

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

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

## ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Клеточная проницаемость молекул, ориентированных на протеолиз cerebrона

Обучающийся

Т.Д.Сакович

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

д.х.н., профессор, О.Б.Григорьева

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

к.х.н., директор ЦМХ, А.С.Бунев

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Тольятти 2023

## Аннотация

Целью данной работы является исследование стабильности новых лигандов CRBN и клеточной проницаемости химерных молекул, направленных на протеолиз (PROTAC). Изучение фармакокинетических параметров создаст мощный фундамент для дальнейших исследований, направленных на разработку молекул PROTAC, которые ведутся в Центре медицинской химии.

Объектами исследования являются производные фталимида, которые потенциально могут использоваться в качестве новых лигандов CRBN, и молекулы PROTAC. Поскольку предпочтительным является пероральный прием лекарственных препаратов, одними из ключевых критериев для прогнозирования ADMET-характеристик являются стабильность и клеточная проницаемость.

В литературном обзоре изложены основные принципы целенаправленной деградации белка, а также описаны ADMET-характеристики и важность их прогнозирования и обобщены основные методы экспериментального определения клеточной проницаемости.

Во второй части приведен анализ предварительных результатов исследований стабильности и полноценных исследований в фосфатном буферном растворе, а также представлены результаты по клеточной проницаемости молекул PROTAC.

По результатам проведенных экспериментов, новые лиганды CRBN с алкильными заместителями гидролизуются быстрее, чем соединения, имеющие арильные заместители. Результаты клеточной проницаемости показывают, что молекулы PROTAC обладают низкими значениями проницаемости. Данные вывод будут использованы в дальнейших исследованиях.

Работа изложена на 70 страницах и содержит 46 рисунков. Список литературы включает в себя 56 источников.

## Abstract

The title of the graduation work is «Cell permeability of molecules oriented to cereblon proteolysis».

The graduation work consists of an explanatory note, an introduction, three parts on 70 pages, 46 figures, the list of 56 references including foreign sources.

The aim of this graduate work is to study the stability of new CRBN ligands and cell permeability of chimeric molecules targeted for proteolysis (PROTAC).

The objects of study are phthalimide derivatives, which can potentially be used as new CRBN ligands, and PROTAC molecules.

The subject of the study is the Caco-2 model for determining cell permeability.

The first part outlines the basic principles of targeted protein degradation, describes the ADMET characteristics and the importance of their prediction, and summarizes the main methods for the experimental determination of cell permeability.

The second part analyzes the preliminary results of stability studies and full-fledged studies in phosphate buffer solution, and also presents the results on the cell permeability of PROTAC molecules.

The third part consists of methods of biological experiments, characteristic data on each compound.

On the basis of the results obtained, it can be concluded that the PROTAC molecules have unsatisfactory chemical and physical properties. However, these results can be used in further studies aimed at the development of PROTAC.

## Содержание

Определения, обозначения и сокращения .....	5
Введение.....	7
1 Литературный обзор .....	9
1.1 Целенаправленная деградация белка как новая фармакологическая стратегия.....	9
1.2 Основные направления молекулярного дизайна PROTAC .....	12
1.3 Характеристики ADMET в разработках PROTAC .....	18
1.4 Методы измерения клеточной проницаемости.....	28
1.5 Важность прогнозирования ADMET-характеристик.....	32
2 Результаты и их обсуждения .....	35
2.1 Оценка стабильности новых лигандов CRBN .....	35
2.2 Исследование проницаемости молекул PROTAC .....	45
3 Экспериментальная часть.....	49
3.1 Реагенты и оборудование.....	49
3.2 Биологический эксперимент.....	50
Заключение .....	53
Список используемой литературы .....	54
Приложение А Хроматограммы лигандов CRBN .....	60
Приложение Б Предварительное исследование стабильности лигандов CRBN.....	62
Приложение В Хроматограммы молекул PROTAC .....	64
Приложение Г Исследование проницаемости молекул PROTAC .....	65

## Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями.

AB-MPS	Многопараметрическая оценочная функция
AML	Острый миелоидный лейкоз
AR	Рецептор андрогена
BET	Бromo- и экстратерминальные домены
bRo5	За пределами правила пяти
CRBN	Цереблон
DHT	Дигидрокситестостерон
ER	Рецептор эстрогена
HBA	Акцептор водородной связи
HBD	Донор водородной связи
HIF 1 $\alpha$	Фактор, индуцируемый гипоксией 1 $\alpha$
IAP	Ингибитор белков апоптоза
I $\kappa$ B $\alpha$	Ингибитор усилителя гена легкого полипептида каппа в В-клетках
IMHB	Внутримолекулярная водородная связь
JQ1	Ингибитор белков семейства BET
LPE	Эффективность липофильной проницаемости
MDM2	Гомолог мышинной двойной минуты 2
MDCK	Клетки Мадин-Дарби почки собаки
MetAP-2	Метионаминопептидаза-2
MetIDS	Эксперименты по идентификации метаболитов
MLM	Микросомы печени мыши
nRotB	Количество вращающихся связей

PAMPA	Параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны
POI	Лиганд целевого белка
PROTAC	Химерная молекула, нацеленная на протеолиз
PSA	Полярная площадь поверхности
QSAR	Количественная зависимость структура-активность
QSPR	Количественная зависимость структура-свойства
RIPK2	Серин-треониновая протеинкиназа 2
Ro5	Правило пяти
SMI	Низкомолекулярный ингибитор
SCF	Комплекс Skp-1-Cullin-F
TEER	Трансэпителиальное электрическое сопротивление
$\beta$ -TrCP	$\beta$ -трансдуциновый повтор
UPS	Убиквитин-протеасомная система
VHL	Супрессор опухолей фон Гиппеля-Линдау

## Введение

Химиотерапия, традиционный метод лечения, играет важную роль в процессе лечения раковых опухолей. Однако основными недостатками противоопухолевых препаратов являются низкая селективность и высокая вероятность развития лекарственной устойчивости. Как результат, внимание фармакологов привлекла таргетная терапия рака.

В последние десятилетия большой интерес вызывают новые стратегии, направленные на деградацию белков, опосредующих опухолевую активность. Концепция PROTAC основана на конструировании низкомолекулярных бифункциональных структур, которые обладают высоким сродством к мишеням и связываются с убиквитинлигазами. Такие конъюгаты опосредуют транспорт надмолекулярного комплекса к протеасоме и расщепляют специфические эндогенные белки [1].

Ввиду интереса к терапевтическому действию молекул PROTAC, очевидно, что существует необходимость в детальном изучении их физико-химических свойств. Учитывая их высокую молекулярную массу и наличие нескольких доноров (HBD) и акцепторов (HBA) водородной связи, можно предположить их низкую клеточную проницаемость. PROTAC находится в химическом пространстве «за пределами правила пяти». Следовательно, низкая клеточная проницаемость и другие фармакокинетические недостатки молекулы могут препятствовать абсорбированию при пероральном приеме и связыванию со своей мишенью. PROTAC на основе лигандов CRBN занимает химическое пространство, которое частично перекрывается с пространством «правила пяти» [22], тогда как на основе VHL и других лигандов E3-лигаз занимают более отдаленное пространство. Это, возможно, и объясняет тот факт, что в клинических исследованиях в большинстве используют именно PROTAC на основе CRBN.

Для оценки кишечной проницаемости лекарственных препаратов

успешно применяются клетки карциномы кишечника Caco-2, которые морфологически и функционально схожи с барьерным эпителием кишечника [45].

Целью представленной работы является исследование стабильности новых лигандов CRBN и клеточной проницаемости химерных молекул, направленных на протеолиз (PROTAC).

В соответствии с обозначенной целью в данной работе поставлены следующие задачи:

- Провести предварительное исследование стабильности новых лигандов CRBN;
- Провести оценку стабильности лигандов CRBN в фосфатном буферном растворе и полной ростовой среде;
- Провести анализ клеточной проницаемости с использованием монослоя клеток Caco-2;
- Определить значения коэффициента кажущейся проницаемости молекул PROTAC с использованием метода ВЭЖХ.



# 1 Литературный обзор

## 1.1 Целенаправленная деградация белка как новая фармакологическая стратегия

Группа Raymond J. Deshaies разработала первый химерный молекулярно-направленный белковый деструктор (PROTAC), который захватывает убиквитин-протеасомную систему (UPS) для деградации белка [1].

Убиквитин-протеасомная система осуществляет убиквитинирование и деградацию различных белков, которые играют определенную роль в регуляции жизнедеятельности клеток [2]. Убиквитин активируется посредством АТФ-зависимой реакции, опосредованной убиквитин-активирующим ферментом E1. Активированный убиквитин переносится на убиквитин-связывающий фермент E2. Затем убиквитинлигаза E3, которая распознает и рекрутирует белок-мишень, катализирует перенос убиквитина от E2 к белку путем ковалентного связывания убиквитина с остатком лизина субстрата. Полиубиквитинированный субстрат распознается и расщепляется протеасомой. На рисунке 1 показана схема убиквитин-протеасомной деградации.

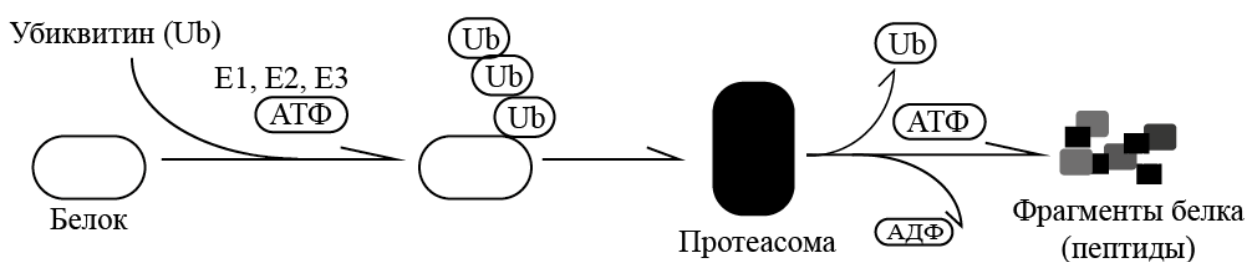


Рисунок 1 – Схема протеасомной деградации белка

В настоящее время PROTAC привлекает все больше внимания из-за его потенциала в терапии рака. Химерная молекула, нацеленная на протеолиз

(PROTAC), индуцирует внутриклеточную деградацию целевого белка посредством UPS. Впоследствии разработан целый ряд PROTAC для разрушения белков, способствующих развитию заболеваний, таких как рецептор эстрогена (ER), рецептор андрогена (AR) и других [3].

PROTAC представляет собой бифункциональную молекулу, состоящую из трех ковалентно-связанных фрагментов – лиганда целевого белка (POI), лиганда фермента убикитинлигазы E3 и линкера для конъюгации двух лигандов. Такая комбинированная молекула одновременно рекрутирует лигазу E3 и POI, образуя тройной комплекс с POI и E3 и обеспечивая убикитинирование POI и последующую деградацию белка-мишени протеасомой [4].

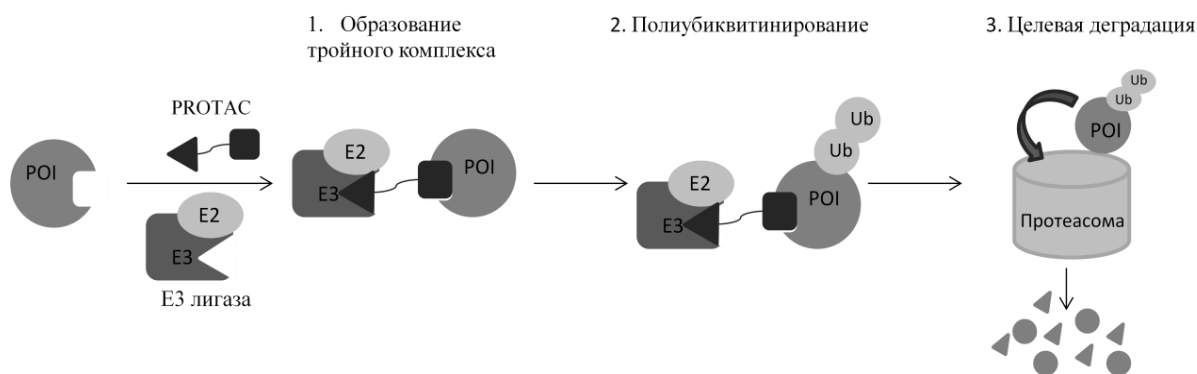


Рисунок 2 – Схема PROTAC-опосредованного убикитинирования и протеасомной деградации POI

Убиквитин связывается с белковым субстратом через ферментативный каскад. Сначала активирующий фермент E1 иницирует убиквитин в АТФ-зависимого механизме с образованием убиквитиновой связи E1 (тиоэфирная связь), затем следует реакция переноса с ферментом, связывающим E2, с образованием убиквитиновой связи E2. Одна из лигаз E3 опосредует перенос убиквитина на белок-субстрат [5].

Как только молекула PROTAC связывает белок-мишень и E3-лигазу вместе, она образует тройной комплекс, который индуцирует убикитиниро-

вание E3 лигазой белка-мишени для процесса деградации [6]. Убиквитинированные целевые белки распознаются и расщепляются протеасомой 26S (рисунок 2).

Благодаря наличию E3-лигазы, PROTAC отличается от SMI тем, что выполняет свою функцию путем деградации, а не ингибирования целевого белка, что дает значительное преимущество PROTAC перед SMI в преодолении резистентности, вызванной мутациями и сверхэкспрессией мишени [6]. Кроме того, молекула PROTAC диссоциирует после индуцирования полиубиквитинирования целевого белка, и следовательно, действуя каталитически и потенциально вызывая лекарственное действие при очень низких дозах [7]. Таким образом, вышеперечисленные характеристики PROTAC позволяют ему преодолеть потенциальную резистентность к существующей терапии.

Информация о структуре тройного комплекса в настоящее время позволяет более осознанно продвинуться в области рационального дизайна PROTAC. Разработка этих деструкторов предполагает знания не только о том, как их структура влияет на свойства ADMET, но и какая проницаемость клеток требуется для их способа действия. В настоящее время несколько исследований начали давать некоторое представление о том, как можно оптимизировать характеристики ADMET PROTAC.

Физико-химические свойства PROTAC не соответствуют правилу пяти Липински из-за их буфункциональной природы и относятся к классу соединений «вне правил пяти» (bRo5), поскольку проявляют высокую специфичность, эффективность и большую продолжительность действия [8]. Они также считаются молекулами с неблагоприятной фармакокинетикой, главным образом, по причине того, что они имеют высокую молекулярную массу и, как правило, низкую растворимость и сниженную проницаемость [9].

Понимая, что небольшие структурные изменения способны изменять фармакокинетические свойства препаратов, необходимо изучить эти особенности, чтобы понять, как соединения в bRo5 могут быть адаптированы для

преодоления проблем, связанных с размером, и как эти стратегии могут быть использованы в области исследований PROTAC [9].

Кроме того, при разработке важную роль играет проницаемость. В соответствии с литературными данными, по мере увеличения размера определенных молекул их способность проникать через искусственные имитации мембран в среднем снижалась [10]. Из-за своего большого размера PROTAC имеют значительную тенденцию к образованию соединений с низкой проницаемостью.

Наконец, на данный момент встает вопрос о дизайне лекарств на основе свойств в химическом пространстве  $bR_05$ . Дизайн лекарств на основе свойств (или дизайн молекулярных свойств) является подходом к оптимизации лекарств-кандидатов путем модуляции молекулярных свойств на раннем этапе открытия препарата. Это включает в себя эмпирическую комбинацию набора физико-химических свойств, и наиболее широко известными правилами, которыми руководствуются при синтезе оптимальных соединений-кандидатов, являются правило пяти ( $R_05$ ) [8].

Оптимизация физико-химических свойств до разумных критериев будет способствовать разработке лучших пероральных лекарственных средств, от которых можно ожидать приемлемых профилей ADMET.

