эффективного скрининга ингибиторов LSD1. Основываясь на механизме скрининга, методы также можно разделить на анализы на основе мишеней, анализы на основе субстрата, анализы на основе побочных продуктов и анализы на основе межбелкового взаимодействия. Для целевых анализов может применяться виртуальный скрининг для быстрого анализа большого количества лигандов на связывание LSD1 *in silico* [84]. Поверхностный плазмонный

резонанс [85], изотермическая титрационная калориметрия [86] и биослойная интерферометрия [87] также могут использоваться для мониторинга взаимодействия между LSD1 и его лигандами. Тем не менее, они не подходят для высокопроизводительного скрининга из-за их потребности в дорогостоящих контрольно-измерительных приборах, специализированных работников по эксплуатации и сложных этапах подготовки образцов [88]. Для субстратных анализов масс-спектрометрия используется для обнаружения усеченных пептидных субстратов LSD1 [89,90]. Как побочные продукты LSD1-опосредованного деметилирования, продукция H_2O_2 и/или $HCHO$ также является индикатором активности LSD1 деметилазы. Было разработано множество анализов на основе побочных продуктов, в том числе анализ, связанный с люминолом[91], достаточный анализ, связанный красным цветом[92], анализ, связанный с 4-аминоантипирином [93], и анализ, связанный с формальдегиддегидрогеназой[94]. Наконец, анализы на основе PPI включают анализ сцинтилляционной близости и анализы на основе FRET. Сравнение различных методов скрининга на LSD представлено в таблице 2.

Таблица 2 Сравнение различных методов скрининга для LSD1.

Категория	Обнаруженные виды	Методы	Преимущества	Недостатки
Целевой анализ	LSD1	Виртуальный скрининг	Низкая стоимость; Высокая пропускная способность	Высокий уровень ложноположительных результатов; применимо только для первичного скрининга
		SPR	Свободная маркировка; низкий уровень ложных срабатываний	Низкая пропускная способность; высокие технические и технические требования; высокая цена
		ITC		
		BLI		
Анализ на основе субстрата	Усеченный H3	Анализ на основе MS	Свободная маркировка; прямое обнаружение продукта	Потребность в дорогостоящем оборудовании, профессиональных работников и сложных этапах подготовки образцов
Анализ на основе побочных продуктов	H_2O_2	Анализ пары люминола	Бюджетный; с высокой пропускной способностью;	Применимо только для соединений, которые не взаимодействуют с H_2O_2
		Амплексный анализ с красной связью	Свободная маркировка; высокая чувствительность	Применяется только для соединений, которые не взаимодействуют с H_2O_2 и не обладают автофлуоресцентной или гасящей способностью.
		4-аминоантипири н-связанный анализ	Бюджетный; с высокой пропускной способностью; Свободная маркировка	Низкая чувствительность; Применимо только для соединений, которые не взаимодействуют с H_2O_2
	$HCHO$	FDH-связанный анализ		Подходит только для соединений, которые не взаимодействуют с $HCHO$
Анализ на	LSD-пептид PPI	HTRF-анализ	Высокая пропускная	Требование маркировки;

основе PPI		способность, простота в эксплуатации; высокая чувствительность	вмешательство со стороны соединений с автофлуоресцентной или флуоресцентной тушащей способностью
	НTRF-анализ	Высокая пропускная способность; высокая чувствительность	Требуется тепло; специальный инструмент; введен дополнительный фермент

1.3.1. Целевой анализ

Виртуальный скрининг привлек внимание как универсальный и эффективный инструмент для раннего обнаружения лекарств и проведения их оптимизации[95]. Для проведения виртуального скрининга на основе структуры требуется рентгенокристаллическая структура LSD1 с ингибитором. Например, транс-2-пентафторфенилциклопропиламин (2-PFPA) может занимать гидрофобный связывающий карман между второй долей домена АО и доменом SWIRM (Рисунок 4). Для достижения селективности 2-PFPA связывается с FAD в каталитическом центре LSD1. Фтор 2-PFPA стабилизирует положение своего фенильного кольца, ограничивая угол его кручения, тем самым предотвращая перекручивание фенильного кольца за Y761 LSD1 (Рисунок 5). При сравнении с кристаллической структурой другого гидрохлорида транс-2-фенилциклопропиламина (2-PCPA) ингибитора LSD1 (PDB: 2UXX) остатки вокруг FAD, такие как I356, V333, Y761, T335, L706 и F538 (Рисунок 5), слегка отодвинуты от реактивной полости, предполагая, что реактивная полость создает больше пространства для размещения дополнительных атомов фтора PFPA [96]. Связывание 2-PFPA с LSD1 предотвращает дальнейшее связывание субстрата с FAD, таким образом ингибируя активность деметилазы LSD1. На основании полученных рентгеновских кристаллических структур LSD1 многие ингибиторы LSD1 были идентифицированы с использованием виртуального скрининга. Zhang's group провела скрининг девяти потенциальных ингибиторов LSD1 со значениями IC50 на микромолярном уровне. Среди них соединение XZ09 показало умеренную селективность в отношении LSD1 по сравнению с MAO, но *in vitro* и *in vivo* активность этого соединения не была дополнительно изучена в их работе [25]. Sharma's group использовала виртуальный скрининг для выявления соединения HCL-2509 с высокой селективностью и наномолярной активностью (13 нМ) [97]. Это соединение продемонстрировало хорошую противораковую активность *in vitro* и *in vivo* на мышинной модели AML и саркоме Юинга[97,98]. Соединение также ингибировало пролиферацию многих линий раковых клеток, таких как рак предстательной железы и нейробластома[97,99]. Недорогой и высокопроизводительный метод значительно повышает

эффективность скрининга, быстро отсеивая не связующие вещества *insilico*. Тем не менее, поскольку виртуальный скрининг основан на физико-химических свойствах соединений, а не на их биологической активности, этот метод может приводить к высокой частоте ложноположительных или ложноотрицательных результатов [100,101]. Следовательно, для проверки результатов *insilico* необходимо объединить этот метод с другими биохимическими анализами [25].

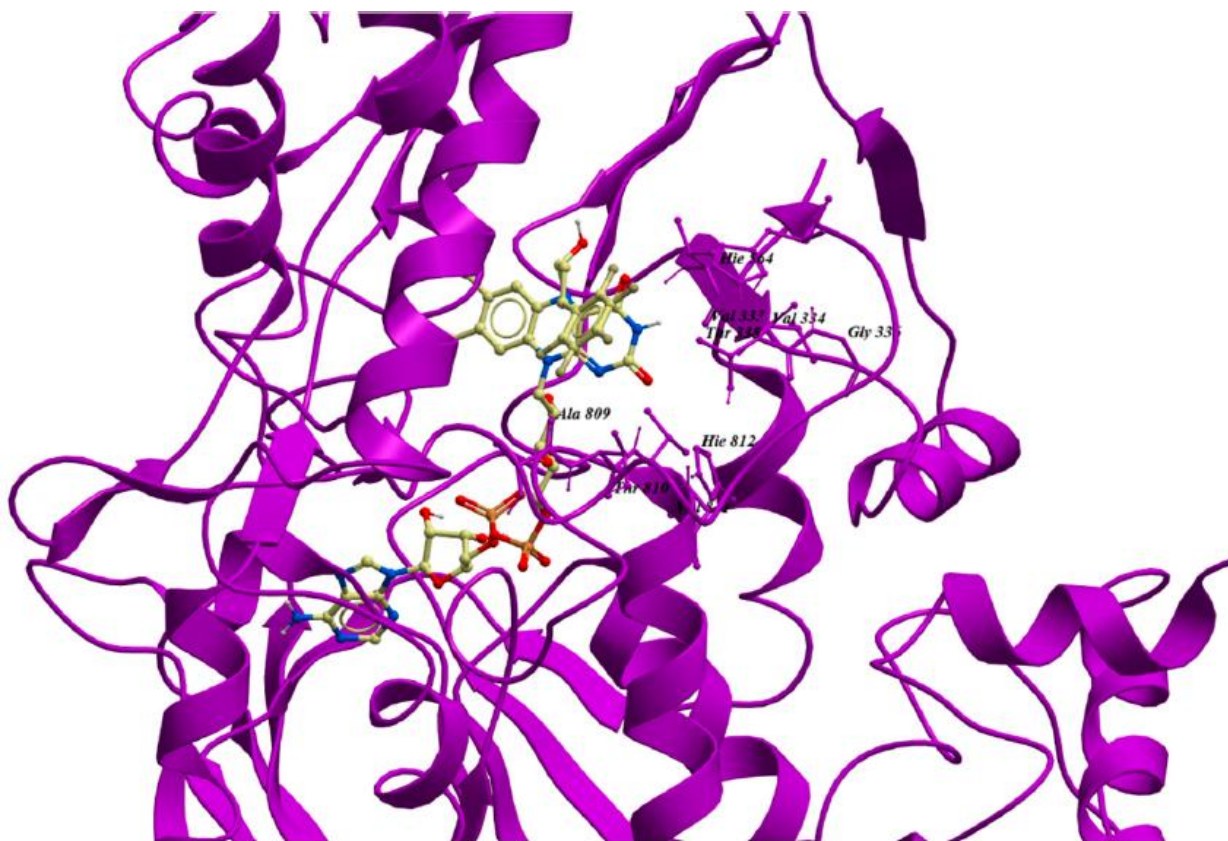


Рисунок 5 Структура связующего кармана LSD1 с 2-PFPA. Изображение было получено из Molsoft ICM-pro 3.8–5 на основе предыдущего отчета (PDB: 3ABT) [96].

1.3.2. Анализ на основе субстрата

Масс-спектрометрия может определить наличие и количество конкретной молекулы, получив ее точную массу, и она была применена для скрининга ингибиторов LSD1 [89,90]. Используя короткий пептид, соответствующий первым 21 остаткам гистона 3, в качестве субстрата, количество неметилированных и монометилированных пептидов можно измерить с помощью МС после инкубации с LSD1, что указывает на прогресс деметилирования LSD1. Хотя этот метод является прямым, точным, без меток и широко применим, его неприменимость для высокопроизводительного скрининга и высоких требований к инструментам и операторам делает его полезным только в качестве вспомогательного метода скрининга [89,90]. Этот метод часто комбинируется с другими высокопроизводительными методами, такими как виртуальный скрининг, для повышения эффективности скрининга [102,103].

1.3.3. Анализ на основе побочных продуктов

Ферментативные анализы являются косвенными анализами для LSD1, так как они количественно определяют побочные продукты (H_2O_2 или $HCHO$), продуцируемые в процессе деметилирования LSD1. Данный вид анализов включает анализ, связанный с люминолом [91], анализ, связанный с AmplexRed [92], анализ, связанный с 4-аминоантипирином [93], и анализ, связанный с формальдегиддегидрогеназой (FDH) [94]. Все эти анализы основаны на подобном ферменте для оценки деметилазной активности LSD1. Например, анализ, связанный с FDH, количественно определяет выработку NAD^+ в $NADH$ путем определения поглощения при длине волны = 340 нм или путем измерения интенсивности флуоресценции при 460 нм с возбуждением при 330 нм [104]. С другой стороны, другие три метода оценивают активность деметилазы путем выявления продукции H_2O_2 с помощью фермента пероксидазы хрена [91,105–107]. Хотя эти четыре метода не содержат меток, имеют низкую стоимость и подходят для высокопроизводительного скрининга, применение этих методов ограничивается обнаружением соединений, которые не взаимодействуют с H_2O_2 [62–65] или $HCHO$ [94]. Соединения, обладающие автофлуоресцентной или флуоресцентной тушающей способностью, также не подходят для этих способов. Поэтому химические характеристики соединений следует учитывать перед скринингом.