## **1.2 Основные направления молекулярного дизайна PROTAC**

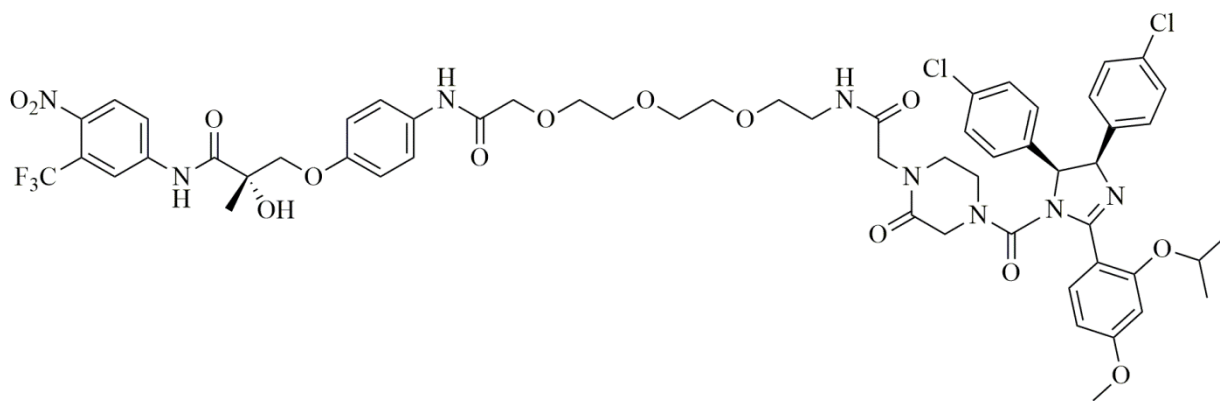
Низкомолекулярные ингибиторы (SMI) были приняты в качестве широко используемой терапевтической стратегии для лечения злокачественных опухолей. Однако у большинства целевых белков отсутствуют активные центры для SMI, что стало значительным затруднением в их дизайне и разработке. Именно поэтому в последние годы химерные молекулы, направленные на протеолиз (PROTAC) и связанные с новыми методами деградации, представили дополнительные подходы к воздействию на эти белки.

В 2001 году группой Crews и Deshaies был разработан PROTAC первого поколения на основе пептида, также называемый как PROTAC-1, но его низкая клеточная проницаемость и химическая стабильность ограничили его клиническое применение [1]. Он состоял из лиганда овалицина, который связывается с белком-мишенью метионинаминопептидазы-2 (MetAP-2), соединенным алкильным линкером с фосфопептидом IкВ $\alpha$ , который в свою очередь распознается Skp-1-Cullin-F (SCF). PROTAC-1 был способен рекрутировать MetAP-2 к SCF  $\beta$ -TrCP для полиубиквитинирования и последующей протеасомной деградации. Основываясь на этом подходе, дополнительно синтезирован PROTAC на основе эстрадиола, который способствует деградации  $\alpha$ -рецептора эстрогена (ER $\alpha$ ) и дигидрокситестостерона (DHT) для деградации рецептора андрогена (AR) [11]. Но эти соединения имели очень высокую молекулярную массу и плохую клеточную проницаемость, что и ограничивало их терапевтическую область.

Второе поколение PROTACs было основано на малых молекулах и использовались MDM2, ингибитор белков апоптоза (IAP), супрессор опухолей фон Гиппеля-Линдау (VHL) и Cereblon (CRBN) в качестве лигазы E3.

Дальнейшие исследования были направлены на оптимизацию химерных молекул, и с этой целью группа Craig M. Crew уже в 2008 году получила один PROTAC с двумя небольшими молекулами (рисунок 3). Это усовершенствование было основано на другой E3-лигазе, человеческой мышинной минуте 2 (MDM2) [12]. Недавно идентифицированный класс производных имидазолина, называемый нутлинами, может связываться с MDM2. После обработки клеток HeLa наблюдалось снижение уровня андрогенового рецептора и его последующей деградации протеасомой.

Это первый бифункциональный полностью низкомолекулярный PROTAC представляет собой важную веху в разработке PROTACs. Он способствует убиквитинированию и деградации AR в UPS-зависимой форме.

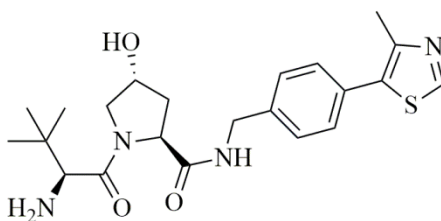


1

Рисунок 3 – Первый низкомолекулярный PROTAC, включающий лиганд MDM2 нутлин-3

На следующем этапе значительные усилия были направлены на разработку мощных малых молекул, которые бы связывались с убиквитинлигазой E3 фон Хиппеля-Ландау (VHL) и разрушали их взаимодействие с  $\alpha$ -субъединицей индуцируемого гипоксией фактора 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ).

В 2012 году Dennis L. Buckley и др. [13] синтезировали серию низкомолекулярных лигандов VHL на основе гидроксипролина. Дальнейшая оптимизация малых молекул привела к синтезу лигандов VHL (рисунок 4) с улучшенными аффинностью и липофильностью [14].



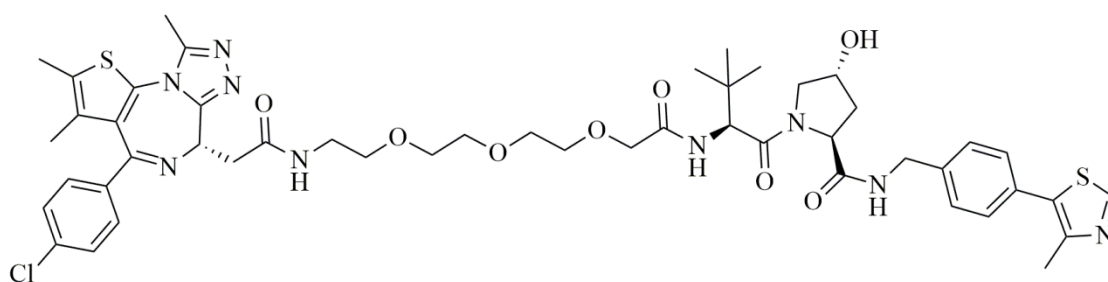
2

Рисунок 4 – Низкомолекулярный лиганд VHL

Однако соединения характеризовались плохими физико-химическими свойствами, такими как низкая внутриклеточная стабильность и проникае-

мость, что ограничивало их потенциал для применения в качестве химических зондов и для терапевтических разработок.

О разработке первых мощных низкомолекулярных PROTAC на основе VHL было сообщено позже [15]. PROTAC были созданы для двух целевых белков:  $\alpha$ -рецептор, связанный с эстрогеном и серин-треониновая киназа 2 (RIPK2). Этот успех был также продемонстрирован эффективной и избирательной деградацией BRD4, одного из факторов транскрипции семейства бромо- и экстра терминальных (BET) доменов, с помощью подхода PROTAC [16], используя JQ1 в качестве боеголовки для соединения с лигандом VHL. Полученное соединение MZ1 (рисунок 5) обладало повышенной селективностью по отношению к BRD4 по сравнению с BRD2 и BRD3.



MZ1

3

Рисунок 5 – Структура ингибитора BET-бромодоменов MZ1

Разработка PROTAC на основе CRBN появилась почти сразу после идентификации талидомида и его аналогов в качестве лигандов для E3-лигазы CRBN [17]. Ранними примерами были dBET1 и ARV-825, которые избирательно разрушали BRD4.

Первый получали с использованием лиганда BRD4 JQ1 в сочетании с талидомидом [18]. Согласно результатам исследования, dBET1 (рисунок 6) индуцировал деградацию BRD4 при низких концентрациях в клетках острого

миелоидного лейкоза (AML) по сравнению с эффектом JQ1. Кроме того, dBET1 также индуцировал деградацию других членов семейства BET, например, BRD2 и BRD3.

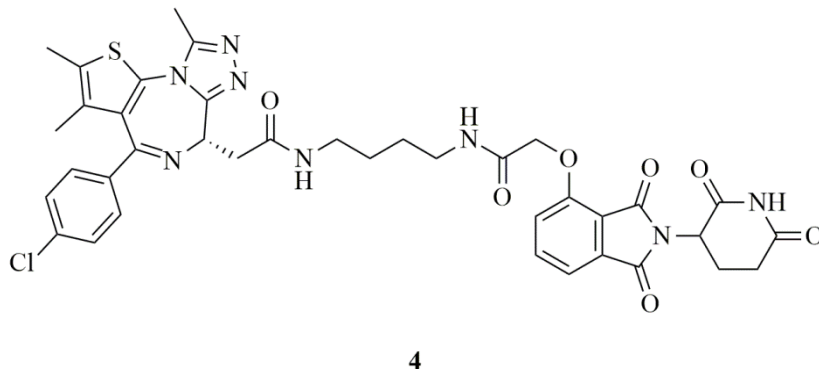


Рисунок 6 – Структура PROTAC dBET1

Параллельно была разработана молекула ARV-825 (рисунок 7), состоящая из связывающего BRD4 фрагмента класса триазолодизепинацетамида (OTX015) и помалидомида, связывающего фрагмента CRBN, и гибкого PEG-линкера [19].

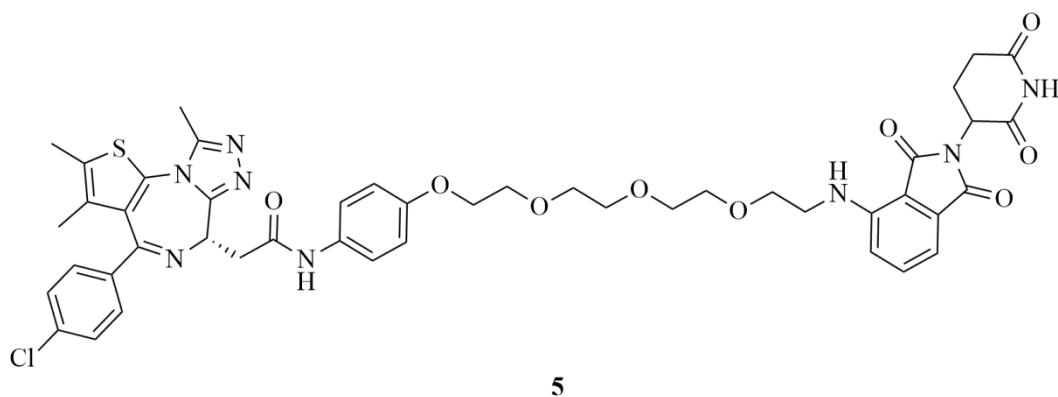


Рисунок 7 – Структура PROTAC ARV-825

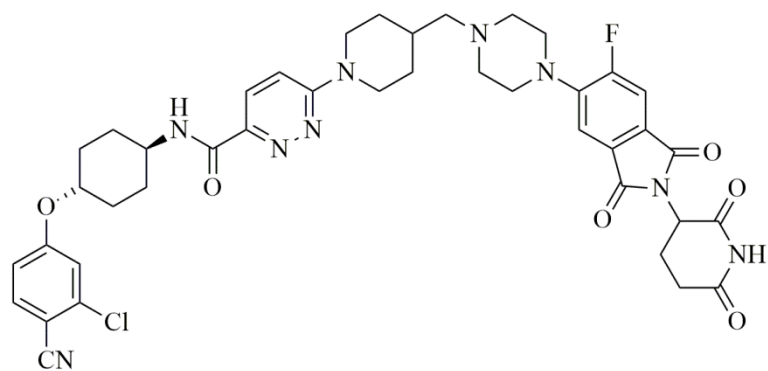
Было обнаружено, что ARV-825 индуцирует почти полную деградацию



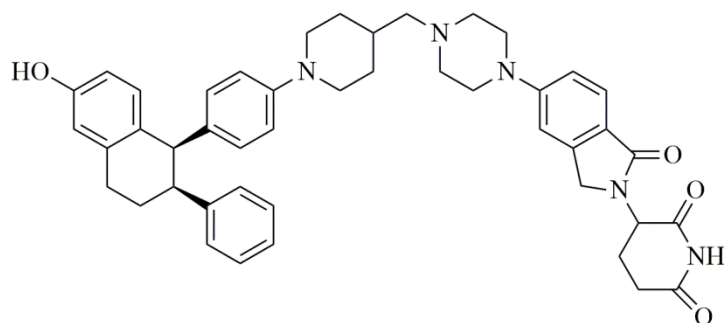
BRD4, а также превосходство ARV-825 над ингибиторами BRD4 JQ1 и OTX015 в отношении подавления пролиферации и индукции апоптоза.

Интерес вызывает тот факт, что хотя ARV-825 структурно схож с dBET1, он несколько раз более эффективен в отношении индуцирования деградации BRD4. Связано ли это с наличием фенильного кольца в ARV-825 или другими структурными аспектами линкера, требует дальнейшего изучения путем обширных исследований по оптимизации линкера.

На данный момент первым прошедшим клинические испытания I фазы PROTAC был ARV-110 **6** (рисунок 8), разработанный компанией Arvinas, перорально биодоступный деструктор, нацеленный на рецепторы андрогена (AR) [20, 21]. Структурно молекула ARV-110 состоит из специфического Ар-лиганда и E3 CRBN лиганда. Предварительные результаты клинических испытаний I фазы показали, что удовлетворительную безопасность и эффективность. Согласно данным Arvinas, ARV-110 полностью разрушает AR во всех протестированных клеточных линиях *in vivo*. В настоящее время препарат проходит II фазу клинических испытаний.



6



7

Рисунок 8 – Структура двух молекул PROTAC, которые прошли клинические испытания, ARV-110 **6** и ARV-471 **7**

Соединение ARV-471 **7** (рисунок 8) еще один клинический деструктор Arvinas, который нацелен на рецепторы эстрогена для лечения рака молочной железы [21]. Открыт после детального отбора и оптимизации с использованием нескольких лигандов E3-лигазы, антагонистов ER и линкеров.

### 1.3 Характеристики ADMET в разработках PROTAC

Впервые опубликованные в 2001 году PROTAC в настоящее время признаны в качестве подхода к поиску лекарств, а первые образцы внедряются в клиническую практику. Однако, несмотря на растущий интерес к ним как терапевтическому средству и увеличение активности, данные об их характеристиках абсорбции, распределения, метаболизма и выведения (ADME)

только начинают появляться.

### 1.3.1 Абсорбция

Поскольку молекула PROTAC имеет высокую молекулярную массу, ее физико-химические свойства неизменно будут находиться в химическом пространстве за пределами правила пяти Липински (bRo5).

При низком уровне метаболизма в кишечнике и печени пероральная биодоступность зависит в первую очередь от скорости всасывания, а правила Ro5 предназначены для разработки дескриптора для прогнозирования абсорбции препарата [22]. В недавнем исследовании DeGoeu и др. [23] определили рассчитанный показатель многопараметрической оценочной функции АВ-MPS, который предсказывает абсорбцию при пероральном приеме и рассчитывается по формуле 1:

$$\text{AB-MPS} = |(c\text{LogD} - 3) + \text{NAR} + \text{NRB}| \quad (1)$$

где cLogD – расчетный коэффициент распределения, используемый для расчета липофильности ионизируемых соединений;  
NAR – количество ароматических колец;  
NRB – количество вращающихся связей.

Чем ниже показатель АВ-MPS, тем больше вероятность абсорбции соединения, и при значении  $\leq 14$  вероятна более высокая пероральная абсорбция.

В настоящее время исследования *in vivo* PROTAC проводились только при парентеральном [24], а не пероральном введении. Возможность введения PROTAC пероральным путем повысила бы привлекательность данного подхода в качестве терапевтического средства.

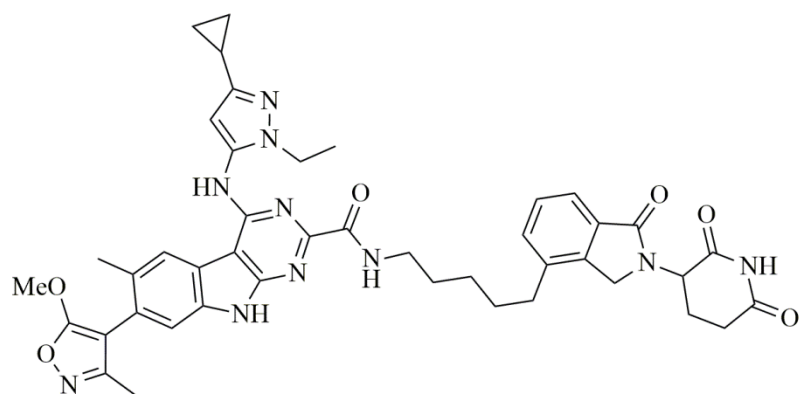
Для изучения потенциала PROTAC в пероральной биодоступности Edmondson и др. [22] проанализировали серию из 38 молекул PROTAC и оценили их физико-химические свойства, связанные с абсорбцией, включая молекулярную массу (MW), липофильность (cLogD, cLogP), доноры и акцепто-

ры водородных связей (HBD и HBA), количество вращающихся связей (nRotB), полярную площадь поверхности (PSA) и значения показателя АВ-MPS.

PROTAC на основе MDM2 и IAP обладают высокими показателями молекулярной массы, липофильности, площади полярной поверхности и АВ-MPS, что указывает на то, что абсорбция при пероральном введении для этих классов может быть затруднительна. Анализ характеристик VHL-PROTAC показывал удовлетворительные результаты, но по-прежнему имела место быть низкая вероятность перорального всасывания. PROTAC на основе CRBN наиболее близки к подходящему химическому пространству, что с большей вероятностью могут привести к перорально абсорбируемым соединениям. Их молекулярная масса может быть ниже 700, они обладают повышенной липофильностью и малым числом HBD и nRotB [22].

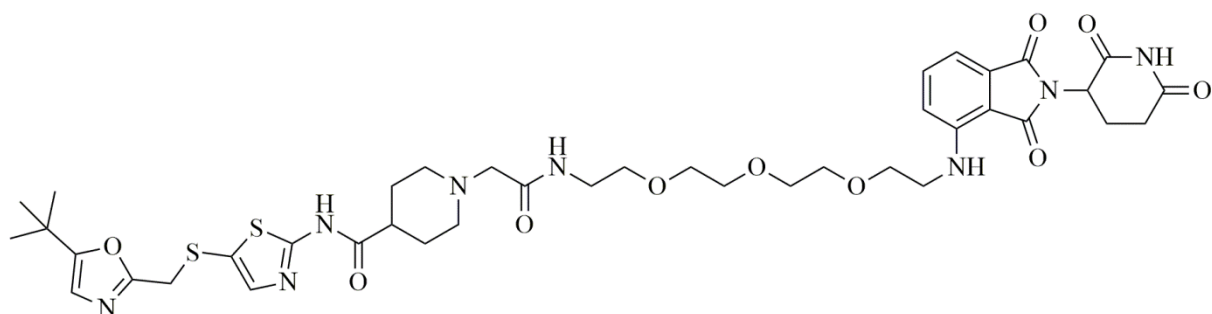
Соединения **8** и **9** на рисунке 9, например, в химическом пространстве с большей вероятностью приведут к перорально абсорбируемым соединениям, на что указывают их физико-химические свойства.

Однако все рассматриваемые серии PROTAC имеют высокие показатели nRotB и HBA, в основном из-за преобладания длинных PEG или алкильных линкеров.



MW	696
cLogP	3.9
HBD	1
HBA	11
PSA	117
nRotB	10
AB-MPS	15.5

8



MW	614
cLogP	4.4
HBD	3
HBA	12
PSA	167
nRotB	14
AB-MPS	17.4

9

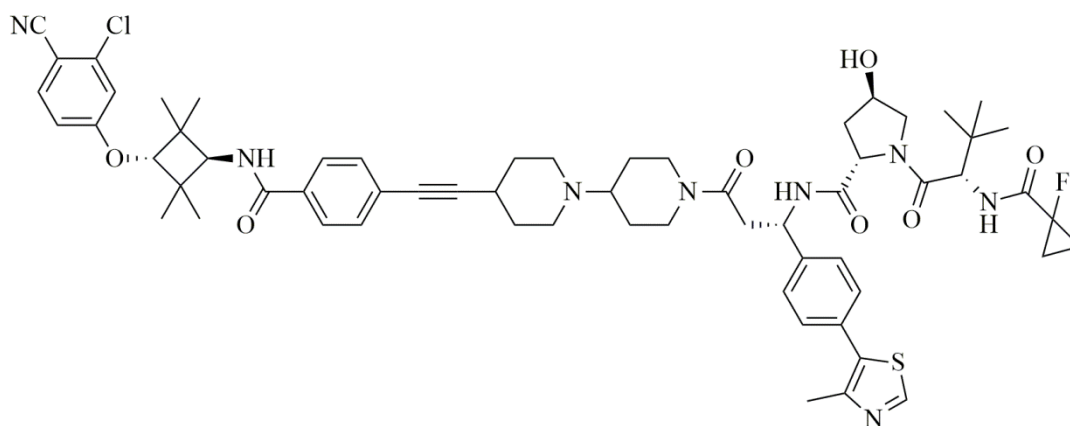
Рисунок 9 – Структура PROTAC на основе CRBN и их физико-химические характеристики

### 1.3.1.1 Растворимость

Растворимость является еще одним параметром, который существенно влияет на процесс абсорбции через кишечник. В целом, минимальная растворимость, необходимая для соединения, строго зависит от его проницаемости

и дозировки. Высокопроницаемые соединения требуют меньшей растворимости, чем соединения с низкой проницаемостью, для максимальной абсорбции при пероральном введении.

Для соединений с высокой молекулярной массой, но, как правило, с низкой проницаемостью, необходимо сосредоточиться на показателях растворимости на ранней стадии разработки лекарственных препаратов, чтобы обеспечить эффективность в доклинических исследованиях и при пероральном введении. Кроме того, для PROTAC плохая растворимость в различных анализах *in vitro* приводит к осаждению соединений и более низким концентрациям в растворе [25]. Ранее уже сообщалось, что талидомид лиганда CRBN имеет низкую растворимость при различных pH, что, вероятно, может добавить соответствующие проблемы с растворимостью к PROTAC.



ARD-69

10

Рисунок 10 – Структура PROTAC ARD-69

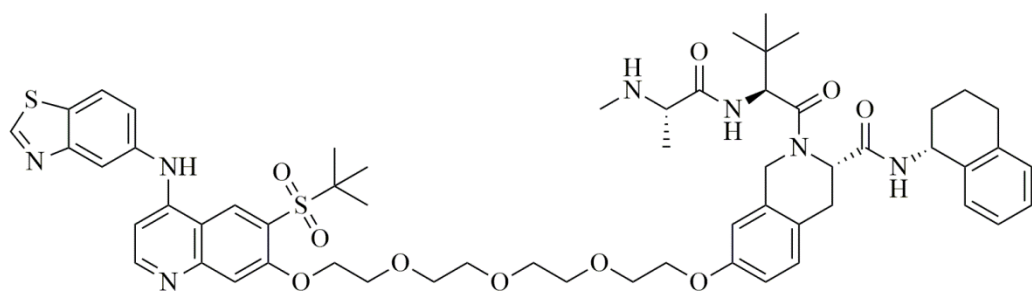
Химическая модификация линкера является самым простым способом оптимизации растворимости PROTAC. Алкильные и эфирные линкеры заменяются мотивами, которые могут придавать некоторую жесткость, такими как гетероциклические каркасы и алкины, в дополнение к содержанию функ-

циональных групп, которые способны модулировать физико-химические свойства молекулы.

Так, например, в недавнем своем исследовании Xin Nan и др. [26] разработали эффективный AR-деструктор ADR-69 (рисунок 10). Они показали, включение гетероциклических фрагментов, таких как пиридин или пиперазин, в алкильные линкеры, значительно улучшает растворимость их соединений.

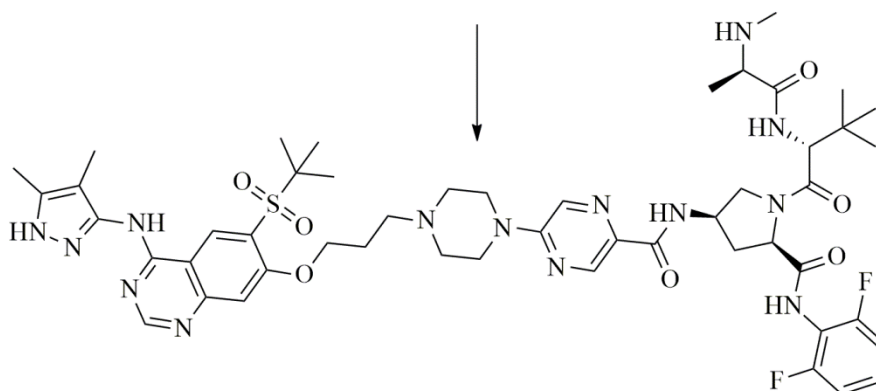
Однако следует отметить, что более жесткий линкер, включающий в себя гетероциклические фрагменты, способен препятствовать образованию тройного комплекса, что в свою очередь отрицательно влияет на биологическую активность деградирующего агента.

Mares и другие [27] разработали мощный PROTAC на основе IAP **11** и содержащий PEG-линкер для деградации RIPK2 (рисунок 11). Однако клиренс в микросомах печени человека и крысы был высоким (29 и 11 мл/мин/г, соответственно) и также низкая растворимость ограничивали его использование в качестве молекулы *in vivo*. Дальнейшая его оптимизация путем замены пиразолом бензотиазольного кольца в боеголовке, замена точки присоединения линкеров и включение пиперазиновых и пиримидиновых фрагментов в линкер привела к уменьшению липофильности. Полученный PROTAC **12** демонстрировал гораздо более низкий метаболический клиренс (<0.8 и <0.45 мл/мин/г печени в гепатоцитах крысы и человека) и улучшенную растворимость при сохранении высокой активности **12** ( $pDC_{50} = 9.4$ ).



$pCD_{50} = 7.9$   
 $LogD = 6.1$   
 $CL_{int} (rat/human mic) = 11/29 \text{ mL/min/g}$

11



$pCD_{50} = 9.4$   
 $LogD = 3.6$   
 $CL_{int} (rat/human mic) = < 0.8 / < 0.45 \text{ mL/min/g}$

12

Рисунок 11 – Структура PROTAC на основе IAP и его модифицированный аналог с улучшенными физико-химическими свойствами

### 1.3.1.2 Кишечная проницаемость

В недавней работе [28] были представлены результаты пассивной проницаемости PROTAC на основе VHL с использованием метода PAMPA и эффективности липофильной проницаемости (LPE). Сочетание PAMPA и LPE дает представление о взаимосвязи структурных изменений и проницаемости PROTAC. Показано, что из двух серий соединений, AT и MZ (рисунок 12), которые отличаются только связью между линкером и лигандом VH032,



соединения MZ значительно проницаемы, чем их аналоги AT. По результатам, замена амида *tert*-Leu-NH **13-14** на пеницилламиновую группу **15-16** подвергает воздействию растворителя NH-группы лиганда VHL вблизи точек присоединения линкера, что способствует снижению проницаемости.

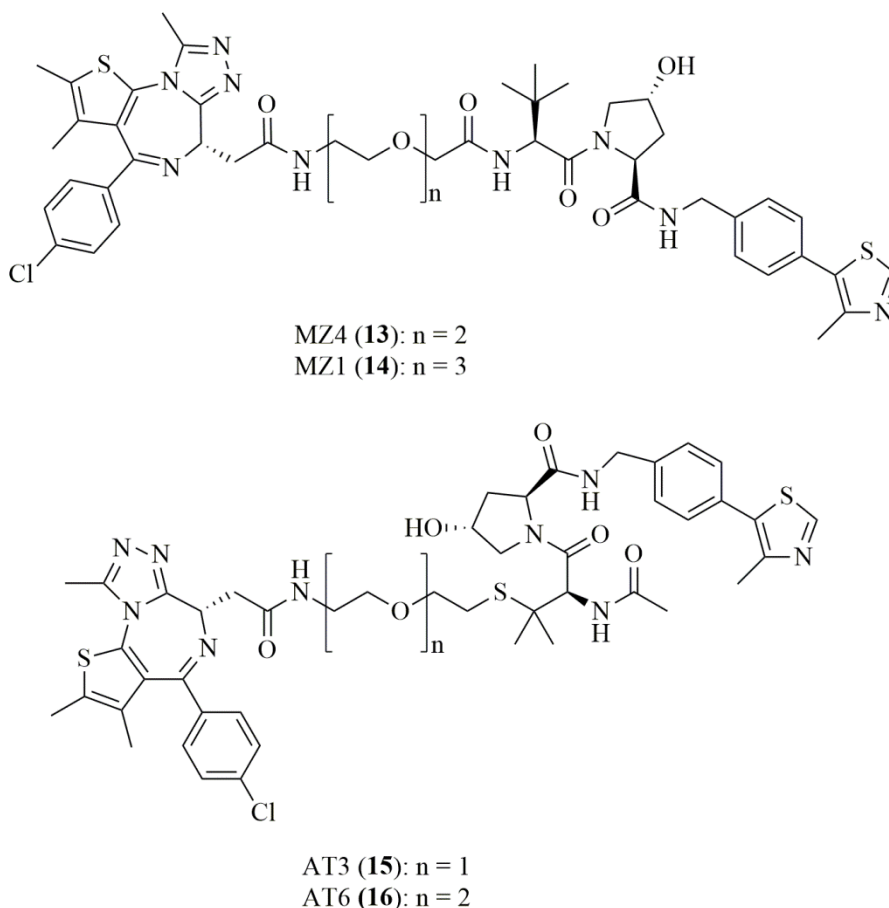


Рисунок 12 – Структура серий соединений MZ и AT

Следовательно, снижение количества открытых НВД, подверженных воздействию растворителя, путем защиты амида *tert*-Leu-NH боковой цепью *tert*-Leu и внутримолекулярной водородной связью (IMHB), или экранирования полярности NH-группы в зависимости от растворителя (увеличение стерических затруднений) являются мощными стратегиями для улучшения проницаемости соединения.

Также отмечалось, что помимо замены на сложноэфирную группу, с проницаемостью снижалась и с уменьшением длины линкера. Все исследуемые соединения с более короткими PEG-линкерами имели более высокие значения LPE, что предполагает эффективное проникновение через мембрану.

Кроме того, PROTAC достигали наилучшей проницаемости при умеренных значениях липофильности в диапазоне от 3 до 5 и в пределах этого диапазона увеличение липофильности соединения приводит к повышенной проницаемости [29].

Однако другие исследования [30] не обнаружили взаимосвязи между клеточной проницаемостью и показателями липофильности или проницаемостью PAMPA, указывая на необходимость лучшего понимания того, как анализы *in vitro* могут быть использованы для оптимизации ADMET-характеристик.

Конформационные изменения существенно влияют на свойства лекарственного препарата  $\nu\text{Ro5}$ . Поэтому было показано, что эти соединения способны скрывать полярные фрагменты в неполярных средах, тем самым повышая липофильность за счет снижения полярности [31]. Такое явление называется «молекулярной хамелеонностью», которое позволяет некоторым соединениям быть проницаемыми для мембран.

Это позволило предположить, что имеющие более гибкие линкеры молекулы PROTAC могут вести себя как хамелеоны и что это возможно достичь за счет увеличения вращающихся связей [32].

### 1.3.2 Распределение

Связывание с белками плазмы (PPB) коррелирует с липофильностью, поэтому следует ожидать, что PROTAC с повышенной липофильностью будут иметь очень низкую несвязанную фракцию ( $f_u$ ) [33]. Низкие значения  $f_u$  приводят к плохой экстраполяции *in vitro* и *in vivo*, что затрудняет прогнозирование внутреннего клиренса ( $Cl_{int}$ ) [34].

### 1.3.3 Метаболизм

Для повышения пероральной биодоступности улучшение метаболической стабильности является одной из стратегий, которую можно использовать в повышении успеха в разработке PROTAC.

Метаболическая стабильность определяется как восприимчивость химического соединения к биотрансформации и выражается периодом полураспада ( $t_{1/2}$ ) и внутренним клиренсом ( $Cl_{int}$ ) [35]. На основании этих данных могут быть рассчитаны фармакокинетические параметры, такие как биодоступность и период полувыведения *in vivo*.

Метаболически нестабильные соединения обладают плохими характеристиками ADME из-за относительно высоких значений  $Cl_{int}$  и низких значений  $t_{1/2}$ . По этой причине стратегии оптимизации метаболической стабильности лекарственных препаратов стали одной из наиболее сложных задач. Поиск слабых мест с помощью экспериментов по идентификации метаболитов (MetIDs) представляется наиболее эффективной стратегией по улучшению метаболической стабильности [36].