1.3.4. Анализ на основе ИЦП

Гомогенный анализ с разрешенной по времени флуоресценцией и усиленной люминесцентной близостью широко применяется для изучения взаимодействий белок-белок, белок-пептид и белок-ДНК / РНК на разных этапах исследования лекарств [108,109]. Оба эти метода основаны на передаче энергии флуоресцентного резонанса и требуют специальных покрытых антителом шариков. Недавно были выпущены коммерческие наборы с использованием методов на основе HTRF или ALPHA для скрининга ингибиторов LSD1, которые обладают преимуществами низкого фона, высокой чувствительности и высокой воспроизводимости. Тем не менее, есть несколько ограничений этих методов. Во-первых, маркировка белков может вызывать нежелательные конформационные изменения в белке, которые могут приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам при скрининге. Кроме того, технологии чувствительны к помехам со стороны соединений с присущей им способностью к автофлуоресценции и/или гашению флуоресценции [108,109]. Между тем, анализ сцинтилляционной близости - это метод, основанный на радиоизотопах, который широко используется для высокопроизводительного скрининга анализов взаимодействия белок-пептид/ДНК [110]. В этом анализе метилированные пептиды,

меченные биотином, деметируются с помощью LSD1, а затем добавляют метилтрансферазу KMT7 для метилирования пептидного продукта, используя меченный 3H-(50-аденозил)-L-метионин. Таким образом, уровень включения 3H в целевой пептид может коррелировать с активностью LSD1 [111]. Этот метод очень быстрый, чувствительный и подходит для высокопроизводительного скрининга. Тем не менее, ограничения метода включают в себя потребность в специальных устройствах для измерения и защиты от радиационного воздействия во время скрининга ингибитора. Чтобы сэкономить средства и снизить количество ложных срабатываний или ложных отрицательных результатов, комбинация этого метода с виртуальным скринингом может быть хорошим вариантом.

1.4. Фармакологическое ингибирование LSD1 для терапии рака

Из-за потенциала LSD1 в качестве противораковой мишени было исследовано несколько ингибиторов LSD1, причем некоторые из них прошли клинические испытания или даже клиническое применение. Здесь мы группируем ингибиторы по пяти подкатегориям: инактиваторы MAO и их производные, натуральные продукты, пептидные ингибиторы, ингибиторы на основе полиаминов и ингибиторы на основе металлов.

1.4.1. Инактиваторы MAO и их производные

Из-за значительного сходства между LSD1 и MAO в их каталитических доменах ранние ингибиторы LSD1 были разработаны на основе структурных характеристик связывающего кармана LSD1 и сообщили об ингибиторах MAO посредством виртуального скрининга и/или химических модификаций [102,112]. Паргилин, транилципромин и фенелзин являются тремя известными инактиваторами MAO, которые также показали ингибирование LSD1-деметиلاзной активности (Схема 2). Также было продемонстрировано, что гидрохлорид транс-2-фенилциклопропиламина, впервые идентифицированный как ингибитор MAO, необратимо ингибирует активность LSD1 посредством образования ковалентной связи с FAD-связывающим мотивом. Следовательно, 2-PCPA является неселективным ингибитором LSD1, поскольку он ингибирует как MAO, так и LSD1 [102,113–115].

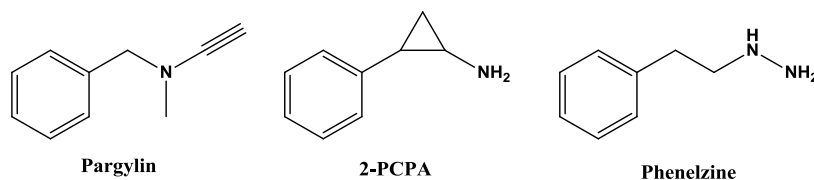


Схема 2 Химическая структура типичных неселективных ингибиторов LSD1.

Чтобы улучшить селективность ингибиторов LSD1, были синтезированы многочисленные производные 2-PCPA, причем некоторые из них демонстрируют хорошую

активность и высокую селективность при помощи виртуального скрининга. ORY-1001, ингибитор LSD1, который вошел в фазу II клинических испытаний для AML, представляет собой *N*-алкилированное производное 2-PCPA, которое обладает IC₅₀ 18 нМ против LSD1 и селективностью по LSD2 и MAO [116,117]. GSK2879552, другое *N*-алкилированное производное 2-PCPA, является селективным по LSD1 и перорально биодоступным. Это соединение ингибировало рост клеток мелкоклеточного рака легкого (SCLC) *invitro* и *invivo*, и прошло клинические испытания для лечения SCLC [118]. Некоторые исследователи разработали ингибиторы LSD1, имитируя лизиновую группу в мета-положении (NCL-1) или пара-положении (NCL-2) фенильного кольца, и полученные соединения продемонстрировали улучшенную ингибирующую активность в отношении LSD1 и селективность в отношении LSD1 над MAO [114]. Механически, NCL-1 и NCL-2 необратимо инактивируют LSD1 посредством формирования ковалентной связи с FAD, что вызывает накопление H3K4me₂, что приводит к транскрипционной активизации генов-супрессоров опухоли и, в конечном итоге, к репрессии роста раковых клеток [26]. Впоследствии производные NCL-1 были разработаны с целью улучшения их биологической активности [112], и эти аналоги продемонстрировали хорошую противораковую активность при солидных опухолях, таких как рак молочной железы [119], рак простаты [120] и глиома [121,122] *in cellulo* и/или *invivo*. Фенелзин является еще одним каркасом, который ингибирует как LSD1, так и MAO. Для улучшения селективности этого соединения была разработана гибридная молекула с каркасом фенелзина и бизина, которая ингибировала LSD1 с Ki 59 нМ, а также обладала более высокой селективностью по LSD1 по сравнению с другими ферментами, содержащими домен AOD [123]. Это соединение продемонстрировало хороший антипролиферативный эффект в линиях раковых клеток LNCaP и H460 [123].

1.4.2. Натуральные продукты и их производные

Натуральные продукты предлагают разнообразные химические каркасы с различными профилями активности и относительно мягкой токсичностью. Было обнаружено несколько натуральных продуктов с активностью, ингибирующей LSD1 *invitro* [124,125], таких как байкалин, ресвератрол и геранилгераноевая кислота (Схема 3). Байкалин был первым нековалентным ингибитором LSD1 на основе флавоноидов (IC₅₀ = 3,01 мкМ). Было обнаружено, что сахарная составляющая в байкалине является крайне необходимой для ингибирующей активности LSD1. Ресвератрол, необратимый ингибитор LSD1 *invitro* и *invivo*, постулируется для ингибирования активности LSD1 путем непосредственного связывания с белком [124,125]. GGA и его производные проявляют ингибирование

активности LSD1. Они нарушали PPILSD1-H3K4me₂, что приводило к транскрипционной активации гена NTRK2 в клетках SH-SY5Y [126].

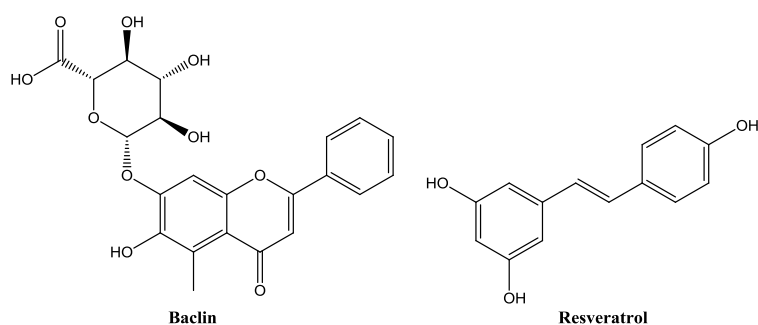


Схема 3 Химическая структура типичных ингибиторов LSD1 на основе натуральных продуктов.

1.4.3. Ингибиторы на основе пептидов

Молекулярный размер пептидов делает их идеальными каркасами для разработки ингибиторов PPI [127]. Многие сильные селективные пептидные ингибиторы были разработаны с учетом субстратсвязывающего домена LSD1. 21-мерный линейный пептид (соединение 1), соответствующий субстратной области LSD1, за исключением того, что четвертый Lys заменен на метионин, является мощным ингибитором LSD1 ($K_i = 0,04$ мкМ) и против LSD1-CoRESTPPI ($K_i = 0,05$ мкМ) (Схема 4) [128]. Кроме того, циклический пептид 2 был идентифицирован как мощный ингибитор LSD1 со значением IC_{50} 2,1 мкМ и значением K_i 385 нМ против LSD1/CoRESTPPI (Схема 4). Он также проявлял умеренную противораковую активность в клеточных линиях MCF-7 и Calu-6 [129]. Взаимодействие LSD1-SNAIL способствует инвазии раковых клеток и является новой мишенью для терапии рака [56]. Сообщалось, что молекула на основе пептида SNAIL (пептид 3) (Схема 4) является селективным ингибитором LSD1 со значением IC_{50} 0,28 мкМ и антипролиферативным эффектом для клеток Hele [130].

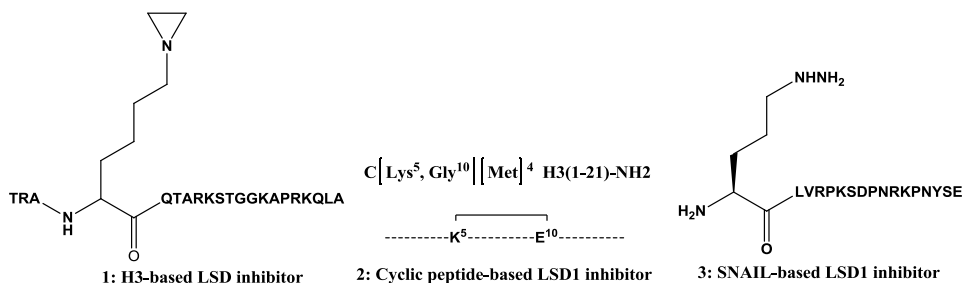


Схема 4 Химическая структура типичных пептидных ингибиторов. LSD1

1.4.4. Ингибиторы на основе полиаминов

Высоко консервативная структура и каталитическое сходство FAD-зависимых оксидаз, сильное сродство полиаминов с хроматином и структурное сходство между

полиаминами и лизиновыми хвостами гистонов побудили исследователей исследовать возможность разработки аналогов полиаминов в качестве ингибиторов LSD1 [91]. Аналоги полиаминов были впервые идентифицированы как ингибиторы LSD1 в 2007 году (Схема 5) [91]. Среди них соединения 4 и 5 показали значительное ингибирование LSD1 *in vitro* и *in vitro*. В клетках HCT116 эти соединения ингибировали активность LSD-деметилазы, что приводило к накоплению транскрипционно-активирующего H3K4me2/1 и, таким образом, приводило к противораковым эффектам *in vitro* и *in vivo* [91]. В последующих исследованиях было обнаружено, что производные этих соединений ингибируют прогрессирование рака через усиление экспрессии SFRP5 и GATA4, в то же время подавляя передачу сигналов Wnt[107,131,132].