Метаболическая активность PROTAC мало обсуждается в литературе, и на данный момент опубликовано немного статей. В этой работе Zhou и другие оценили метаболизм I фазы в микросомах печени мыши (MLM) после 20 и 40 минут инкубации для одного PROTAC, который разрушает белки BET, используя талидомид в качестве лиганда для CRBN [37]. Основным обнаруженным метаболитом был продукт гидроксирования, причем местом трансформации, как предполагалось, был алкильный линкер.

В другом исследовании впервые проведен анализ метаболической стабильности серии молекул PROTAC в криоконсервированных гепатоцитах человека в различные моменты времени [38]. Были изучены как скорость метаболизма (значение периода полураспада), так и идентификация мягких участков, что позволило выделить общие тенденции метаболизма PROTAC. Результаты показывают, что линкер является наиболее уязвимым фрагмен-

том молекулы PROTAC.

Длина линкера также играет роль в метаболической стабильности. Это говорит о том, что PROTAC, содержащий короткий линкер, имеет меньше слабых мест участков и больше стерических препятствий для PROTAC, проникающих в каталитический сайт метаболизирующего фермента, что приводит к лучшей метаболической стабильности. Использование линкера с циклическими фрагментами, таких как пиперазин или триазол, может быть хорошей стратегией для повышения метаболической стабильности [38].

В целом, по результатам ясно, что более длинные линкеры повышают вероятность быстрого метаболизма деструкторов, но четкая тенденция к повышению метаболической активности PROTAC за счет модификации линкера отсутствует.

#### **1.3.4 Экскреция**

Процесс выведения PROTAC полностью не установлен. Для ограниченных исследований билиарный и почечная экскреция не были основными путями выведения из-за низкого значения  $f_u$  [33]. А отсутствие билиарного клиренса было неожиданным, учитывая высокую молекулярную массу PROTAC.

Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять полный процесс выведения PROTAC из организма.

### **1.4 Методы измерения клеточной проницаемости**

Существует три основные группы методов косвенного оценивания абсорбции соединений:

- *in situ* на тонком кишечнике животных [39];
- *in vitro* на монокультурах различных линий клеток [40];
- *in silico* путем компьютерного моделирования [41].

Методы *in situ* по изучению всасывания лекарственных препаратов в

кишечнике впервые были проведены в конце 1960-х годов, однако основная экспериментальная процедура была описана Fagerholm и другими многим позже [42].

Сегменты кишечника животных канюлируют, затем промывают изотоническим раствором и непрерывно перфузируют раствором препарата, рассчитывается количество лекарственного средства, которое извлекается из перфузата.

Эффективный коэффициент проницаемости рассчитывается по формуле 2:

$$P_{eff} = \frac{-Q_{in} \times \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)}{2\pi rL} \quad (2)$$

где  $Q_{in}$  – скорость потока перфузии, поступающей в сегмент кишечника;

$C_{out}$  – выходная концентрация соединения в перфузате, моль/л;

$C_{in}$  – входная концентрация соединения в перфузате, моль/л;

$2\pi rL$  – площадь поверхности массопереноса в сегменте кишечника, которая равна площади цилиндра с длиной  $L$  и радиусом  $r$ .

Следует отметить, что перфузионные системы не дают информацию о событиях на клеточном или мембранном уровне. Снижение концентрации лекарственного препарата в перфузате не всегда отражает скорость поступления этого препарата в сосудистую систему, особенно если происходит пре-системный метаболизм [43].

Для оценки проницаемости мембраны и активного транспорта через стенку кишечника на ранних стадиях разработки существует несколько экспериментальных моделей *in vitro* с высокой проницаемостью. Наиболее распространены являются параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны (РАМРА) [44] и скрининг клеточной проницаемости с использованием таких клеток, как Caco-2 [45] и MDCK [46].

РАМРА представляет собой модель простого двойного слоя фосфоли-

пидов, которая используется для измерения пассивной диффузии и которая демонстрирует высокую степень корреляции с проницаемостью *in vivo*. Впервые был описан Kansy [44], и согласно этому методу, фильтровальная пластина, покрытая искусственной мембраной, используется для разделения двух отсеков: один содержит буферный раствор с тестируемыми соединениями, также называемый как донорский отсек, другой – исходный буферный раствор, изначально свободный от тестируемого соединения, определяется как акцепторный отсек. На рисунке 13 представлена схема анализа РАМРА.

В начале анализа препарат вносится в донорский отсек. После периода инкубации, измеряют количество лекарственного средства в каждом из отделений. Баланс массы позволяет рассчитать количество препарата, оставшегося в мембране.

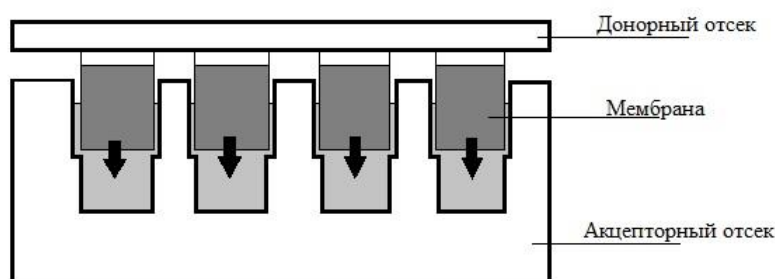


Рисунок 13 – Схематическое изображение анализа РАМРА

Исследования РАМРА считаются более легкими, быстрыми и гораздо менее дорогостоящими, чем те, которые проводятся с использованием клеток Сасо-2.

В кишечнике слой эпителиальных клеток действует как барьер, ограничивая скорость перорально принимаемых препаратов. Поэтому для определения пассивной проницаемости и опосредованные транспортером эффекты широко применяются анализы трансцеллюлярной проницаемости с использованием Сасо-2 клеток, которые представляют собой клеточную линию

эпителиального рака толстой кишки человека [45].

Клетки Caco-2 культивируют на полупроницаемых поликарбонатных поверхностях вставки, помещенной в аналитическую камеру, которая образует апикальную и базолатеральную камеры (рисунок 14) [47]. При этом первая имитирует просвет кишечника, а вторая – кровеносную/брыжеечно-лимфатическую стороны желудочно-кишечного тракта.

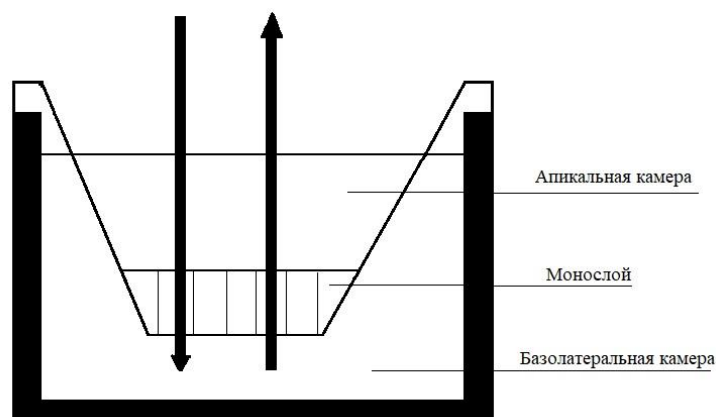


Рисунок 14 – Система, используемая для изучения переноса молекул через монослой Caco-2

В качестве показателей целостности эпителия использовались некоторые параметры, включая трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER), которое обусловлено развитием плотных межклеточных соединений, и транспорт гидрофильной молекулы PEG-4000. Увеличение транспорта PEG-4000, который обладает незначительной проницаемостью, указывает на изменения проницаемости клеточного монослоя [43].

Во время анализа исследуемые соединения добавляют либо на апикальную, либо на базолатеральную сторону каждого клеточного монослоя для имитации притока или оттока соединений через кишечный эпителий. В различные промежутки времени определяют концентрации соединений в приемных камерах [42]. Скорость переноса для конкретной концентрации

обычно выражается как коэффициент кажущейся проницаемости ( $P_{app}$ ), который рассчитывается по формуле 3:

$$P_{app} = \frac{V_r}{A \cdot C_0} \frac{dC}{dt} \quad 3)$$

где  $V_r$  – объем пробы, мл;

$dC/dt$  – скорость изменения концентрации лекарственного препарата с течением времени, моль/с;

$A$  – площадь поверхности мембраны, см<sup>2</sup>;

$C_0$  – начальная концентрация лекарственного препарата в одной из частей камеры, моль/л.

Метод моделирования *in silico* набирает популярность на ранних стадиях скрининга, поскольку они дешевые и менее трудоемкие. Модели свойств *in silico* могут быть основаны как на теоретических, так и на экспериментальных данных для установления зависимости между активностью или свойствами и структурой ряда соединений. Общепринятым термином, который используется для описания взаимосвязи между структурой вещества и его свойствами или активностью, являются QSPR и QSAR, соответственно [48, 49]. Как уже упоминалось выше, значительное влияние на проницаемость препарата является его липофильность, которая определяется коэффициентом распределения ( $\log P$ ) – логарифм отношения концентрации неионизирующего вещества в двух несмешивающихся жидких системах [50].

В случае ионизированных молекул липофильность определяется коэффициентом  $\log D$ , который учитывает ионизированные и неионизированные доли вещества. Данные коэффициенты распределения, рассчитанные с помощью разных компьютерных программ называются  $c\log P$  (расчетный  $\log P$ ), что является «золотым стандартом» для прогнозирования липофильности *in silico* [51].

### 1.5 Важность прогнозирования ADMET-характеристик



Важным фармакокинетическим препятствием для высокомолекулярных соединений, как правило, является проницаемость, при этом необходимо учитывать другие аспекты, такие как растворимость и первичный метаболизм. В свою очередь, на эти свойства могут влиять многие физиологические и физико-химические факторы, например, рН кишечника, метаболическая стабильность лекарственного средства в желудочно-кишечном тракте и плазме [52].

Поэтому прогнозирование проницаемости – одна из ключевых задач в медицинской химии, поскольку диффузия через мембраны необходима для перорально вводимых препаратов и для соединений с внутриклеточными мишенями.

Соединения оценивают с точки зрения отношений структура-свойство для разработки соединений с благоприятными свойствами. Эти количественные и качественные модели включают в себя правило пяти Липински, которое обеспечивает простой подход для прогнозирования характеристик AD-MET на основе молекулярного веса, количества доноров и акцептора водородных связей и липофильности (LogP) [53].

В целом, более высокие значения липофильности приводят к увеличению проницаемости, но при этом наблюдалось снижение растворимости и неизбирательности, а также токсичность и накопление в мембранах и жировой ткани [54].

Как уже упоминалось, PROTAC представляют собой класс молекул, свойства которых не соответствуют «правилу пяти» для обычных пероральных лекарственных средств, что обуславливает необходимость поиска других дескрипторов для изучения химического пространства PROTAC.

Потенциальная пероральная биодоступность PROTAC также во многом зависит от свойств как лигандов POI, так и E3-лигазы [33]. Высокая молекулярная масса, низкая растворимость и низкая проницаемость молекул PROTAC затрудняют улучшение биодоступности. Поэтому существует необ-

ходимость в оптимизации физико-химических и фармакокинетических свойств молекул.

Следовательно, для оптимизации ADMET-характеристик в пространстве bRo5 используется несколько подходов, включая структурные изменения: наличие гетероциклических фрагментов или экранирование полярных групп с помощью гидрофобных и стерически загруженных заместителей [52].

Ряд исследований продемонстрировали результативное использование моделей ADMET *in silico* для ускорения идентификации малых молекул с улучшенной эффективностью и безопасностью.

Таким образом, соединения в пространстве bRo5 часто крупнее и сложнее, чем препараты, соответствующие Ro5, и их синтез более трудоемкий и дорогостоящий процесс, поэтому вычислительные методы точного прогнозирования физико-химических свойств, клеточной проницаемости и кишечной абсорбции необходимы для дальнейших разработок в этой области.

## **2 Результаты и их обсуждения**

Без сомнения, проницаемость лекарственных препаратов через клеточные мембраны является важным фактором пероральной абсорбции, а также важна для правильного распределения препарата в организме. Низкая проницаемость может быть следствием ряда структурных особенностей молекул и мембранных механизмов оттока. Это в свою очередь может являться причиной плохой абсорбции через слизистую желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и дальнейшего распределения препарата по организму.

При разработке фармацевтической продукции стабильность лекарственного средства также является важным требованием для проведения клинических испытаний. Метаболическая стабильность определяется скоростью и степенью метаболизма молекулы. Результаты исследований стабильности обычно представляются как показатели внутреннего клиренса, на основании которых могут быть рассчитаны такие фармакокинетические параметры, как биодоступность и период полувыведения [55, 56].

В данной работе были получены величины коэффициентов кажущейся проницаемости новых молекул PROTAC в различных направлениях транспорта и определены значения концентрации для оценки стабильности библиотеки из 25 соединений, которые могут быть потенциальными новыми лигандами к CRBN.

Для определения этих параметров использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

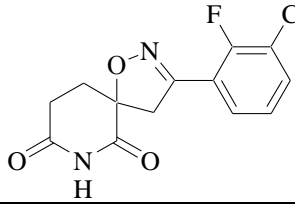
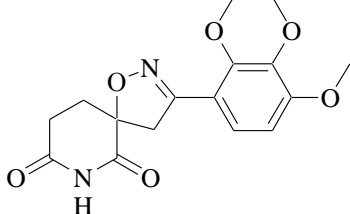
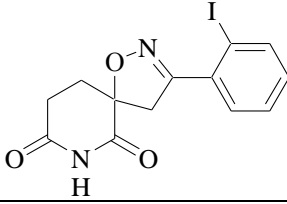
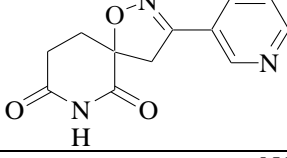
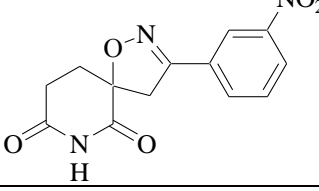
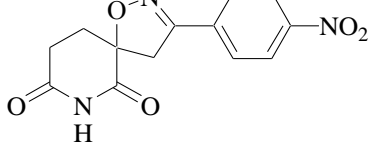
### **2.1 Оценка стабильности новых лигандов CRBN**

Объектом исследования является библиотека из 25 отдельных соединений, которая включает в себя новые лиганды CRBN и которая была синтезирована в партнерской лаборатории СПбГУ. Структурные формулы приведе-

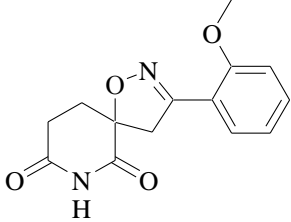
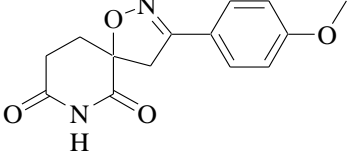
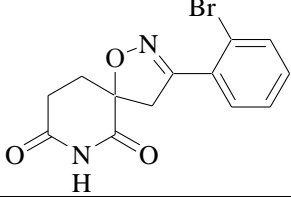
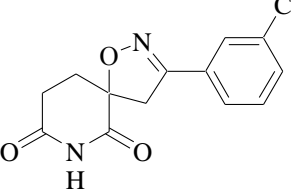
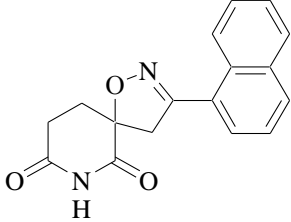
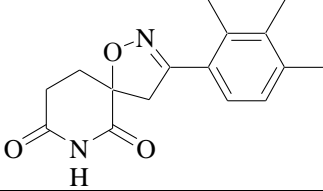
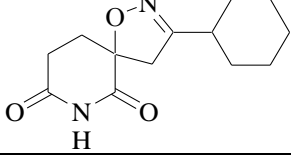
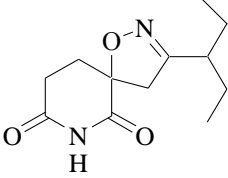
ны в таблице 1.

Соединения, содержащиеся в данной библиотеке, являются производными глутаримида с общим скаффолдом и различными заместителями в 3 положении изоксазольного фрагмента.

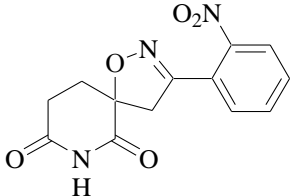
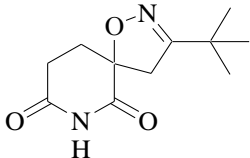
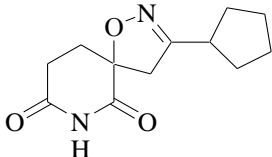
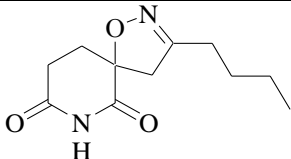
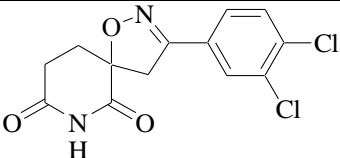
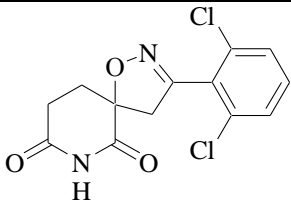
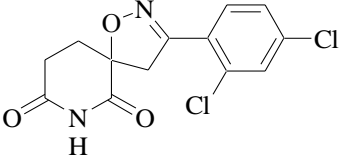
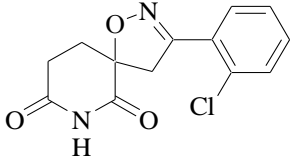
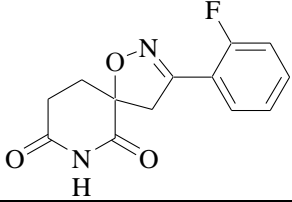
Таблица 1 – Структурные формулы исследуемых соединений

Код	Название по номенклатуре ИЮПАК	Формула	MW
1	2	3	4
044	3-(3-хлор-2-фторфенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		297
069	3-(2,3,4-триметоксифенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		334
070	3-(2-йодофенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		334
086	3-(пиридин-3-ил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		245
087	3-(3-нитрофенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		289
088	3-(4-нитрофенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		289

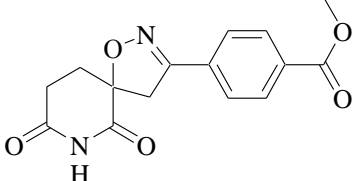
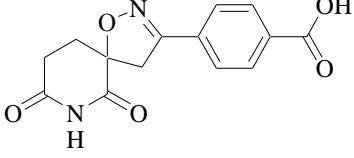
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
098	3-(2-метоксифенил)-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		274
099	3-(4-метоксифенил)-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		274
113	3-(2-бромфенил)-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		323
114	3-(3-хлорфенил)-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		279
115	3-(нафталин-1-ил)-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		294
116	3-(2,3,4-триметилфенил)-1-окса- 2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8- дион		286
118	3-циклогексил-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		250
119	3-(пентан-3-ил)-1-окса-2,7- дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		238

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
139	3-(2-нитрофенил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		289
144	3-(трет-бутил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		224
145	3-циклопентил-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		236
147	3-бутил-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		224
160	3-(3,4-дихлорфенил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		313
161	3-(2,6-дихлорфенил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		313
162	3-(2,4-дихлорфенил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		313
163	3-(2-хлорфенил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		279
174	3-(2-фторфенил)-1-окса-2,7- дiazаспи́ро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион		262

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
205	метил-4-(6,8-диоксо-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-3-ил)бензоат		302
215	4-(6,8-диоксо-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-3-ил)бензойная кислота		288

Для каждого из соединений определены значения интегральной площади пика, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения интегральной площади пика соединений

№ соединения	Площадь пика, [мА·с]	Среднее значение площади пика, [мА·с]
1	2	3
099	2941.86 1911.45 2016.00	2289.77
044	4097.85 2638.04 3806.34	3514.07
069	2861.13 2566.50 2700.77	2709.47
070	1947.72 1833.93 1945.21	1908.95
086	2132 1583 1776	1831
087	2413 2409	2411
088	1347 1377	1363
098	1679 1665	1672
113	1413 1390	1402

Продолжение таблицы 2

1	2	3
114	2115 2740 2731	2528
115	1708 1441 1406	1519
116	1771 1542	1657
118	1325 1344	1334
119	474 523	499
139	1468 1629 1606	1568
144	1118 1170 1041	1110
145	1071 1144	1107
147	1153 1071 1027	1084
160	1263 1109	1186
161	1145 1216	1180
162	2135 2103	2119
163	1600 1663	1632
174	1820 1987	1904
205	1355 1554 1440	1450
215	533 854 750	713

Для количественной оценки использовали метод градуировочного графика по стандарту, для остальных соединений находили коэффициент чувствительности.

В качестве эталонного соединения был выбран лиганд №-099, который



далее разбавили до концентраций 1 мМ, 5 мМ, 25 мкМ, 50 мкМ, 75 мкМ и 100 мкМ и получали интегральную площадь пика для каждой.

По экспериментальным данным, представленным в таблице 3, построен градуировочный график зависимости интегральной площади пиков от концентрации исследуемого лиганда №-099 (рисунок 15).

Таблица 3 – Зависимость интегральной площади пиков от концентрации исследуемого соединения

Концентрация, [мкмоль]	Площадь, [мА·с]
25	953
50	1904
75	2856
100	3809
1000	12700
5000	55450

Определение неизвестных концентраций проводили методом градуировки. Поправочный коэффициент к чувствительности детектора для каждого соединения по отношению к стандарту рассчитывали по формуле 4. Результаты подсчета представлены в таблице 4.

$$K_i = \frac{Q_{\text{stad}}}{Q_i} \quad (4)$$

где  $Q_{\text{stad}}$  – площадь пика эталонного соединения №-099;  
 $Q_i$  – площадь пика исследуемых соединений.

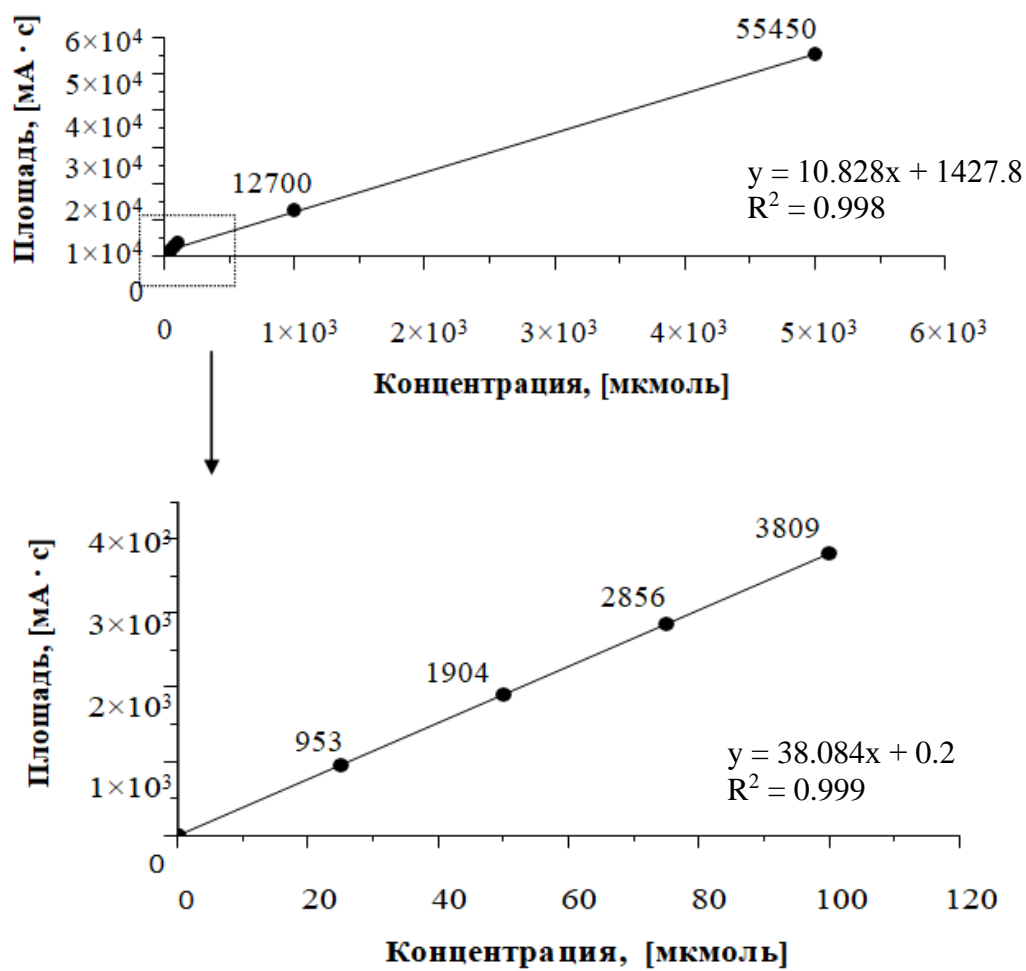


Рисунок 15 – Зависимость интегральной площади пика от концентрации соединения №-099

Таблица 4 – Поправочный коэффициент для исследуемых соединений

Номер соединения	Коэффициент, К	Номер соединения	Коэффициент, К
044	0.65	119	4.53
069	0.85	139	1.46
070	1.20	144	2.06
086	1.25	145	2.07
087	0.95	147	2.11
088	1.68	160	1.93
098	1.37	161	1.94
113	1.63	162	1.08
114	0.91	163	1.40
115	1.51	174	1.20
116	1.38	205	1.58
118	1.72	215	3.21

Предварительные эксперименты на предмет исследования метаболической стабильности препарата проводили путем добавления соединений в питательную среду. После приготовления общей аналитической смеси через 24 часа инкубации отбирали пробы необходимого объема. Определяли интегральную площадь пика после инкубации в течение 24 часов для каждого из соединений (приложение А, Б). Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5 – Интегральная площадь пика после 24 часов инкубации

Соединение	Площадь, [мА·с]
044	1273 ± 63.7
069	1444 ± 72.2
070	992 ± 49.6
086	1584 ± 79.2
087	1526 ± 76.3

По полученным данным находим концентрацию каждого соединения по формуле 5. Результаты представлены в таблице 6.

$$C = \frac{K_i Q_i - 0.2}{38.084} \quad 5)$$

где  $Q_i$  – Интегральная площадь пика исследуемых соединений после инкубации в течение 24 часов;

$K_i$  – Поправочный коэффициент исследуемых соединений.

Таблица 6 – Предварительные результаты оценки стабильности соединений после инкубации в течение 24 часов

Соединение	Концентрация, [мкмоль]	Процентное содержание, %
044	21.73 ± 0.98	65
069	32.22 ± 1.45	97
070	31.25 ± 1.40	94
086	n.d.	n.d.
087	n.d.	n.d.

На основании данных о концентрации исследуемых соединений, которые представлены в таблице 6, соответственно, можно сделать вывод, что по-

сле инкубации в течение 24 часов соединения оставались стабильными.

Также проведено полноценное исследование для 25 лигандов CRBN. Для чего соединения добавляли в фосфатный буферный раствор. Пробу отбирали и определяли интегральную площадь пика после инкубации в течение 24 часов (таблица 7).

Таблица 7 – Интегральная площадь пика соединений, инкубированных в фосфатном буферном растворе в течение 24 часов

Номер соединения	Площадь, [мА·с]	Номер соединения	Площадь, [мА·с]
044	615 ± 30.8	119	16 ± 0.8
069	290 ± 14.5	139	887 ± 44.4
070	323 ± 16.2	144	21 ± 1.1
086	364 ± 18.2	145	23 ± 1.2
087	821 ± 41.1	147	17 ± 0.9
088	1059 ± 53.0	160	364 ± 18.2
098	410 ± 20.5	161	312 ± 15.6
099	368 ± 18.4	162	1409 ± 70.5
113	325 ± 16.3	163	203 ± 10.2
114	569 ± 28.5	174	365 ± 18.3
115	331 ± 16.6	205	85 ± 4.3
116	507 ± 25.4	215	802 ± 40.1
118	7 ± 0.35		

Концентрацию определяли аналогичным образом. Результаты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты оценки стабильности соединений после инкубации в течение 24 часов в фосфатном буферном растворе

Соединение	Концентрация, [мкмоль]	Процентное содержание, %
1	2	3
044	10.49 ± 0.47	31
069	6.47 ± 0.29	19
070	10.17 ± 0.46	31
086	11.94 ± 0.49	36
087	20.48 ± 0.92	61
088	n.d.	n.d.
098	14.75 ± 0.66	44

Продолжение таблицы 8

1	2	3
099	$9.66 \pm 0.43$	29
113	$13.92 \pm 0.63$	42
114	$12.16 \pm 0.55$	36
115	$13.13 \pm 0.59$	39
116	$18.35 \pm 0.83$	55
118	$0.31 \pm 0.01$	1
119	$1.92 \pm 0.09$	6
139	n.d.	n.d.
144	$1.13 \pm 0.05$	3
145	$1.26 \pm 0.06$	4
147	$0.94 \pm 0.04$	3
160	$18.46 \pm 0.83$	55
161	$15.89 \pm 0.71$	48
162	n.d.	n.d.
163	$7.46 \pm 0.33$	22
174	$11.51 \pm 0.52$	35
205	$3.51 \pm 0.16$	11
215	n.d.	n.d.

Можно отметить, что соединения, имеющие в третьем положении изоксазольного кольца алкильные заместители, нестабильны.

Кроме того, была предпринята попытка оценки стабильности лигандов CRBN в полной ростовой среде, однако это не дало положительных результатов по ряду технических причин.

## 2.2 Исследование проницаемости молекул PROTAC

В качестве объектов исследования были взяты молекулы PROTAC, построенные на новых лигандах к цереблону. Структурные формулы представлены в таблице 9.

Данные соединения были синтезированы в партнерской лаборатории кафедры «Медицинская химия» Санкт-Петербургского государственного университета.

Таблица 9 – Структурные формулы исследуемых соединений

Код	Название по номенклатуре ИЮПАК	Формула	MW
Sav-218	N1-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)-N5-(4-(((2,6-диоксопиперидин-3-ил)метил)тио)фенил)глутарамид		620
Sav-240	N1, N5-бис(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)глутарамид		643
Sav-248	N1, N5-бис(3-(((2,6-диоксопиперидин-3-ил)метил)тио)фенил)глутарамид		597

В данном исследовании клеточная линия Caco-2, которая была выделена из аденокарциномы толстой кишки человека, использована для тестирования соединений *in vitro* на предмет их проницаемости через барьер эпителиальных клеток кишечника. При культивировании в виде монослоя на полупроницаемой мембране клетки Caco-2 дифференцируются в клетки, морфологически и функционально сходные с энтероцитами кишечника человека. Поэтому этот метод анализа может быть более подходящим для исследований.

Для выполнения анализа питательную среду заменяли буфером для анализа проницаемости (PAB), представляющий собой солевой раствор Хэнкса (HBSS) с добавлением 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM D(+)-глюкозы и 20 mM HEPES при pH 7.4. Для каждого соединения исследовался двусторонний транспортный путь, для чего в апикальную камеру (камеру-донор) добавляли по 2 мл раствор изучаемого соединения и 2 мл буфера в ба-

золатеральную камеру. Анализ «базолатерально-апикальный» профодился аналогичным образом.

Затем через 30 минут, 60 минут и 90 минут производился отбор проб. В таблице 10 показаны интегральные площади пика для каждого соединения (приложение В, Г).

Таблица 10 – Интегральная площадь пик через каждые 30 минут

Соединение	Базолатеральная часть			Апикальная часть		
	30 минут	60 минут	90 минут	30 минут	60 минут	90 минут
	Площадь, [мА·с]					
SAV-218	357	585	362	487	795	351
SAV-240	426	240	214	579	361	245
SAV-241	841	756	253	1304	370	294

На основании экспериментальных данных, приведенных в таблице 10, были рассчитаны концентрации для каждого соединения через промежуток времени в 30 минут. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Значения концентраций соединений

SAV-218				
Часть \ Время	30 Минут	60 Минут	90 Минут	
Базолатеральная	2.89	0.64	0.78	
Апикальная	0.71	0.52	0.79	
SAV-240				
Часть \ Время	30 Минут	60 Минут	90 Минут	
Базолатеральная	2.74	0.85	0.87	
Апикальная	2.37	0.78	0.81	
SAV-248				
Часть \ Время	30 Минут	60 Минут	90 Минут	
Базолатеральная	1.81	0.54	0.85	
Апикальная	0.78	0.78	0.82	

Коэффициент кажущейся проницаемости  $P_{app}$  рассчитывался по изменению концентраций исследуемых соединений в апикальной камере и базолатеральной камере.