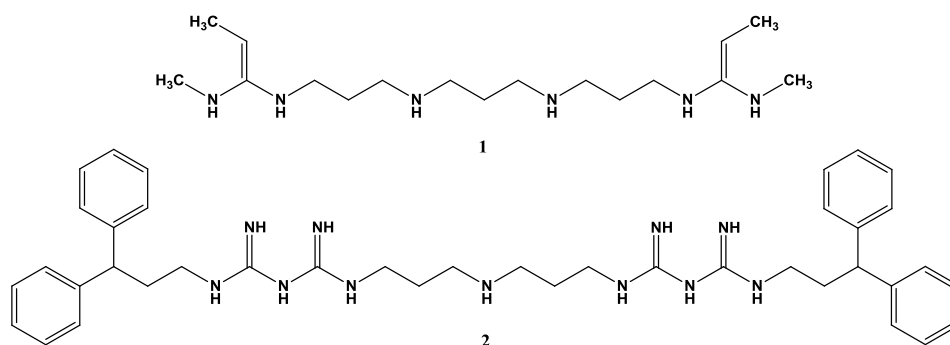
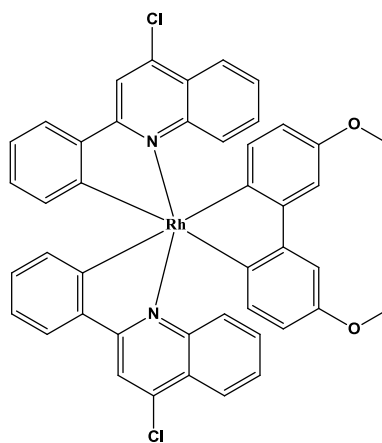


Схема 5 Химическая структура типичных ингибиторов LSD1 на основе полиаминов.

1.4.5. Металло-комплексные ингибиторы

Новый родий (III) комплекс является первым металлическим ингибитором активности LSD1, о котором сообщалось в литературе. Этот металлический комплекс занимал связывающий карман LSD1 для распознавания гистона H3 и, таким образом, блокировал взаимодействие LSD1-H3K4me2 в клетках рака предстательной железы человека, приводя к усилению амплификации промоторов генов p21, FOXA2 и BMP2. С IC50 0,04-0,008 мкМ для LSD1, этот комплекс был селективным для LSD1 по сравнению с MAO, а также проявлял антипролиферативную активность в отношении раковых клеток человека (Схема 6) [133].



Rhodium-based metal LSD1 inhibitor

Схема 6 Химическая структура типичного ингибитора LSD на основе металла.

1.4.6. Другие

С развитием компьютеризированного скрининга лекарств сообщалось о нескольких селективных и новых ингибиторах LSD1. CBV-1007 является обратимым, мощным и проникающим в клетки ингибитором LSD1 ($IC_{50} = 5,3 \text{ мкМ}$) [134]. GSK690, также известный как GSK354, ингибирует LSD1 ($IC_{50} = 90 \text{ нМ}$) с селективностью по сравнению с другими ферментами с доменами AOD и продемонстрировал эффективность против AML с низкой цитотоксичностью для клеток животных [135–137]. HCl2509 (также называемый SP2509), нековалентный ингибитор LSD1 с бензогидразидным каркасом, ингибирует LSD1 с $IC_{50} 13 \text{ нМ}$ и обладает специфичностью к LSD1 по сравнению с MAO [35]. Это соединение продемонстрировало способность эффективно снижать рост клеток при раке предстательной железы, раке эндометрия и саркоме Юинга [71,99,138,139].

1.5. Заключительные замечания и перспективы

Несмотря на то, что были проведены обширные исследования LSD1, и были выяснены его роли в прогрессировании и развитии рака, точные функции LSD1 при заболевании раком, лекарственной устойчивости и аутофагии еще предстоит изучить. Как онкоген, LSD1 привлекает огромное внимание медицинских химиков. Для разработки новых ингибиторов LSD1 необходимы эффективные методы скрининга для их обнаружения. Однако использование только одного метода скрининга может быть недостаточным для выявления новых ингибиторов LSD1 из-за высокой частоты ложноположительных или отрицательных результатов, вызванных недостатками методов скрининга (таблица 2). Следовательно, успешная методика скрининга на LSD1 обычно должна сочетать по меньшей мере два типа ортогональных анализов. Например, анализ на основе количественного определения побочного продукта может быть использован в качестве основного экрана с последующей проверкой совпадений с использованием анализа на основе количественного

определения субстрата, такого как анализ на основе FRET или масс-спектрометрия. Кроме того, поверхностный плазмонный резонанс, изотермическая титрационная калориметрия и биослойная интерферометрия также могут быть использованы для исследования параметров лекарственного средства-LSD1. Готовая доступность кокристаллических структур LSD1 также позволяет использовать методы виртуального скрининга для быстрого определения приоритетности возможных связующих для синтеза и скрининга. Наконец, должны быть проведены клеточные и/или животные анализы для идентификации ингибиторов LSD1 с биологической активностью *in cellulo* и *in vivo*.

Хотя в литературе было задокументировано несколько типов ингибиторов LSD1, причем некоторые даже проходят клинические испытания, все еще существует много проблем, которые необходимо исправить, прежде чем ингибиторы LSD1 смогут поступить в клиники. Во-первых, хотя виртуальный скрининг на каталитический карман LSD1 использовался для разработки многих ингибиторов LSD1, высокое сходство LSD1 с LSD2 и MAOs затрудняет разработку селективных ингибиторов LSD1 [124,125]. Одним из способов преодоления этого является нацеливание на другие домены, которые участвуют в аллостерической регуляции активности LSD1-деметилазы, а не на превращенный каталитический домен. Поскольку большинство ингибиторов LSD1, о которых сообщалось, сосредоточены на нацеливании на каталитический механизм, исследование молекул, нацеленных на аллостерические домены, может дать новые каркасы с исключительной селективностью. Кроме того, комплексы на основе металлов могут стать другими методами для получения мощных и селективных ингибиторов LSD1. Металлокомплексы характеризуются своей стабильностью, четкой геометрией и разнообразными структурами, это делает их пригодными для использования в качестве химических каркасов при исследовании сайтов связывания белков [133,140–144]. Например, ингибитор на основе родия (III), обладающий эффективностью и селективностью в отношении LSD1 *in vitro* и *in cellulo* [133]. Другой подход к созданию ингибиторов LSD1 заключается в использовании субстратных аналогов для разрушения природного LSD-пептидного PPI на основе структурных особенностей субстратсвязывающего кармана LSD1 [91, 127]. Во-вторых, важно отметить, что, хотя многие ингибиторы LSD1 могут отменять LSD1-опосредованное деметилирование, они могут не проявлять сильную противораковую активность, поскольку многие онкогены или гены-супрессоры опухоли часто регулируются несколькими ферментами [100]. Чтобы решить эту проблему, комбинация ингибиторов LSD1 с другими лекарственными средствами может стать жизнеспособным решением. Сообщалось, что HDAC1 образует комплекс с LSD1 и ингибирует транскрипцию генов, подавленных опухолью. Следовательно, двойное введение LSD1 и HDAC эффективно ингибировало

пролиферацию многих линий раковых клеток [145]. Ингибирование LSD1 также усиливало противоопухолевый иммунитет против PD-(L)1[146]. Комбинированная терапия ингибитором фермента гистон-лизин-*N*-метилтрансферазы, который активируется при множественном раке и способствует онкогенезу, и LSD1 продемонстрировал неожиданные синергетические эффекты против AML *in vitro* и *in vivo*[147]. Эти исследования показывают, что комбинированная терапия могла бы быть реальной стратегией для преодоления низкой индивидуальной активности ингибиторов LSD1. Кроме того, потенциальные побочные эффекты ингибирования LSD1 на кровь также являются важной проблемой [148]. Предыдущие исследования показали, что снижение активности LSD1 нарушает образование клеток крови (гранулоцитов и эритроцитов), что может привести к острой анемии и снижению числа тромбоцитов [75]. Сообщалось также, что некоторые ингибиторы LSD1 нарушают эритропоэз[71,148,149]. Интересно, что ингибитор LSD1 транилципромин не проявлял токсичности при использовании для лечения неврологических расстройств у мышей или людей [150]. Следовательно, неблагоприятные воздействия на эритропоэз следует учитывать при доклинической и клинической оценке нового ингибитора LSD1. Последней проблемой для введения ингибиторов LSD1 в клиники является тот факт, что LSD1 играет различную роль при разных формах рака. Поэтому ученым необходимо тесно сотрудничать с онкологами, чтобы определить, какие виды рака чувствительны к лечению ингибиторами LSD1 *in vivo*. Хотя в этом обзоре обобщены последние работы, которые внесли вклад в наше понимание биологии и ингибирования LSD1, предстоит еще пройти долгий путь, прежде чем будет определен профиль адаптации рака ингибиторами LSD1 и широко применяются ингибиторы при этих раковых заболеваниях человека.

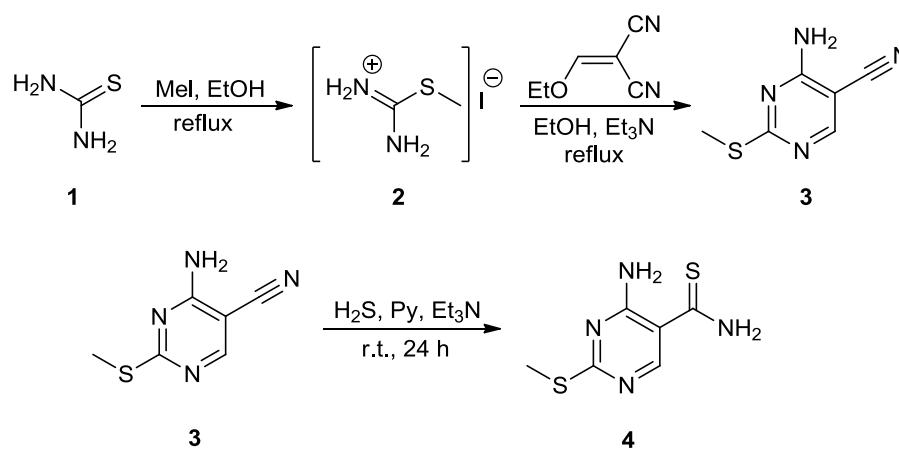
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в нашей исследовательской группе было показана высокая эффективность в отношении EGFR дикого типа ряда производных 4-амино-5-(тиазол-2-ил)пиримидинов. В данном исследовании мы расширяем применимость данного ингибитора в отношении новой биологической мишени LSD1.