латеральной камере. Результаты представлены в таблицах 12-13.

Таблица 12 – Эффективная проницаемость  $P_{app}$  соединения в базолатеральной части

Соединение Время		$P_{app}, \times 10^{-6} \text{ см/с}$		
		SAV-218	SAV-240	SAV-248
30		$3.83 \pm 0.08$	$3.63 \pm 0.07$	$2.41 \pm 0.05$
60		$1.57 \pm 0.03$	$2.09 \pm 0.04$	$1.33 \pm 0.03$
90		$1.27 \pm 0.03$	$1.42 \pm 0.03$	$1.39 \pm 0.03$

Таблица 13 – Эффективная проницаемость  $P_{app}$  соединения в апикальной части

Соединение Время		$P_{app}, \times 10^{-6} \text{ см/с}$		
		SAV-218	SAV-240	SAV-248
30		$3.49 \pm 0.07$	$3.14 \pm 0.06$	$1.03 \pm 0.02$
60		$1.28 \pm 0.03$	$1.92 \pm 0.04$	$1.89 \pm 0.04$
90		$1.29 \pm 0.03$	$1.32 \pm 0.03$	$1.34 \pm 0.03$

По результатам значений коэффициента кажущейся проницаемости с помощью клеточного монослоя Caco-2, проницаемость соединения можно классифицировать как высокая, средняя и низкая.

Среднее значение коэффициента кажущейся проницаемости для соединений в каждой из камер показано в таблице 14.

Таблица 14 – Среднее значение коэффициента кажущейся проницаемости

Соединение Часть		$P_{app}, \times 10^{-6} \text{ см/с}$		
		SAV-218	SAV-240	SAV-248
Базолатеральная		$2.02 \pm 0.04$	$2.38 \pm 0.05$	$1.71 \pm 0.03$
Апикальная		$1.29 \pm 0.03$	$2.13 \pm 0.05$	$1.42 \pm 0.02$

По полученным данным видно, что соединения обладают низкими значениями проницаемости в апикальной части и умеренными в базолатеральной части.



### **3 Экспериментальная часть**

#### **3.1 Реагенты и оборудование**

Ламинарный шкаф II класса защиты (SafeFast Elite, Италия), инвертированный микроскоп (ZEISS Primovert, Германия), CO<sub>2</sub>-инкубатор (Binder, Германия), жидкостный хроматограф (Agilent Technologies 1220 Infinity LC, США), колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (100x4.6 мм) с размером частиц 5 мкм, микрошприц объемом 50 мкл (Agilent, США), механический дозатор на 300 мкл (Eppendorf Research Plus, Германия), механический дозатор на 1000 мкл (Eppendorf, Германия), центрифуга для микропробирок (Eppendorf, Германия), шейкер-инкубатор (Biosan, Латвия).

##### **3.1.1 Материалы и реактивы**

Клеточная линия Caco-2 (ATCC); питательная среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Великобритания) с дополнением фетальной бычьей сыворотки FBS (20%), пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и амфотерицина В (2 мкг/мл); TrypLe Express (Gibco, Великобритания); фосфатный буферный раствор (PBS) (Capricorn Scientific, Германия), pH 7.4; ацетонитрил для ВЭЖХ, 99.9%, диметилсульфоксид (DMSO), питательная среда Rpmi-1640 (Gibco, Великобритания) при добавлении 20% фетальной бычьей сывороткой (FBS),

Культуральный флакон на 150 см<sup>2</sup> (Eppendorf, Германия); пробирка 1.5 мл (Eppendorf, США); подвешенная вставка для клеточных культур из поликарбонатной мембраны с размером пор 0.4 мкм и площадью поверхности 4.52 см<sup>2</sup>, используемая в 6-луночном планшете (SPLInsert, Республика Корея); серологические пипетки на 5 мл и 10 мл (Eppendorf, Германия); наконечники на 300 мкл и 1000 мкл (Vertex, США), 96-луночный планшет (Eppendorf, Германия).

## 3.2 Биологический эксперимент

### 3.2.1 Анализ стабильности новых лигандов CRBN

Пробы соединений 2 мкМ растворяли в 198 мкМ DMSO. Эксперимент проводился при комнатной температуре, расход элюента составлял 1 мл/мин. Детекция проводилась при длине волны 254 нм.

В качестве контрольного соединения принято соединение №-099, образец разбавляли до концентраций 1 мМ, 5 мМ, 25 мкМ, 50 мкМ, 75 мкМ и 100 мкМ.

По результатам экспериментальных данных был построен градуировочный график зависимости концентраций от интегральной площади пика. Для исследуемых соединений рассчитывались поправочные коэффициенты, и концентрация каждого соединения определялась с использованием градуировочной кривой.

Для предварительного исследования были взяты соединения №-044, 069, 070, 086 и 087 и далее разбавлялись до 100 мкМ. Для чего в 48-луночный планшет вносили 10 мкл каждого из соединений и 99 мкл питательной среды. Инкубировали при 37 °С и 5% концентрации углекислого газа в течение 24 часов.

По истечении времени добавляли по 400 мкл питательной среды и 800 мкл ацетонитрила для коагуляции белка и центрифугировали 20 минут.

Полное исследование стабильности 25 лигандов CRBN проводили в аналогичных условиях в полной ростовой среде и фосфатно-буферном растворе. В 96-луночный планшет вносили 5 мкл каждого соединения и по 495 мкл фосфатный буферный раствор. Инкубировали в течение 24 часов при 37 °С и 5% концентрации углекислого газа.

Далее для эксперимента в питательной среде после инкубации добавляли ацетонитрил в соотношении 1:2 и центрифугировали в течение 20 минут.

Полученные растворы анализировали на ВЭЖХ-системе Agilent Technologies 1220 Infinity LC. В качестве элюента (подвижная фаза) использовали смесь ацетонитрил–вода в соотношении 80:20 об. %. Детекция проводилась при длине волны 254 нм.

### **3.2.2 Анализ проницаемости молекул PROTAC**

Клеточная линия Сасо-2 культивировалась в среде DMEM, содержащей 20% FBS, *L*-глутамин, пенициллин (100 мкг/мл), стрептоцимин (100 мкг/мл) и амфотерицин В (2 мкг/мл), в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5% концентрации углекислого газа.

Все последующие исследования проводились в асептических условиях в боксе под ламинарным потоком.

Клеточная линия Сасо-2 культивировалась во флаконах 150 см<sup>2</sup> при 37 °С и 5% концентрации углекислого газа. Среда культивирования DMEM содержала фетальную бычью сыворотку FBS (20%), пенициллин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и амфотерицин В (2 мкг/мл).

Высеивание клеток Сасо-2 на мембранные вставки из поликарбоната с размером пор 0.4 мкм и площадью поверхности 4.52 см<sup>2</sup> происходило при плотности клеток  $7.5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. Клетки Сасо-2 инкубировали 21 день с периодической сменой среды.

В день эксперимента готовили буфер для анализа проницаемости: сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), содержащий 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM D(+)-глюкозы и 20 mM HEPES (pH 7.4). Для определения проницаемости из апикальной камеры в базолатеральную добавляли по 2 мл исследуемого соединения в апикальную часть и буфера для анализа проницаемости в базолатеральную часть. Для определения транспорта из базолатеральной в апикальную камеру добавляли по 2 мл соединения в базолатеральную часть и буфера в апикальную часть.

Затем инкубировали с интервалом в 30 минут при 37 °С на шейкере. Полученные растворы анализировали на ВЭЖХ-системе Agilent Technologies

1220 Infinity LC. В качестве элюента (подвижная фаза) использовали смесь ацетонитрил–вода в соотношении 80:20 об. %. Детекция проводилась при длине волны 254 нм.

Изменение концентрации определяли по формуле 6:

$$\frac{\Delta C}{C_0} = \frac{Q_{\text{исх}} - Q_i}{Q_{\text{исх}}} \quad (6)$$

где  $Q_{\text{исх}}$  – интегральная площадь пика исходного соединения;

$Q_i$  – интегральная площадь пика соединения через каждые 30 минут.

Эффективная проницаемость была рассчитана по формуле 7:

$$P_{\text{app}} = \frac{V_r}{A \cdot C_0} \frac{dC}{dt} \quad (7)$$

где  $V_r$  – объем в акцепторной камере, мл;

$\frac{dC}{dt}$  – скорость изменения концентрации лекарственного препарата с течением времени, моль/с;

$A$  – площадь поверхности мембраны, см<sup>2</sup>;

$C_0$  – начальная концентрация лекарственного препарата в одной из частей камеры, моль/л.

Результаты оценены в соответствии со следующей таблицей 15.

Таблица 15 – Критерии оценки проницаемости клеток

Диапазон прогнозируемого поглощения <i>in vitro</i>	$P_{\text{app}}, \times 10^{-6}, \text{ см/с}$	Процентное соотношение, %
Низкий	$P_{\text{app}} < 2 \times 10^{-6}$	0-20 %
Средний	$2 \times 10^{-6} < P_{\text{app}} < 10 \times 10^{-6}$	20-70 %
Высокий	$P_{\text{app}} > 10 \times 10^{-6}$	70-100 %

## Заключение

Проведен обзор соответствующей литературы и представлены доступные методы измерения ADME характеристик PROTAC. Все эти характеристики влияют на уровень и кинетику действия лекарственного препарата и, таким образом, на лекарственную эффективность.

Проведена предварительная оценка стабильности новых лигандов CRBN с использованием метода ВЭЖХ. Концентрацию соединений определяли методом градуировочного графика. Согласно методике, исследуемые соединения инкубировали в течение 24 часов в полной ростовой среде RPMI-1640, после чего анализировали изменение концентрации. По результатам эксперимента, все соединения обладают достаточной стабильностью.

Оценена стабильность 25 лигандов CRBN в фосфатном буферном растворе в аналогичных условиях. По результатам эксперимента, соединения распадаются после инкубации в течение 24 часов. Соединения с алкильными заместителями гидролизуются быстрее, чем соединения, имеющие арильные заместители в третьем положении изоксазольного фрагмента. Предпринята попытка провести эксперимент в полной ростовой среде, однако по ряду технических причин это пока не удалось осуществить.

Была использована стандартная методика анализа клеточной проницаемости с использованием модели клеток Caco-2. Концентрации исследуемых соединений в базолатеральной и апикальной частях определяли методом ВЭЖХ. По результатам полученного коэффициента кажущейся проницаемости, рассмотренные молекулы PROTAC обладают низкими значениями проницаемости в апикальной камере в диапазоне  $1.29 \times 10^{-6} - 2.13 \times 10^{-6}$  см/с и базолатеральной камере в диапазоне  $1.71 \times 10^{-6} - 2.38 \times 10^{-6}$  см/с. Эти данные свидетельствуют о преобладании процессов притока (транспорт по направлению из просвета кишечника в энтероциты) над процессами оттока (транспорт из клеток кишечника в просвет кишечника).

## Список используемой литературы

1. Sakamoto K. M. et al. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – V. 98. – №. 15. – P. 8554-8559.
2. Zhao Y., Sun Y. Cullin-RING Ligases as attractive anti-cancer targets // Current pharmaceutical design. – 2013. – V. 19. – №. 18. – P. 3215-3225.
3. Li X. et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy // Molecular Cancer. – 2022. – V. 21. – №. 1. – P. 1-30.
4. Li X., Song Y. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy // Journal of Hematology & Oncology. – 2020. – V. 13. – №. 1. – P. 1-14.
5. Paiva S. L., Crews C. M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design // Current opinion in chemical biology. – 2019. – V. 50. – P. 111-119.
6. Qi S. M. et al. PROTAC: an effective targeted protein degradation strategy for cancer therapy // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – V. 12. – P. 574-590.
7. Sun X., Rao Y. PROTACs as potential therapeutic agents for cancer drug resistance // Biochemistry. – 2019. – V. 59. – №. 3. – P. 240-249.
8. Ermondi G. et al. Rational control of molecular properties is mandatory to exploit the potential of PROTACs as oral drugs // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2021. – V. 12. – №. 7. – P. 1056-1060.
9. Cecchini C. et al. From conception to development: investigating PROTACs features for improved cell permeability and successful protein degradation // Frontiers in Chemistry. – 2021. – V. 9. – P. 672-690.
10. Gleeson M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb // Journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – V. 51. – №. 4. – P. 817-834.
11. Sakamoto K. M. et al. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation // Molecular & Cellular Pro-

teomics. – 2003. – V. 2. – №. 12. – P. 1350-1358.

12. Schneekloth A. R. et al. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – V. 18. – №. 22. – P. 5904-5908.

13. Buckley D. L. et al. Targeting the von Hippel–Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 $\alpha$  interaction // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – V. 134. – №. 10. – P. 4465-4468.

14. Galdeano C. et al. Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein–protein interaction between the von Hippel–Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with *in vitro* nanomolar affinities // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – V. 57. – №. 20. – P. 8657-8663.

15. Bondeson D. P. et al. Catalytic *in vivo* protein knockdown by small-molecule PROTACs // *Nature chemical biology*. – 2015. – V. 11. – №. 8. – P. 611-617.

16. Zengerle M., Chan K. H., Ciulli A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4 // *ACS Chemical Biology*. – 2015. – V. 10. – №. 8. – P. 1770-1777.

17. Ito T. et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity // *Science*. – 2010. – V. 327. – №. 5971. – P. 1345-1350.

18. Winter G. E. et al. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation // *Science*. – 2015. – V. 348. – №. 6241. – P. 1376-1381.

19. Lu J. et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 // *Chemistry & Biology*. – 2015. – V. 22. – №. 6. – P. 755-763.

20. Gao X. et al. Phase 1/2 study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader, in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – P. 17-19.

21. Hamilton E. P. et al. ARV-471, an estrogen receptor (ER) PROTAC degrader, combined with palbociclib in advanced ER+/human epidermal growth fac-

tor receptor 2–negative (HER2-) breast cancer: Phase 1b cohort (part C) of a phase 1/2 study // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – P. 25-30.

22. Edmondson S. D., Yang B., Fallan C. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) in ‘beyond rule-of-five’ chemical space: Recent progress and future challenges // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – V. 29. – №. 13. – P. 1555-1564.

23. DeGoey D. A. et al. Beyond the rule of 5: lessons learned from AbbVie’s drugs and compound collection: miniperspective // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 61. – №. 7. – P. 2636-2651.

24. Wu S. et al. BRD4 PROTAC degrader ARV-825 inhibits T-cell acute lymphoblastic leukemia by targeting 'Undruggable' Myc-pathway genes // *Cancer cell international*. – 2021. – V. 21. – №. 1. – P. 1-16.

25. Saraswat A. L. et al. Drug delivery challenges and formulation aspects of proteolysis targeting chimera (PROTACs) // *Drug Discovery Today*. – 2022. – P. 387-401.

26. Han X. et al. Discovery of ARD-69 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – V. 62. – №. 2. – P. 941-964.

27. Mares A. et al. Extended pharmacodynamic responses observed upon PROTAC-mediated degradation of RIPK2 // *Communications biology*. – 2020. – V. 3. – №. 1. – P. 1-13.

28. Klein V. G. et al. Understanding and improving the membrane permeability of VH032-based PROTACs // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – V. 11. – №. 9. – P. 1732-1738.

29. Klein V. G. et al. Amide-to-ester substitution as a strategy for optimizing PROTAC permeability and cellular activity // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 64. – №. 24. – P. 18082-18101.