2.1. Синтез ингибиторов

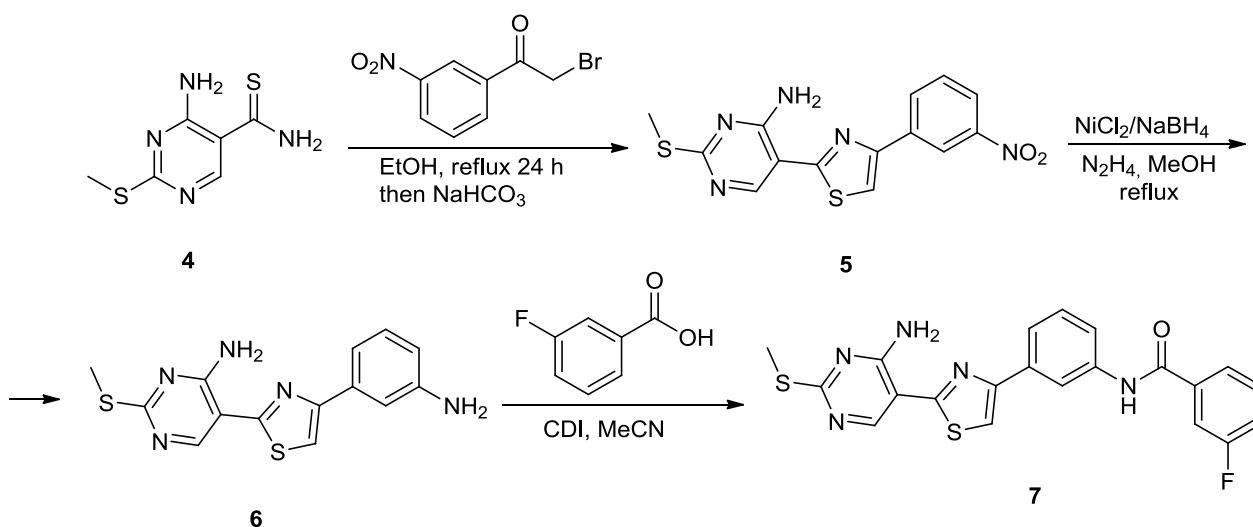
В схеме синтеза целевого ингибитора можно выделить две ключевые стадии. Стадию окисления сульфида до сульфона, а также сборку тиазольного цикла по методу Ганча. Исходные 2-тиоалкил-4-амино-5-пиримидитиоамиды получены по схеме 7.

Схема 7



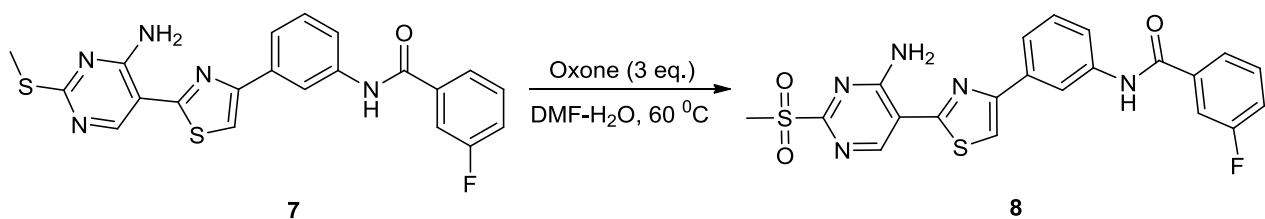
Сборка тиазола **5** проводилась по методу Ганча путем продолжительного кипячения (48 часов) смеси фенацилбромида и тиоамида, с последующей обработкой раствором гидрокарбоната натрия (схема 8).

Схема 8



Получение сульфона **8** при непродолжительном нагревании при 60 °C раствора полученного сульфида **7** в DMF с тремя эквивалентами оксона (схема 9).

Схема 9



Строение всех синтезированных лигандов подтверждено методом ЯМР ^1H и ^{13}C , а также двумерных экспериментов COSY, HMQC и HMBC. На рисунках 6-8 приведены примеры наблюдаемых спектров ЯМР для соединения **8**.

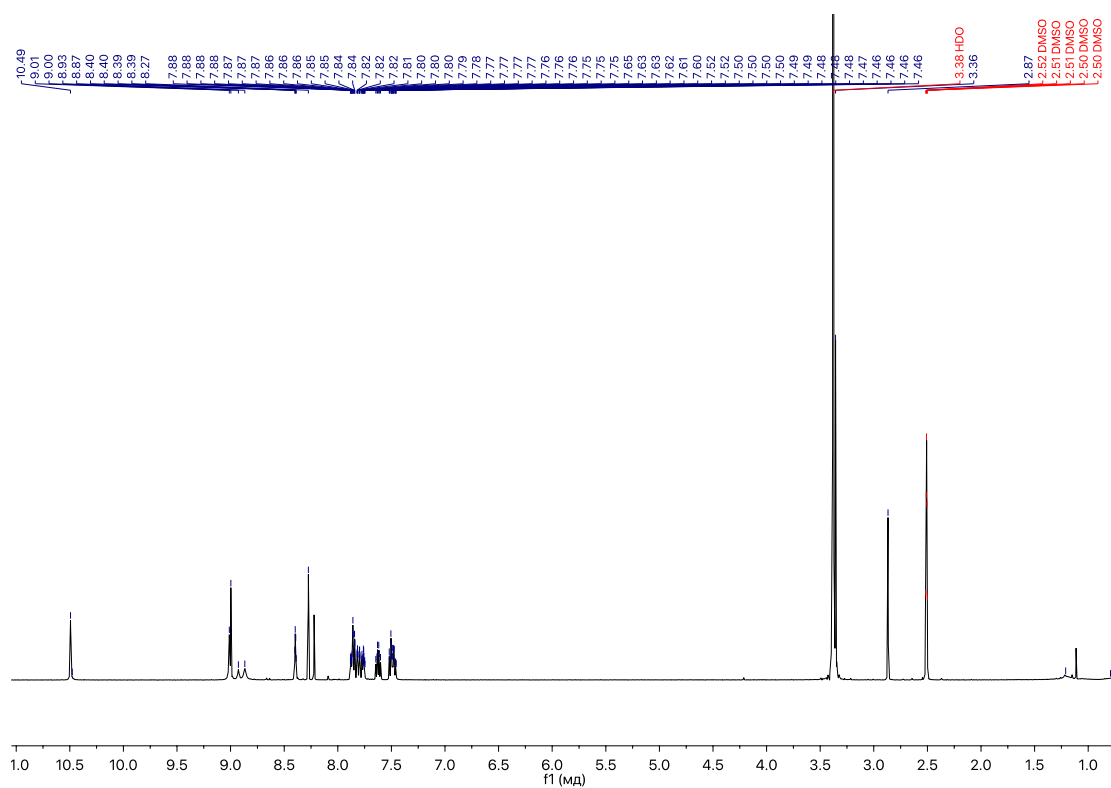


Рисунок 6 ЯМР спектр ^1H для *N*-(3-(4-(4-амино-2(метилсульфонил)тиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамида.

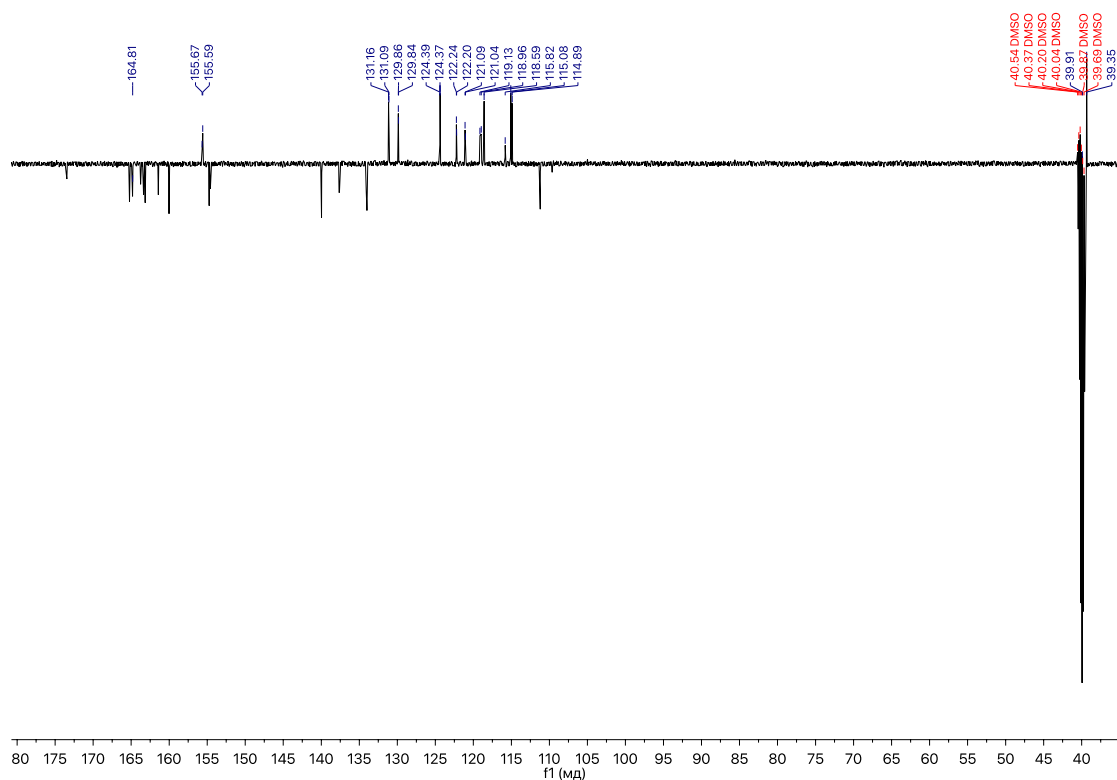


Рисунок 7 ЯМР спектр ^{13}C для *N*-(3-(4-(4-амино-2(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамида.

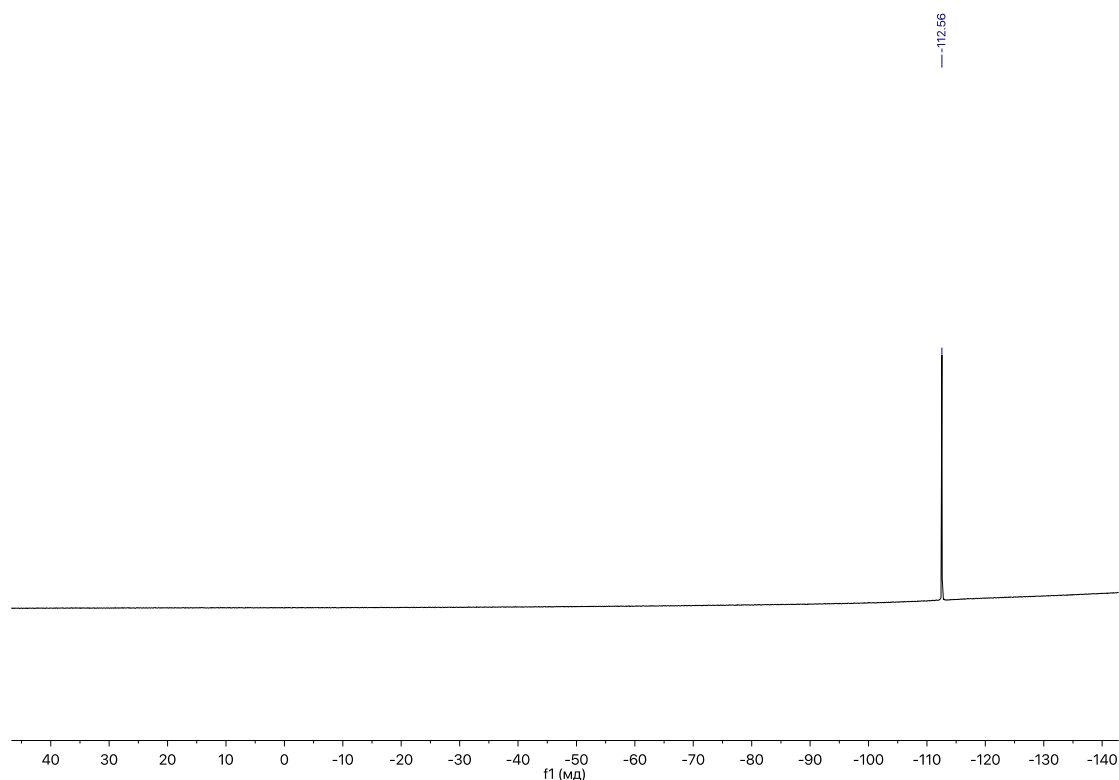
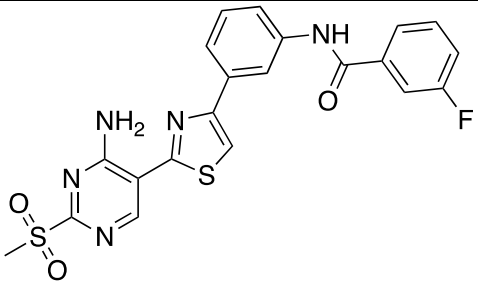


Рисунок 8 ЯМР спектр ^{19}F для *N*-(3-(4-(4-амино-2(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамида.