30. Cantrill C. et al. Fundamental aspects of DMPK optimization of targeted



- protein degraders // *Drug Discovery Today*. – 2020. – V. 25. – №. 6. – P. 969-982.
31. Rossi Sebastiano M. et al. Refinement of Computational Access to Molecular Physicochemical Properties: From Ro5 to bRo5 // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – V.65. – P. 12068-12083.
32. Atilaw Y. et al. Solution conformations shed light on PROTAC cell permeability // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – V. 12. – №. 1. – P. 107-114.
33. Pike A. et al. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective // *Drug Discovery Today*. – 2020. – V. 25. – №. 10. – P. 1793-1800.
34. Madan J. et al. PROTACs: current trends in protein degradation by proteolysis-targeting chimeras // *BioDrugs*. – 2022. – V.36. – P. 609-623.
35. Baranczewski P. et al. Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development // *Pharmacological reports*. – 2006. – V. 58. – №. 4. – P. 453.
36. Cecchini C., Tardy S., Scapozza L. Linkers as game-changers in PROTAC technology: emphasizing general trends in PROTAC pharmacokinetics for their rational design // *CHIMIA*. – 2022. – V. 76. – №. 4. – P. 341-341.
37. Zhou B. et al. Discovery of a small-molecule degrader of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins with picomolar cellular potencies and capable of achieving tumor regression // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – V. 61. – №. 2. – P. 462-481.
38. Goracci L. et al. Understanding the metabolism of proteolysis targeting chimeras (PROTACs): the next step toward pharmaceutical applications // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – V. 63. – №. 20. – P. 11615-11638.
39. Stappaerts J. et al. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities // *International journal of pharmaceutics*. – 2015. – V. 478. – №. 2. – P. 665-681.
40. Pereira C. et al. Cell-based *in vitro* models for intestinal permeability

studies // Concepts and models for drug permeability studies. – 2016. – P. 57-81.

41. Balimane P. V., Chong S., Morrison R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption // Journal of pharmacological and toxicological methods. – 2000. – V. 44. – №. 1. – P. 301-312.

42. Fagerholm U., Johansson M., Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum // Pharmaceutical research. – 1996. – V. 13. – №. 9. – P. 1336-1342.

43. Barthe L., Woodley J., Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies // Fundamental & Clinical Pharmacology. – 1999. – V. 13. – №. 2. – P. 154-168.

44. Kansy M., Senner F., Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes // Journal of Medicinal Chemistry. – 1998. – V. 41. – №. 7. – P. 1007-1010.

45. Volpe D. A. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines // Future Medicinal Chemistry. – 2011. – V. 3. – №. 16. – P. 2063-2077.

46. Irvine J. D. et al. MDCK (Madin–Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening // Journal of pharmaceutical sciences. – 1999. – V. 88. – №. 1. – P. 28-33.

47. Van Breemen R. B., Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption // Expert opinion on drug metabolism & Toxicology. – 2005. – V. 1. – №. 2. – P. 175-185.

48. Talevi A. et al. Prediction of drug intestinal absorption by new linear and non-linear QSPR // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2011. – V. 46. – №. 1. – P. 218-228.

49. Cabrera-Perez M. A. et al. QSPR in oral bioavailability: specificity or integrality? // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2012. – V. 12. – №. 6. – P. 534-550.

50. Fujikawa M. et al. QSAR study on permeability of hydrophobic compounds with artificial membranes // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – V. 15. – №. 11. – P. 3756-3767.

51. Шохин И. Е., Раменская Г. В. Методы прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования // *Биомедицина*. – 2011. – №. 2. – С. 35-40.

52. Matsson P. et al. Cell permeability beyond the rule of 5 // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – V. 101. – P. 42-61.

53. Lipinski C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // *Advanced drug delivery reviews*. – 1997. – V. 23. – №. 1-3. – P. 3-25.

54. Waring M. J. Lipophilicity in drug discovery // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2010. – V. 5. – №. 3. – P. 235-248.

55. Thompson T. N. Optimization of metabolic stability as a goal of modern drug design // *Medicinal research reviews*. – 2001. – V. 21. – №. 5. – P. 412-449.

56. Masimirembwa C. M., Bredberg U., Andersson T. B. Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges // *Clinical pharmacokinetics*. – 2003. – V. 42. – P. 515-528.