2.2. Биологические испытания

Ранее для соединений серии ASB была продемонстрирована высокая цитотоксичность в отношении ряда клеточных линий сверхэкспрессирующих EGFR – это клеточная линия A431 (эпидермоидная карцинома), A549 (карцинома легкого) и MCF-7 (карцинома молочной железы). Результаты токсичности полученные в рамках МТТ-теста представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты цитотоксичности

Соединение	Цитотоксичность, EC ₅₀ (мкмоль/л)		
	Клеточная линия		
	A431	A549	MCF-7
	0.54±0.017	3.67±0.02	9.12±0.18

Для подтверждения гипотезы о средстве синтезированного лиганда к LSD1 необходимо было подобрать клеточную линию не эпитеального типа, негативную по EGFR, но при этом положительной по LSD1. Анализ карт экспрессии LSD1 и EGFR позволил выявить клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y сверхэкспрессирующую LSD1. Анализ цитотоксичности методом МТТ-теста подтвердил наше предположение, эффективная концентрация цитотоксического эффекта составила 0.77±0.11 мкмоль/л.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Реагенты и оборудование

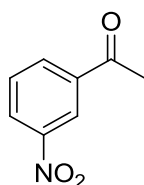
Контроль протекания реакции и чистоту полученных соединений оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent 1220 м» со спектрофотометрическим детектором. Использовалась колонка ZORBAXC-18, раствор MeCN:H₂O в соотношении 8:2 использовался в качестве элюента; скорость потока 1 мл/мин. Обработку анализируемых данных проводили с использованием программы OpenLab фирмы Agilent.

Данные ЯМР спектроскопии получены при комнатной температуре в дейтерированном диметилсульфоксиде (DMCO-*d*₆) на спектрометре Bruker 600 Avance™ с рабочей частотой 600.22 и 150.93 МГц для ядер ¹H и ¹³C соответственно. Сигналы химических сдвигов ядер ¹H и ¹³C приведены в миллионных долях относительно сигнала TMS. Для спектров ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C остаточный сигнал DMCO-*d*₆ был использован в качестве опорного (2.50 м.д. и 35.9 м.д. соответственно). Спектры ЯМР ¹H регистрировались со спектральной шириной 7.1 кГц, точкой данных 64 К, цифровым разрешением 0.22 Гц, задержкой релаксации 1.0 с и 30° шириной импульса 2.8 мкс, в то время как ¹³C – с шириной спектра 39.06 кГц, точкой данных 64 К, задержкой релаксации 2.0 с и 30° шириной импульса 5.6 мкс. HMQC спектры были собраны в 128×1024 матрице с одним переходом за t₁ приращение и обработаны как 1024×1024 матрица, значение одного гетероядерного взаимодействия было установлено на уровне 145 Гц. HMBC спектры были собраны в 128×4096 матрице с одним переходом за t₁ приращение и обработаны как 2048×1024 матрица, значение дальних взаимодействий было установлено на уровне 10 Гц.

Реагенты производства Merck, AcrosOrganics и Sigma– Aldrich использовали без дополнительной очистки.

3.2. Получение исходных соединений

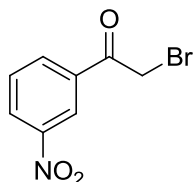
3-Нитроацетофенон



К 75 мл концентрированной серной кислоте при перемешивании прикапывали 29.2 мл ацетофенона (30 г; 0.25 моль) при температуре -5 — -10 °С. Затем в охлажденную до -10 °С реакционную смесь при перемешивании добавляли нитрующую смесь (24 мл концентрированной HNO₃ (0.325 моль; *d*²⁵ = 1.376) и 30 мл концентрированной H₂SO₄ по

каплям, придерживаясь необходимой температуры. Затем реакционную массу переносили в воду со льдом (1 л), отфильтровывали выпавший осадок и многократно промывали холодной водой. Для очистки продукта проводили перекристаллизацию в EtOH, растворили полученный осадок в 100 мл спирта и вылили в 1 л воды со льдом. Получили порошок бледно-желтого цвета. Выход: 65%; $T_{пл.} = 70-72\text{ }^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; λ_{max} 245 нм)=96%.

2-бром-1-(3-нитрофенил)этанон

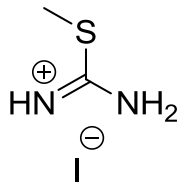


К раствору 3-нитроацетофенона (10 г; 0,061 моль) в 60 мл этилового спирта при температуре 40-50^oC и перемешивании порционно добавляли бром 3.12 мл (9.68 г; 0.061 моль). После полного обесцвечивания реакционную смесь выливали в ледяную воду (700 мл), полученный осадок отфильтровывали и промывали ледяной водой. Получили порошок бежевого цвета. Выход: 59%; $T_{пл.} = 60-62\text{ }^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; λ_{max} 245 нм)=94,4%.

Метилйодид

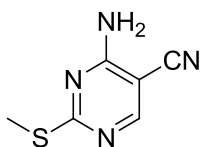
Смесь метанола (0.33 моль) и красного фосфора (3.41 г; 0.11 моль) перемешивали при охлаждении и прикапывали молекулярный йод (41.9 г; 0.165 моль). После реакционную массу подвергали кипячению в течении 2 часов, далее продукт отгоняли, собирая его в охлаждаемый приемник с 10 %-ым раствором Na₂S₂O₃, затем дистиллят промыли 10 %-ым раствором Na₂S₂O₃, органический слой сушили прокаленным CaCl₂. Выход: 56 %; $T_{кип.} = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$; $n_D^{20} = 1.5304$.

Гидройодид 2-метилизотиурония(2)



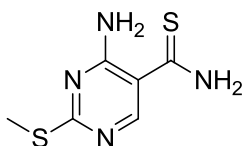
Смесь тиомочевины (9.36г, 0.123 моль) и метилйодида (0.123 моль) в 80 мл этанола кипятили в течение 12 часов. Затем отделяли растворитель с помощью роторного испарителя. Выход: 97%; $T_{пл.} = 147-149\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4-Амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карбонитрил (3)



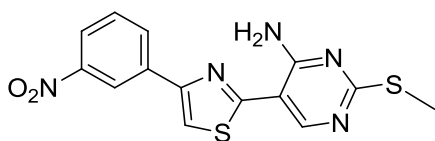
Смесь гидройодида 2-метилизотиурония (10.9 г; 50 ммоль), 2-(этоксиметил)малононитрила (6.1 г; 50 ммоль) и 13.87 мл триэтиламина (10.1 г; 100 ммоль) кипятили в течение 12 часов. После реакцию массу разбавили ледяной водой и отфильтровали выпавший осадок. Выход: 79%; $T_{пл.} = 212-214^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; $\lambda_{max} 227 \text{ nm}$) = 95.5%. ЯМР ¹H δ: 5.844 (с, 1H), 7.90 (д, J = 156.1 Гц, 2H), 2.45 (д, J = 1.3 Гц, 3H). ЯМР ¹³C δ: 5.175.10, 161.85, 161.03, 116.15, 109.99, 85.75, 13.91.

4-Амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карботиоамид (4)



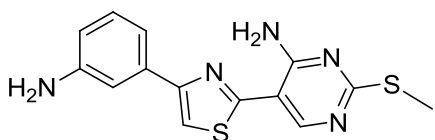
Сероводород, получаемый путем действия воды на сульфид фосфора пропускали через смесь 4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карбонитрила (6.64 г; 40 ммоль), 6 мл триэтиламина (4.04 г; 40 ммоль) и 40 мл пиридина до изменения окраски раствора с желтой на темно-зеленую. Затем смесь выдерживали при комнатной температуре 24 часа, после чего выливали в ледяную воду (500 мл), выпавший осадок отфильтровывали и промывали ледяной водой. Выход: 64%; $T_{пл.} = 245-247^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; $\lambda_{max} 279 \text{ nm}$) = 99%. ЯМР ¹H δ: 5.976 (с, 1H), 9.50 (с, 1H), 8.23 (с, 1H), 8.02 (с, 2H), 2.45 (с, 3H). ЯМР ¹³C δ: 5.195.79, 172.07, 160.77, 153.32, 111.86, 109.99, 13.82.

4-Амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-нитрофенил)тиазол-2-ил)пиримидин (5)



Смесь 4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-карботиоамида (4.08 г; 19.1 ммоль) и 2-бром-1-(3-нитрофенил)этанона (4.68 г; 19.1 ммоль) в 200 мл этанола кипятили при перемешивании в течении 24 часов. Далее в реакцию смесь добавляли 50 мл NaHCO₃, разбавляли водой в два раза и отфильтровывали осадок. Получили осадок желтого цвета. Выход: 76%; $T_{пл.} = 291-293^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; $\lambda_{max} 257 \text{ nm}$) = 95%.

4-Амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-аминофенил)тиазол-2-ил)пиримидин (6)



Реакцию проводили при помощи пористого никеля, получаемого при взаимодействии на хлорид никеля в метаноле гидроборатом натрия. 4 г пористого никеля добавляли к смеси из 4-амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-нитрофенил)тиазол-2-ил)пиримидина (2.1 г; 5.4 ммоль) в метаноле 150 мл, добавляли в реакционную смесь 2.65 мл гидразингидрата (2.73 г; 54 ммоль), кипятили при перемешивании 2 часа. Далее горячую реакционную смесь отфильтровывали от пористого никеля, промывали осадок ацетоном, маточный раствор разбавляли водой в пятикратном объеме, полученный белый осадок отфильтровывали.

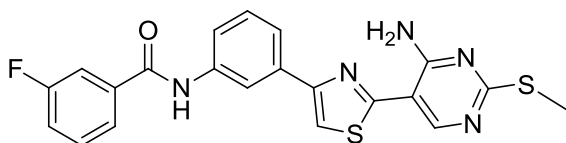
Выход: 80%; $T_{пл.} = 226-228^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; λ_{max} 272 нм) = 97%. ЯМР¹H δ : 8.63 (с, 1H), 8.58 – 8.23 (м, 2H), 7.90 (с, 1H), 7.18 (с, 1H), 7.14 – 7.06 (м, 2H), 6.60 (д, $J = 7.7$ Гц, 1H). ЯМР¹³C δ : 171.66, 164.32, 158.81, 155.25, 155.08, 149.56, 134.42, 129.86, 114.63, 114.27, 112.32, 111.85, 106.09, 13.87.

3.3. Синтез целевого соединения

Хлорангидрид карбоновой кислоты.

К кислоте (25 ммоль) растворенной в 40 мл дихлорметана прилили 30 мкл ДМФА и 2.9 мл тионилхлорида (4.76 г, 40 ммоль). Реакционную смесь в течении 3 часов кипятили с обратных холодильником и хлоркальциевой трубкой. После удалили растворитель. Продукт реакции вводили в следующую стадию без дополнительной очистки.

N-(3-(4-(4-амино-2-(метилтио)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамид (7)



Из 2-бром-1-(3-нитрофенил)этанона (10 ммоль), CDI (1.78 г; 11 ммоль) и 30 мл MeCN безводный приготовили смесь и перемешивали при комнатной температуре 2 часа. Затем в реакционную смесь ввели 4-амино-2-(метилтио)-5-(4-(3-аминофенил)тиазол-2-ил)пиримидин (3.15 г; 10 ммоль), выдерживали смесь при перемешивании 24 часа. Далее смесь обработали последовательно 50 мл EtOAc + 50 мл воды, раствором 1 мл концентрированной HCl в 50 мл воды, 50 мл насыщенного раствора NaHCO₃, 50 мл насыщенного раствора NaCl. Органический слой сушили Na₂SO₄ и удаляли растворитель.

Выход: 99%; $T_{пл.} = 252-254^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; λ_{max} 228нм) = 97%. ЯМР¹⁹F δ : -112.57. ЯМР¹H δ : 10.49 (с, 1H), 8.66 (с, 1H), 8.53 - 8.30 (м, 3H), 8.08 (с, 1H), 7.86 (д, $J = 7.7$ Гц, 2H), 7.81 (дт, $J = 9.7$, 2.2 Гц, 1H), 7.72 (дт, $J = 7.8$, 1.3 Гц, 1H), 7.62 (тд, $J = 8.0$, 5.8 Гц, 1H), 7.48 (тд, $J = 8.2$, 4.3 Гц, 2H).

N-(3-(4-(4-амино-2(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)тиазол-2-ил)фенил)-3-фторбензамид(8)



К смеси исходного сульфида (0,63 г; 1,5 ммоль) в 20 мл ДМФА добавили раствор оксона (2.76 г; 4.5 ммоль) в 5 мл воды. Смесь выдерживали с течением часа при температуре 60°C и перемешивании. Далее реакционную смесь разбавили ледяной водой (100 мл), выпавший осадок отфильтровали.

Выход: 72%; $T_{пл.} = 230-232^{\circ}\text{C}$; ВЭЖХ (MeCN:H₂O – 8:2; $\lambda_{max} 226\text{nm}$) = 96%. ЯМР¹H δ : 10.49 (с, 1H), 9.00 (д, $J = 7.1$ Гц, 2H), 8.44 – 8.35 (м, 1H), 8.27 (с, 1H), 8.22 (с, 0H), 7.91 – 7.73 (м, 4H), 7.62 (тд, $J = 8.0, 5.8$ Гц, 1H), 7.55 – 7.43 (м, 2H), 3.36 (с, 3H). ЯМР¹³C: δ 173.47, 165.23, 164.80, 163.75, 161.42, 160.03, 155.59, 154.75, 154.58, 139.97, 137.61, 133.99, 131.16, 129.86, 124.37, 122.24, 121.09, 119.13, 118.59, 115.82, 115.08, 114.89, 111.20, 39.35. ЯМР¹⁹F δ - 112.56.

3.4. Биологические испытания

3.4.1. Культивирование клеток

Клетки нейробластомы SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco) дополненной эмбриональной бычьей сывороткой (10%), глутамином и антибиотиком/антимикотиком при 37°C и 5% концентрации углекислого газа.

3.4.2. Исследования цитотоксичности

Клетки линии SH-SY5Y вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты (Eppendorf) по 7×10^3 клеток на лунку в полной среде DMEM/F12. Через 24 часа в лунки с клетками добавляли исследуемые препараты, приготовленные из рабочих стоков *in situ* в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-9} моль/л и инкубировали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл и оставляли на 4 часа в CO₂-инкубаторе, затем среду отбирали и вносили в лунки по 200 мкл ДМСО (Sigma, США) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре GloMaxMulti+ при 560 нм, используя ДМСО как нулевой контроль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. На основе структурно-ориентированного молекулярного дизайна предложены новые эффективные дуальные ингибиторы EGFRкиназы и LSD1 диметилазы, включающих 4-амино-5-(тиазол-2-ил)пиримидиновый скаффолд.
2. Посредством МТТ-теста показана высокая цитотоксичность *in vitro* синтезированного соединения в отношении клеточных линий MCF-7, A549, A431 и SH-SY5Y в микромолярных концентрациях.
3. Показано, что высокая цитотоксичность на клеточных линиях сверхэкспрессирующих исследуемые мишени делает дальнейшее изучение механизма цитотоксического эффекта оправданным и актуальным.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shi Y. et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. // Cell. Elsevier, 2004. Vol. 119, № 7. P. 941–953.
2. Wang J. et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation // Nat. Genet. Nature Publishing Group, 2009. Vol. 41, № 1. P. 125–129.
3. Xie Q. et al. Methylation-mediated regulation of E2F1 in DNA damage-induced cell death // J. Recept. Signal Transduct. 2011. Vol. 31, № 2. P. 139–146.
4. Kim Y. et al. Methylation-dependent regulation of HIF-1 α stability restricts retinal and tumour angiogenesis // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 7, № 1. P. 10347.
5. Kozub M.M. et al. LSD1, a double-edged sword, confers dynamic chromatin regulation but commonly promotes aberrant cell growth // F1000Research. 2017. Vol. 6. P. 2016.
6. Huang J. et al. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1 // Nature. Nature Publishing Group, 2007. Vol. 449, № 7158. P. 105–108.
7. Kontaki H., Talianidis I. Lysine Methylation Regulates E2F1-Induced Cell Death // Mol. Cell. Elsevier, 2010. Vol. 39, № 1. P. 152–160.
8. Lee J.-Y. et al. LSD1 demethylates HIF1 α to inhibit hydroxylation and ubiquitin-mediated degradation in tumor angiogenesis // Oncogene. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 36, № 39. P. 5512–5521.
9. Yang J. et al. Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2010. Vol. 107, № 50. P. 21499–21504.
10. Laurent B. et al. A specific LSD1/KDM1A isoform regulates neuronal differentiation through H3K9 demethylation. // Mol. Cell. Elsevier, 2015. Vol. 57, № 6. P. 957–970.
11. Jotatsu T. et al. LSD1/KDM1 isoform LSD1+8a contributes to neural differentiation in small cell lung cancer // Biochem. Biophys. Reports. Elsevier, 2017. Vol. 9. P. 86–94.
12. Pedersen M.T., Helin K. Histone demethylases in development and disease. // Trends Cell Biol. Elsevier, 2010. Vol. 20, № 11. P. 662–671.
13. Harris W.J. et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. // Cancer Cell. Elsevier, 2012. Vol. 21, № 4. P. 473–487.
14. Schenk T. et al. Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia // Nat. Med. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 18, № 4. P. 605–611.
15. Magliulo D., Bernardi R., Messina S. Lysine-Specific Demethylase 1A as a Promising Target in Acute Myeloid Leukemia // Front. Oncol. Frontiers, 2018. Vol. 8. P. 255.
16. Pilotto S. et al. Interplay among nucleosomal DNA, histone tails, and corepressor

CoREST underlies LSD1-mediated H3 demethylation. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2015. Vol. 112, № 9. P. 2752–2757.

17. Marabelli C., Marrocco B., Mattevi A. The growing structural and functional complexity of the LSD1/KDM1A histone demethylase // Curr. Opin. Struct. Biol. Elsevier Current Trends, 2016. Vol. 41. P. 135–144.

18. Da G. et al. Structure and function of the SWIRM domain, a conserved protein module found in chromatin regulatory complexes. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103, № 7. P. 2057–2062.

19. Aravind L., Iyer L.M. The SWIRM domain: a conserved module found in chromosomal proteins points to novel chromatin-modifying activities // Genome Biol. BioMed Central, 2002. Vol. 3, № 8. P. research0039.1.

20. Metzger E. et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription // Nature. Nature Publishing Group, 2005. Vol. 437, № 7057. P. 436–439.

21. Stavropoulos P., Blobel G., Hoelz A. Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1 // Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 13, № 7. P. 626–632.

22. Forneris F. et al. New roles of flavoproteins in molecular cell biology: Histone demethylase LSD1 and chromatin // FEBS J. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 2009. Vol. 276, № 16. P. 4304–4312.

23. Chen Y. et al. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2006. Vol. 103, № 38. P. 13956–13961.

24. Yoneyama M. et al. Structural and Functional Differences of SWIRM Domain Subtypes // J. Mol. Biol. Academic Press, 2007. Vol. 369, № 1. P. 222–238.

25. Zhou C. et al. Identification of Novel Selective Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors Using a Pharmacophore-Based Virtual Screening Combined with Docking // Chem. Biol. Drug Des. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 2015. Vol. 85, № 6. P. 659–671.

26. Ota Y., Suzuki T. Drug Design Concepts for LSD1- Selective Inhibitors // Chem. Rec. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 18, № 12. P. 1782–1791.

27. You A. et al. CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2001. Vol. 98, № 4. P. 1454–1458.

28. Baron R., Vellore N.A. LSD1/CoREST is an allosteric nanoscale clamp regulated by H3-histone-tail molecular recognition // Proc. Natl. Acad. Sci. National Academy of Sciences,

2012. Vol. 109, № 31. P. 12509–12514.

29. Sun G. et al. Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation. // *Mol. Cell. Biol.* American Society for Microbiology Journals, 2010. Vol. 30, № 8. P. 1997–2005.

30. Hakimi M.-A. et al. A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2002. Vol. 99, № 11. P. 7420–7425.

31. Ballas N. et al. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. // *Cell.* Elsevier, 2005. Vol. 121, № 4. P. 645–657.

32. Perillo B. et al. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. // *Science.* American Association for the Advancement of Science, 2008. Vol. 319, № 5860. P. 202–206.

33. Bennesch M.A. et al. LSD1 engages a corepressor complex for the activation of the estrogen receptor α by estrogen and cAMP // *Nucleic Acids Res.* Narnia, 2016. Vol. 44, № 18. P. 8655–8670.

34. Hino S., Kohroggi K., Nakao M. Histone demethylase LSD1 controls the phenotypic plasticity of cancer cells // *Cancer Sci.* John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 2016. Vol. 107, № 9. P. 1187–1192.

35. Sorna V. et al. High-Throughput Virtual Screening Identifies Novel *N*'-(1-Phenylethylidene)-benzohydrazides as Potent, Specific, and Reversible LSD1 Inhibitors // *J. Med. Chem.* American Chemical Society, 2013. Vol. 56, № 23. P. 9496–9508.

36. Koboldt D.C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours // *Nature.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 490, № 7418. P. 61–70.

37. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2016 // *CA. Cancer J. Clin.* 2016. Vol. 66, № 1. P. 7–30.

38. Rivenbark A.G., Coleman W.B. Field cancerization in mammary carcinogenesis — Implications for prevention and treatment of breast cancer // *Exp. Mol. Pathol.* Academic Press, 2012. Vol. 93, № 3. P. 391–398.

39. Serce N. et al. Elevated expression of LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) during tumour progression from pre-invasive to invasive ductal carcinoma of the breast // *BMC Clin. Pathol.* BioMed Central, 2012. Vol. 12, № 1. P. 13.

40. Bradley C. et al. Carcinogen-induced histone alteration in normal human mammary epithelial cells // *Carcinogenesis.* Narnia, 2007. Vol. 28, № 10. P. 2184–2192.

41. Jordan V.C. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. // *Cancer Cell.* Elsevier, 2004. Vol. 5, № 3. P. 207–213.

42. Mann M. et al. Epigenetics of Estrogen Receptor Signaling: Role in Hormonal

Cancer Progression and Therapy // *Cancers (Basel)*. Molecular Diversity Preservation International, 2011. Vol. 3, № 2. P. 1691–1707.

43. Hu Q. et al. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2008. Vol. 105, № 49. P. 19199–19204.

44. Pollock J.A. et al. Lysine-Specific Histone Demethylase 1 Inhibitors Control Breast Cancer Proliferation in ER α -Dependent and -Independent Manners // *ACS Chem. Biol.* American Chemical Society, 2012. Vol. 7, № 7. P. 1221–1231.

45. Bennani-Baiti I.M. Integration of ER α -PELP1-HER2 signaling by LSD1 (KDM1A/AOF2) offers combinatorial therapeutic opportunities to circumventing hormone resistance in breast cancer // *Breast Cancer Res. BioMed Central*, 2012. Vol. 14, № 5. P. 112.

46. Kim J. et al. Negative regulation of ER α by a novel protein CAC1 through association with histone demethylase LSD1 // *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 587, № 1. P. 17–22.

47. Park U.-H. et al. ASXL2 promotes proliferation of breast cancer cells by linking ER α to histone methylation // *Oncogene*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 35, № 28. P. 3742–3752.

48. Wu Y., Zhou B.P. Epigenetic regulation of LSD1 during mammary carcinogenesis. // *Mol. Cell. Oncol.* Taylor & Francis, 2014. Vol. 1, № 3. P. e963426.

49. Vasilatos S.N. et al. Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells // *Carcinogenesis*. Narnia, 2013. Vol. 34, № 6. P. 1196–1207.

50. Huang Y. et al. Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells // *Breast Cancer Res. Treat.* Springer US, 2012. Vol. 131, № 3. P. 777–789.

51. Yang Y. et al. LSD1 coordinates with the SIN3A/HDAC complex and maintains sensitivity to chemotherapy in breast cancer // *J. Mol. Cell Biol.* / ed. Shen Z. Narnia, 2018. Vol. 10, № 4. P. 285–301.

52. Nieto M.A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2002. Vol. 3, № 3. P. 155–166.

53. Aoki M. et al. Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 1999. Vol. 96, № 1. P. 139–144.

54. Yang J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. // *Cell*. Elsevier, 2004. Vol. 117, № 7. P. 927–939.

55. Lin Y. et al. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for

recruiting lysine-specific demethylase 1. // *EMBO J.* EMBO Press, 2010. Vol. 29, № 11. P. 1803–1816.

56. Lin T. et al. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snail-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition // *Oncogene*. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 29, № 35. P. 4896–4904.

57. Lin Y., Kang T., Zhou B.P. Doxorubicin enhances Snail/LSD1-mediated PTEN suppression in a PARP1-dependent manner // *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 2014. Vol. 13, № 11. P. 1708–1716.

58. Wu Z.-Q. et al. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2012. Vol. 109, № 41. P. 16654–16659.

59. Zheng Y. et al. The Homeotic Protein SIX3 Suppresses Carcinogenesis and Metastasis through Recruiting the LSD1/NuRD(MTA3) Complex // *Theranostics*. 2018. Vol. 8, № 4. P. 972–989.

60. Munkley J. et al. Glycosylation is an Androgen-Regulated Process Essential for Prostate Cancer Cell Viability. // *EBioMedicine*. Elsevier, 2016. Vol. 8. P. 103–116.

61. Willmann D. et al. Impairment of prostate cancer cell growth by a selective and reversible lysine-specific demethylase 1 inhibitor // *Int. J. Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 131, № 11. P. 2704–2709.

62. Kashyap V. et al. The lysine specific demethylase-1 (LSD1/KDM1A) regulates VEGF-A expression in prostate cancer // *Mol. Oncol.* John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 7, № 3. P. 555–566.

63. Ketscher A. et al. LSD1 controls metastasis of androgen-independent prostate cancer cells through PXN and LPAR6 // *Oncogenesis*. Nature Publishing Group, 2014. Vol. 3, № 10. P. e120–e120.

64. Rozan L.M., El-Deiry W.S. p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution // *Cell Death Differ.* 2007. Vol. 14, № 1. P. 3–9.

65. Hotte S.J., Saad F. Current management of castrate-resistant prostate cancer // *Curr. Oncol.* 2010. Vol. 17, № 0. P. 72–79.

66. Cai C. et al. Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. // *Cancer Cell*. Elsevier, 2011. Vol. 20, № 4. P. 457–471.

67. Kahl P. et al. Androgen Receptor Coactivators Lysine-Specific Histone Demethylase 1 and Four and a Half LIM Domain Protein 2 Predict Risk of Prostate Cancer Recurrence // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, № 23. P. 11341–11347.

68. Wissmann M. et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression // *Nat. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2007. Vol. 9, № 3. P. 347–353.
69. Regufe da Mota S. et al. LSD1 inhibition attenuates androgen receptor V7 splice variant activation in castration resistant prostate cancer models // *Cancer Cell Int.* BioMed Central, 2018. Vol. 18, № 1. P. 71.
70. Liang Y. et al. LSD1-Mediated Epigenetic Reprogramming Drives CENPE Expression and Prostate Cancer Progression // *Cancer Res.* American Association for Cancer Research, 2017. Vol. 77, № 20. P. 5479–5490.
71. Sehrawat A. et al. LSD1 activates a lethal prostate cancer gene network independently of its demethylase function // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. Vol. 115, № 18. P. E4179–E4188.
72. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. // *J. Clin. Oncol.* American Society of Clinical Oncology, 2017. Vol. 35, № 9. P. 934–946.
73. Larrosa-Garcia M., Baer M.R. FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions // *Mol. Cancer Ther.* American Association for Cancer Research, 2017. Vol. 16, № 6. P. 991–1001.
74. Wang J. et al. Histone demethylase LSD1 regulates hematopoietic stem cells homeostasis and protects from death by endotoxic shock. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2018. Vol. 115, № 2. P. E244–E252.
75. Sprüssel A. et al. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation // *Leukemia.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 26, № 9. P. 2039–2051.
76. Kon Kim T., Gore S.D., Zeidan A.M. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions // *Semin. Hematol.* 2015. Vol. 52, № 3. P. 172–183.
77. Amente S., Lania L., Majello B. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* Elsevier, 2013. Vol. 1829, № 10. P. 981–986.
78. Takeuchi M. et al. LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblasts through downregulation of Etv2 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* National Academy of Sciences, 2015. Vol. 112, № 45. P. 13922–13927.
79. Velinder M. et al. GFI1 functions in transcriptional control and cell fate determination require SNAG domain methylation to recruit LSD1 // *Biochem. J.* Portland Press Limited, 2017. Vol. 474, № 17. P. 2951–2951.

80. Thambyrajah R. et al. GFI1 proteins orchestrate the emergence of haematopoietic stem cells through recruitment of LSD1 // *Nat. Cell Biol.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 18, № 1. P. 21–32.
81. Saleque S. et al. Epigenetic Regulation of Hematopoietic Differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b Is Mediated by the Cofactors CoREST and LSD1 // *Mol. Cell.* Elsevier, 2007. Vol. 27, № 4. P. 562–572.
82. Altucci L., Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer // *Nat. Rev. Cancer* 2001 13. Nature Publishing Group, 2001. Vol. 1, № 3. P. 181.
83. Lynch J.T. et al. Pharmacological Inhibitors of LSD1 Promote Differentiation of Myeloid Leukemia Cells through a Mechanism Independent of Histone Demethylation // *Blood.* 2014. Vol. 124, № 21.
84. Shoichet B.K. Virtual screening of chemical libraries // *Nat.* 2004 4327019. Nature Publishing Group, 2004. Vol. 432, № 7019. P. 862.
85. Mould D.P. et al. Development of 5-hydroxypyrazole derivatives as reversible inhibitors of lysine specific demethylase 1 // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* Pergamon, 2017. Vol. 27, № 14. P. 3190–3195.
86. Schüle E.M. Interaction of methylated lsd1 and chd1, a compound inhibiting this interaction for use in therapy, and a screening method for such a compound. 2018. Vol. 1.
87. Syafrizayanti et al. Methods for analyzing and quantifying protein–protein interaction // *Expert Rev. Proteomics.* 2014. Vol. 11, № 1. P. 107–120.
88. Zheng Y.-C. et al. An Overview on Screening Methods for Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors // *Curr. Med. Chem.* 2017. Vol. 24, № 23.
89. Wigle T.J. et al. A High-Throughput Mass Spectrometry Assay Coupled with Redox Activity Testing Reduces Artifacts and False Positives in Lysine Demethylase Screening // *J. Biomol. Screen.* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 2015. Vol. 20, № 6. P. 810–820.
90. Plant M. et al. Screening for lysine-specific demethylase-1 inhibitors using a label-free high-throughput mass spectrometry assay // *Anal. Biochem.* Academic Press, 2011. Vol. 419, № 2. P. 217–227.
91. Huang Y. et al. Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2007. Vol. 104, № 19. P. 8023–8028.
92. Zhou M. et al. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases // *Anal. Biochem.* Academic Press, 1997. Vol. 253, № 2. P. 162–168.

93. Trinder P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor // *Ann. Clin. Biochem. An Int. J. Biochem. Lab. Med.* SAGE PublicationsSage UK: London, England, 1969. Vol. 6, № 1. P. 24–27.
94. Hauser A.-T. et al. Screening Assays for Epigenetic Targets Using Native Histones as Substrates // *J. Biomol. Screen.* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 2012. Vol. 17, № 1. P. 18–26.
95. Neves M.A.C., Totrov M., Abagyan R. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* Springer Netherlands, 2012. Vol. 26, № 6. P. 675–686.
96. Mimasu S. et al. Structurally Designed *trans*-2-Phenylcyclopropylamine Derivatives Potently Inhibit Histone Demethylase LSD1/KDM1,, § // *Biochemistry.* American Chemical Society, 2010. Vol. 49, № 30. P. 6494–6503.
97. Gupta S. et al. Reversible LSD1 inhibition with HCI-2509 induces the p53 gene expression signature and disrupts the MYCN signature in high-risk neuroblastoma cells // *Oncotarget.* Impact Journals, 2018. Vol. 9, № 11. P. 9907–9924.
98. Fiskus W. et al. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells // *Leukemia.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 28, № 11. P. 2155–2164.
99. Gupta S. et al. Reversible lysine-specific demethylase 1 antagonist HCI-2509 inhibits growth and decreases c-MYC in castration- and docetaxel-resistant prostate cancer cells // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 19, № 4. P. 349–357.
100. Malo N. et al. Statistical practice in high-throughput screening data analysis // *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2006. Vol. 24, № 2. P. 167–175.
101. Bibette J. Gaining confidence in high-throughput screening. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2012. Vol. 109, № 3. P. 649–650.
102. Maojun Yang § et al. Structural Basis for the Inhibition of the LSD1 Histone Demethylase by the Antidepressant *trans*-2-Phenylcyclopropylamine†,‡. American Chemical Society, 2007.
103. Culhane J.C. et al. A Mechanism-Based Inactivator for Histone Demethylase LSD1 // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 14. P. 4536–4537.
104. Lizcano J.M., Unzeta M., Tipton K.F. A Spectrophotometric Method for Determining the Oxidative Deamination of Methylamine by the Amine Oxidases // *Anal. Biochem.* Academic Press, 2000. Vol. 286, № 1. P. 75–79.
105. Hazeldine S. et al. Low Molecular Weight Amidoximes that Act as Potent Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1 // *J. Med. Chem.* American Chemical Society, 2012. Vol. 55, №

17. P. 7378–7391.

106. Wu Y. et al. Oligoamine analogues in combination with 2-difluoromethylornithine synergistically induce re-expression of aberrantly silenced tumour-suppressor genes. // *Biochem. J.* Portland Press Limited, 2012. Vol. 442, № 3. P. 693–701.

107. Huang Y. et al. Novel Oligoamine Analogues Inhibit Lysine-Specific Demethylase 1 and Induce Reexpression of Epigenetically Silenced Genes // *Clin. Cancer Res.* American Association for Cancer Research, 2009. Vol. 15, № 23. P. 7217–7228.

108. Yu V. et al. High-Throughput TR-FRET Assays for Identifying Inhibitors of LSD1 and JMJD2C Histone Lysine Demethylases // *J. Biomol. Screen.* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 2012. Vol. 17, № 1. P. 27–38.

109. Gauthier N. et al. Development of Homogeneous Nonradioactive Methyltransferase and Demethylase Assays Targeting Histone H3 Lysine 4 // *J. Biomol. Screen.* SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 2012. Vol. 17, № 1. P. 49–58.

110. Takagi T. et al. Comparison of Luminescence ADP Production Assay and Radiometric Scintillation Proximity Assay for Cdc7 Kinase // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2011. Vol. 14, № 8. P. 669–687.

111. Yu W. et al. A scintillation proximity assay for histone demethylases // *Anal. Biochem.* Academic Press, 2014. Vol. 463. P. 54–60.

112. Ahmed Khan M.N. et al. Design, synthesis, and biological activity of N-alkylated analogue of NCL1, a selective inhibitor of lysine-specific demethylase 1 // *Medchemcomm.* The Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 6, № 3. P. 407–412.

113. Zheng Y.-C. et al. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors // *Med. Res. Rev.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 35, № 5. P. 1032–1071.

114. Ueda R. et al. Identification of Cell-Active Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inhibitors // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2009. Vol. 131, № 48. P. 17536–17537.

115. Youdim M.B.H., Edmondson D., Tipton K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors // *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. Vol. 7, № 4. P. 295–309.

116. Maes T. et al. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2015. Vol. 23. P. 52–60.

117. Maes T. et al. ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia // *Cancer Cell.* Elsevier, 2018. Vol. 33, № 3. P. 495-511.e12.

118. Mohammad H.P. et al. A DNA Hypomethylation Signature Predicts Antitumor Activity of LSD1 Inhibitors in SCLC. // *Cancer Cell.* Elsevier, 2015. Vol. 28, № 1. P. 57–69.

119. Cortez V. et al. Targeting the PELP1-KDM1 axis as a potential therapeutic strategy

for breast cancer // *Breast Cancer Res. BioMed Central*, 2012. Vol. 14, № 4. P. R108.

120. Etani T. et al. NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect // *Oncotarget. Impact Journals*, 2015. Vol. 6, № 5. P. 2865–2878.

121. Sareddy G.R. et al. Novel KDM1A inhibitors induce differentiation and apoptosis of glioma stem cells via unfolded protein response pathway // *Oncogene. Nature Publishing Group*, 2017. Vol. 36, № 17. P. 2423–2434.

122. Sareddy G.R. et al. KDM1 is a novel therapeutic target for the treatment of gliomas // *Oncotarget. Impact Journals*, 2013. Vol. 4, № 1. P. 18–28.

123. Prusevich P. et al. A Selective Phenelzine Analogue Inhibitor of Histone Demethylase LSD1 // *ACS Chem. Biol. American Chemical Society*, 2014. Vol. 9, № 6. P. 1284–1293.

124. Lomenick B. et al. Target Identification Using Drug Affinity Responsive Target Stability (DARTS) // *Current Protocols in Chemical Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

125. Abdulla A., Zhao X., Yang F. Natural Polyphenols Inhibit Lysine-Specific Demethylase-1 in vitro. // *J. Biochem. Pharmacol. Res.* 2013. Vol. 1, № 1. P. 56–63.

126. Sakane C. et al. Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by the acyclic diterpenoid geranylgeranoic acid and its derivatives // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Academic Press*, 2014. Vol. 444, № 1. P. 24–29.

127. Wójcik P., Berlicki Ł. Peptide-based inhibitors of protein–protein interactions // *Bioorg. Med. Chem. Lett. Pergamon*, 2016. Vol. 26, № 3. P. 707–713.

128. Forneris F. et al. Structural basis of LSD1-CoREST selectivity in histone H3 recognition. // *J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2007. Vol. 282, № 28. P. 20070–20074.

129. Kumarasinghe I.R., Woster P.M. Synthesis and Evaluation of Novel Cyclic Peptide Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1 // *ACS Med. Chem. Lett. American Chemical Society*, 2014. Vol. 5, № 1. P. 29–33.

130. Itoh Y. et al. Identification of SNAIL1 Peptide-Based Irreversible Lysine-Specific Demethylase 1-Selective Inactivators // *J. Med. Chem. American Chemical Society*, 2016. Vol. 59, № 4. P. 1531–1544.

131. Sharma S.K. et al. (Bis)urea and (Bis)thiourea Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1 as Epigenetic Modulators // *J. Med. Chem. American Chemical Society*, 2010. Vol. 53, № 14. P. 5197–5212.

132. Huang Z. et al. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1/KDM1A) Contributes to

Colorectal Tumorigenesis via Activation of the Wnt/B-Catenin Pathway by Down-Regulating Dickkopf-1 (DKK1) // PLoS One / ed. Samant R. 2013. Vol. 8, № 7. P. e70077.

133. Yang C. et al. A Rhodium(III)-Based Inhibitor of Lysine-Specific Histone Demethylase 1 as an Epigenetic Modulator in Prostate Cancer Cells // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2017. Vol. 60, № 6. P. 2597–2603.

134. Wang J. et al. Novel Histone Demethylase LSD1 Inhibitors Selectively Target Cancer Cells with Pluripotent Stem Cell Properties // Cancer Res. 2011. Vol. 71, № 23. P. 7238–7249.

135. McGrath J.P. et al. Pharmacological Inhibition of the Histone Lysine Demethylase KDM1A Suppresses the Growth of Multiple Acute Myeloid Leukemia Subtypes // Cancer Res. American Association for Cancer Research, 2016. Vol. 76, № 7. P. 1975–1988.

136. Mould D.P. et al. Reversible Inhibitors of LSD1 as Therapeutic Agents in Acute Myeloid Leukemia: Clinical Significance and Progress to Date // Med. Res. Rev. John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 35, № 3. P. 586–618.

137. Hitchin J.R. et al. Development and evaluation of selective, reversible LSD1 inhibitors derived from fragments // Medchemcomm. The Royal Society of Chemistry, 2013. Vol. 4, № 11. P. 1513.

138. Theisen E.R. et al. Reversible inhibition of lysine specific demethylase 1 is a novel anti-tumor strategy for poorly differentiated endometrial carcinoma // BMC Cancer. BioMed Central, 2014. Vol. 14, № 1. P. 752.

139. Sankar S. et al. Reversible LSD1 Inhibition Interferes with Global EWS/ETS Transcriptional Activity and Impedes Ewing Sarcoma Tumor Growth // Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research, 2014. Vol. 20, № 17. P. 4584–4597.

140. Yang G.-J. et al. Identification of a rhodium(iii) complex as a Wee1 inhibitor against *TP53* -mutated triple-negative breast cancer cells // Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 54, № 20. P. 2463–2466.

141. Yang G.-J. et al. Selective Inhibition of Lysine-Specific Demethylase 5A (KDM5A) Using a Rhodium(III) Complex for Triple-Negative Breast Cancer Therapy // Angew. Chemie Int. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 57, № 40. P. 13091–13095.

142. Leung C.-H. et al. Metal complexes as potential modulators of inflammatory and autoimmune responses // Chem. Sci. The Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 6, № 2. P. 871–884.

143. Leung C.-H. et al. Metal complexes as inhibitors of transcription factor activity // Coord. Chem. Rev. Elsevier, 2013. Vol. 257, № 21–22. P. 3139–3151.

144. Liu L.-J. et al. An Iridium(III) Complex Inhibits JMJD2 Activities and Acts as a

Potential Epigenetic Modulator // *J. Med. Chem.* 2015. Vol. 58, № 16. P. 6697–6703.

145. Duan Y.-C. et al. Design and synthesis of tranylecypromine derivatives as novel LSD1/HDACs dual inhibitors for cancer treatment // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson*, 2017. Vol. 140. P. 392–402.

146. Sheng W. et al. LSD1 Ablation Stimulates Anti-tumor Immunity and Enables Checkpoint Blockade. // *Cell. Elsevier*, 2018. Vol. 174, № 3. P. 549-563.e19.

147. Wen S. et al. Novel combination of histone methylation modulators with therapeutic synergy against acute myeloid leukemia in vitro and in vivo // *Cancer Lett.* 2018. Vol. 413. P. 35–45.

148. Dent S.Y., Chandra J. The lasting influence of LSD1 in the blood // *Elife.* 2013. Vol. 2.

149. Feng Z. et al. Pharmacological inhibition of LSD1 for the treatment of MLL-rearranged leukemia // *J. Hematol. Oncol. BioMed Central*, 2016. Vol. 9, № 1. P. 24.

150. Lee M.G. et al. Histone H3 Lysine 4 Demethylation Is a Target of Nonselective Antidepressive Medications // *Chem. Biol. Cell Press*, 2006. Vol. 13, № 6. P. 563–567.