## Приложение А

### Хроматограммы лигандов CRBN

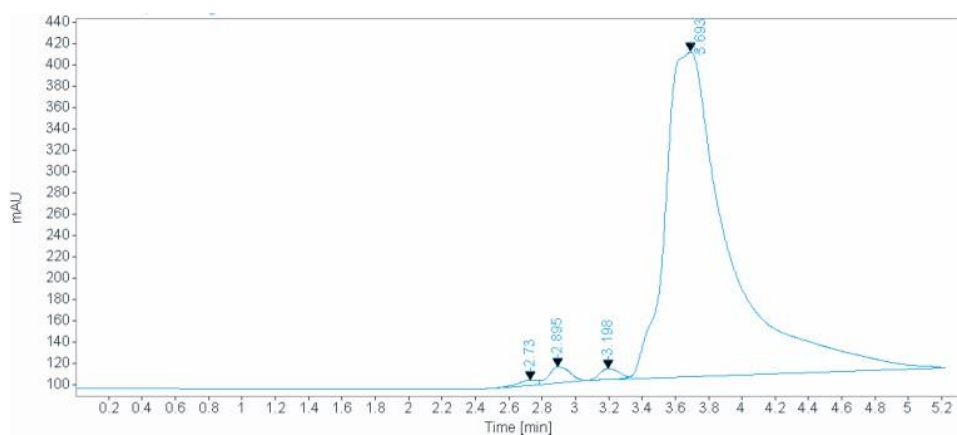


Рисунок А16 – Хроматограмма соединения №-044

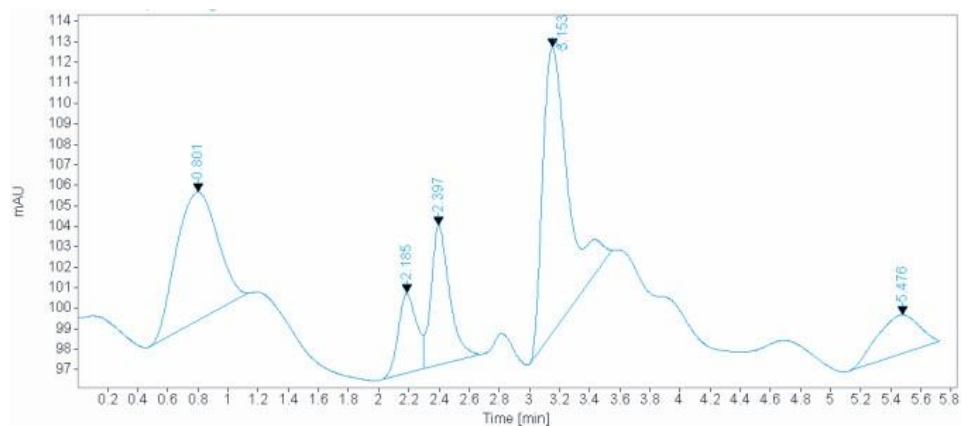


Рисунок А17 – Хроматограмма соединения №-069

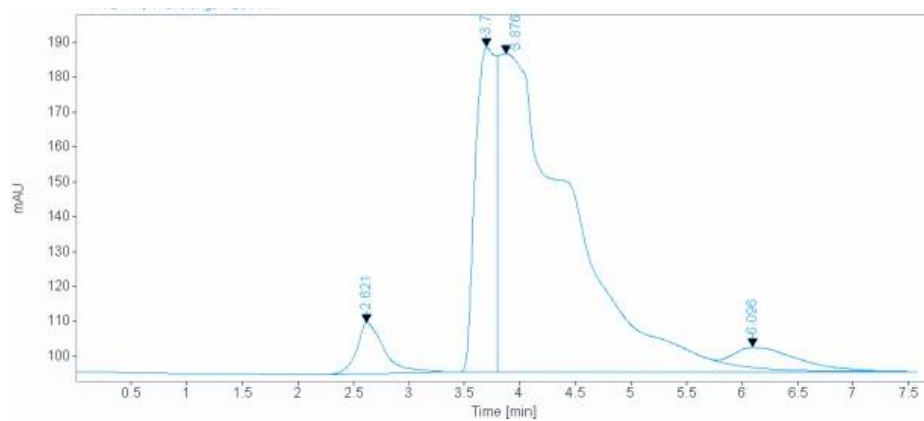


Рисунок А18 – Хроматограмма соединения №-070

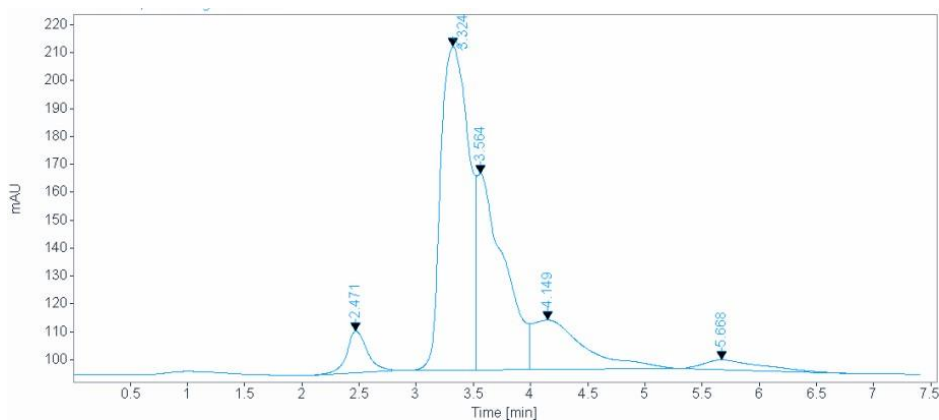


Рисунок А19 – Хроматограмма соединения №-086

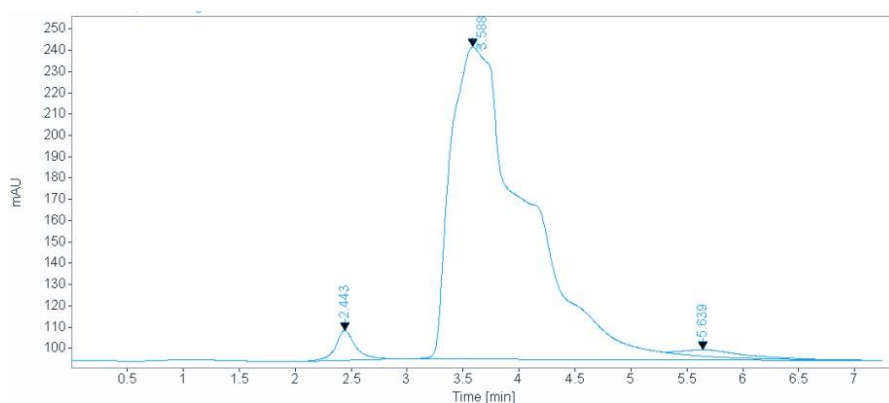


Рисунок А20 – Хроматограмма соединения №-087

## Приложение Б

### Предварительное исследование стабильности лигандов CRBN

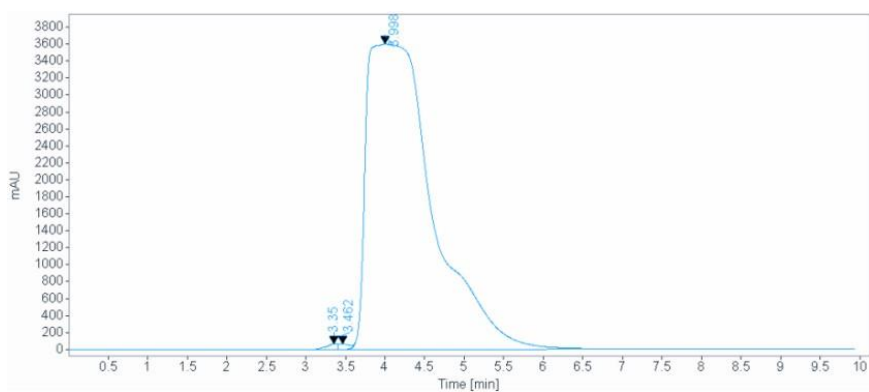


Рисунок Б21 – Хроматограмма соединения №-044 после инкубации в течение 24 часов

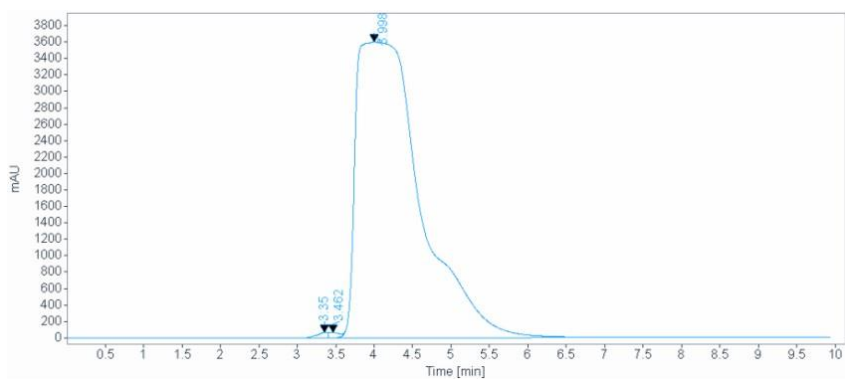


Рисунок Б22 – Хроматограмма соединения №-069 после инкубации в течение 24 часов

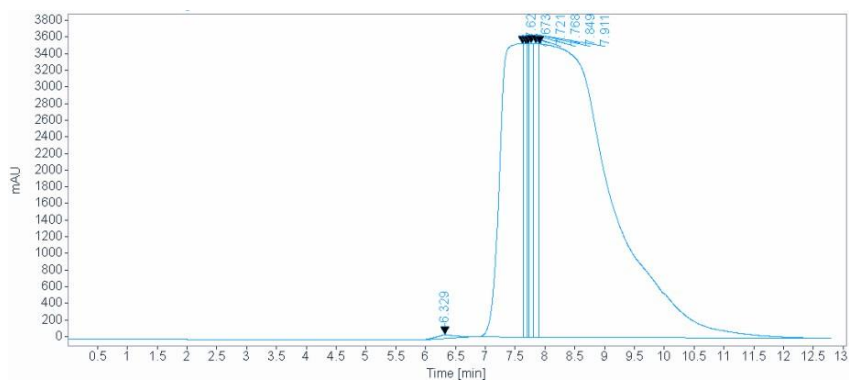


Рисунок Б23 – Хроматограмма соединения №-070 после инкубации в течение 24 часов

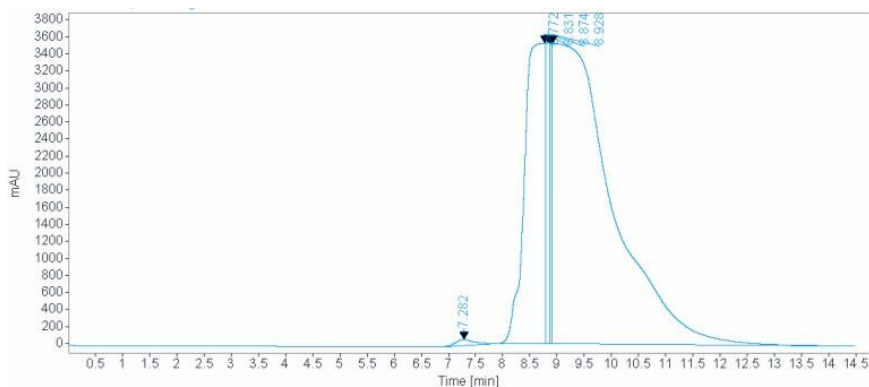


Рисунок Б24 – Хроматограмма соединения №-086 после инкубации в течение 24 часов

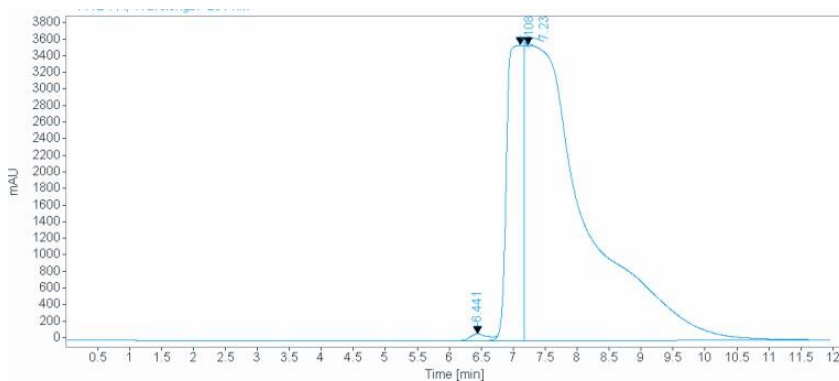


Рисунок 25 – Хроматограмма соединения №-087 после инкубации в течение 24 часов

## Приложение В

### Хроматограммы молекул PROTAC

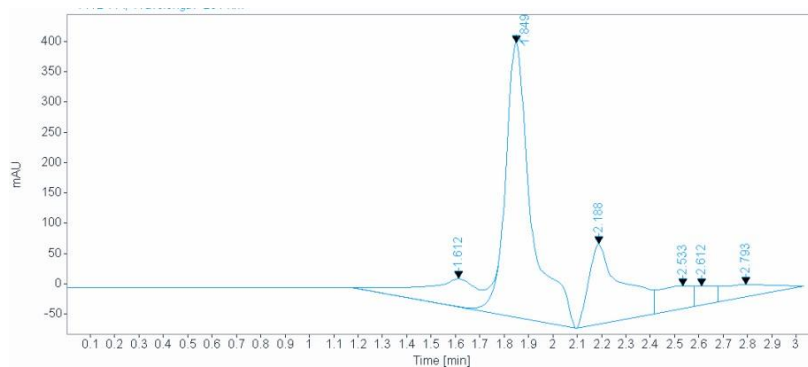


Рисунок В26 – Хроматограмма соединения SAV-218

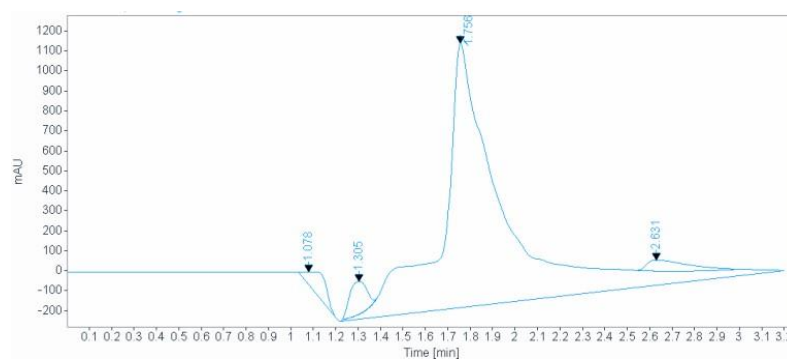


Рисунок В27 – Хроматограмма соединения SAV-240

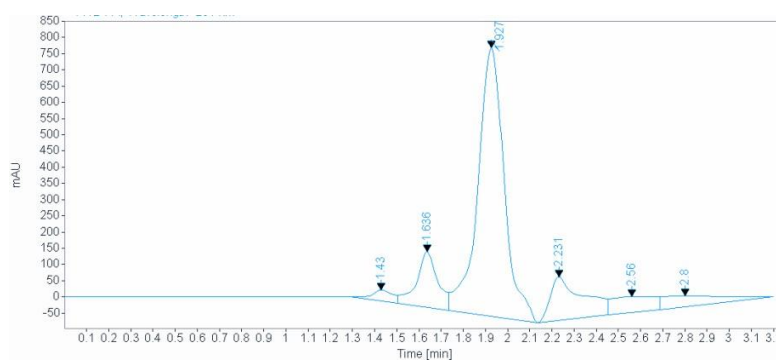


Рисунок В28 – Хроматограмма соединения SAV-248



## Приложение Г

### Исследование проницаемости молекул PROTAS

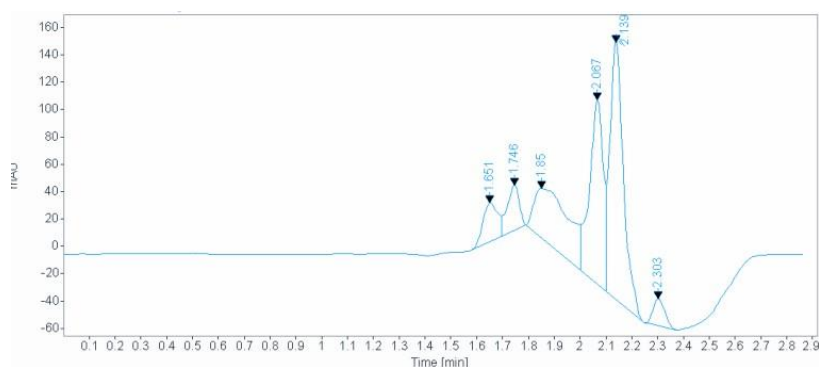


Рисунок Г29 – Хроматограмма соединения SAV-218 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 30 минут инкубации

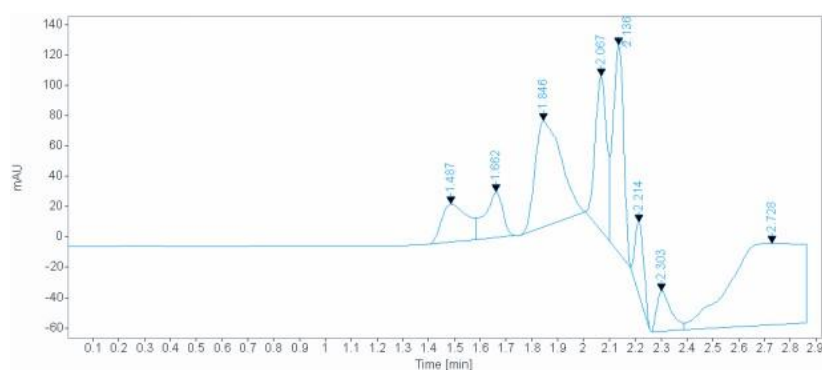


Рисунок Г30 – Хроматограмма соединения SAV-218 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 30 минут инкубации

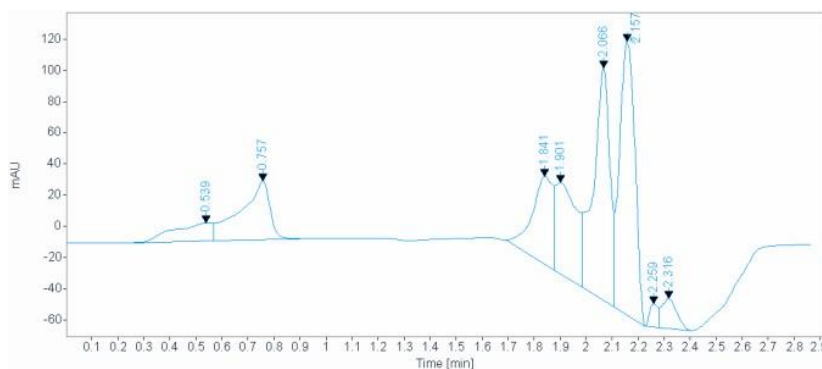


Рисунок Г31 – Хроматограмма соединения SAV-218 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 60 минут инкубации

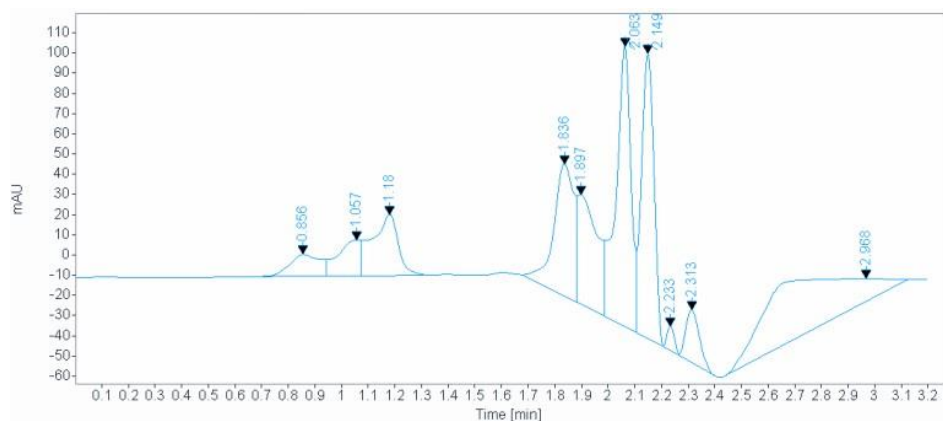


Рисунок Г32 – Хроматограмма соединения SAV-218 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 60 минут инкубации

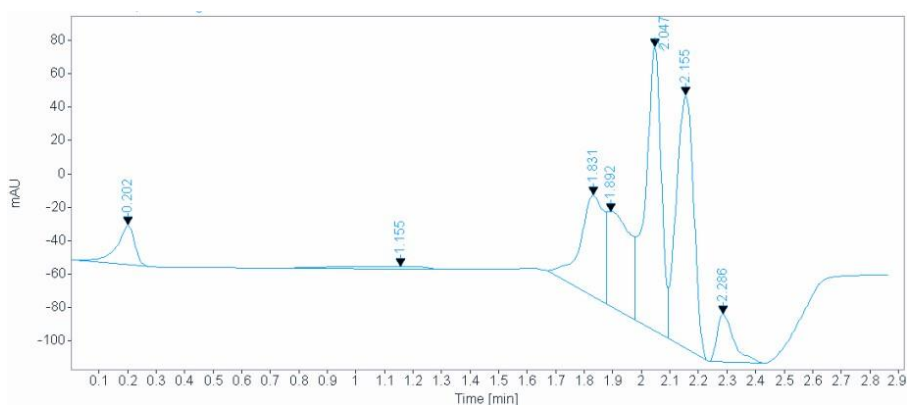


Рисунок Г33 – Хроматограмма соединения SAV-218 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 90 минут инкубации

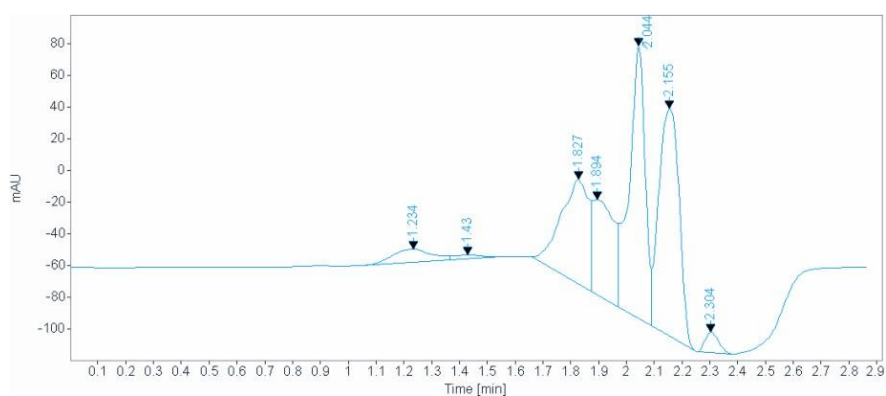


Рисунок Г34 – Хроматограмма соединения SAV-218 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 90 минут инкубации

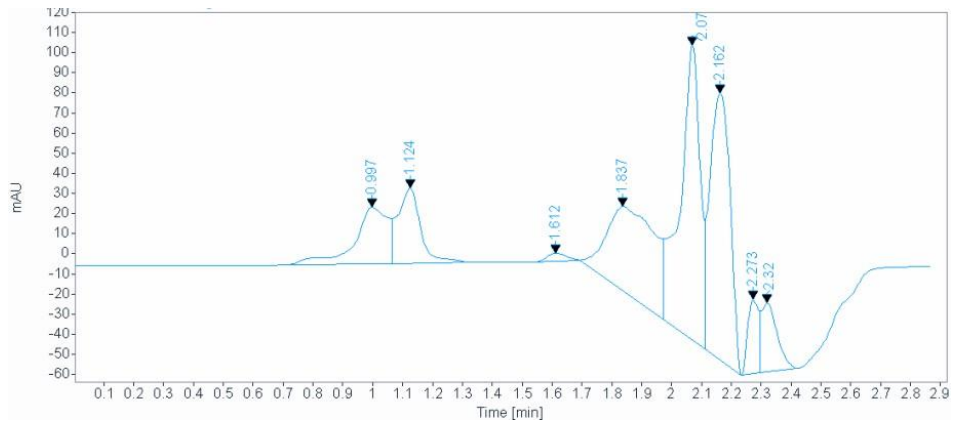


Рисунок Г35 – Хроматограмма соединения SAV-240 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 30 минут инкубации

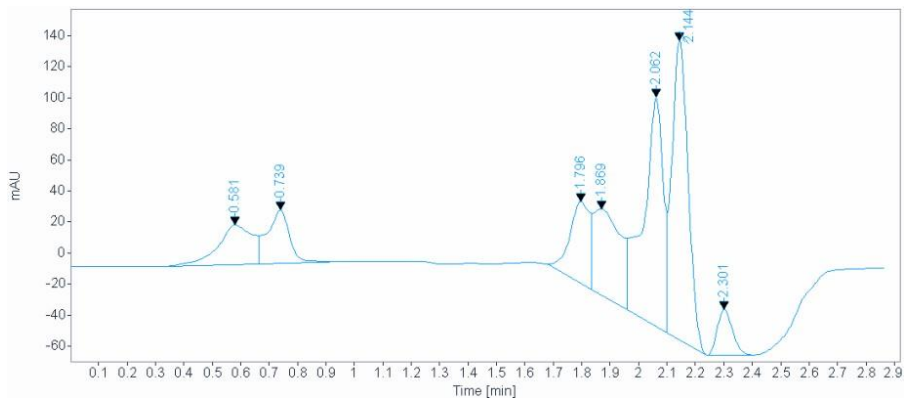


Рисунок Г36 – Хроматограмма соединения SAV-240 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 30 минут инкубации

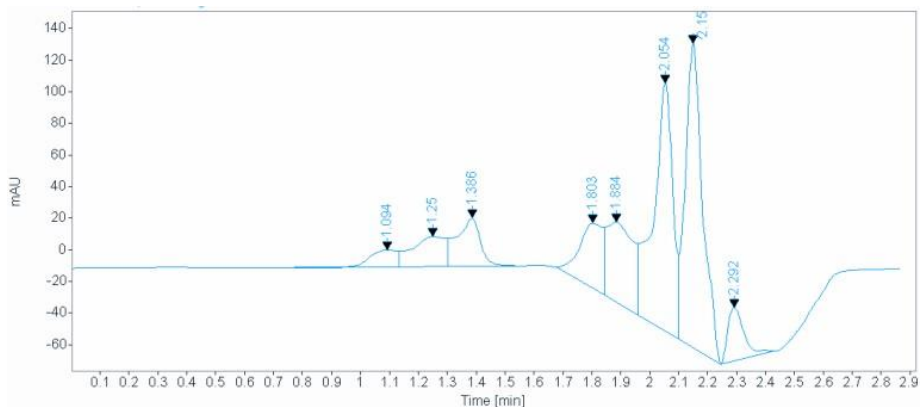


Рисунок Г37 – Хроматограмма соединения SAV-240 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 60 минут инкубации

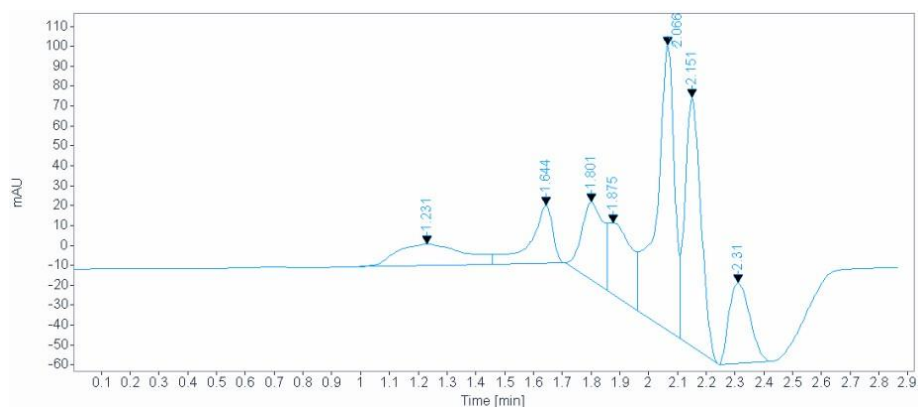


Рисунок Г38 – Хроматограмма соединения SAV-240 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 60 минут инкубации

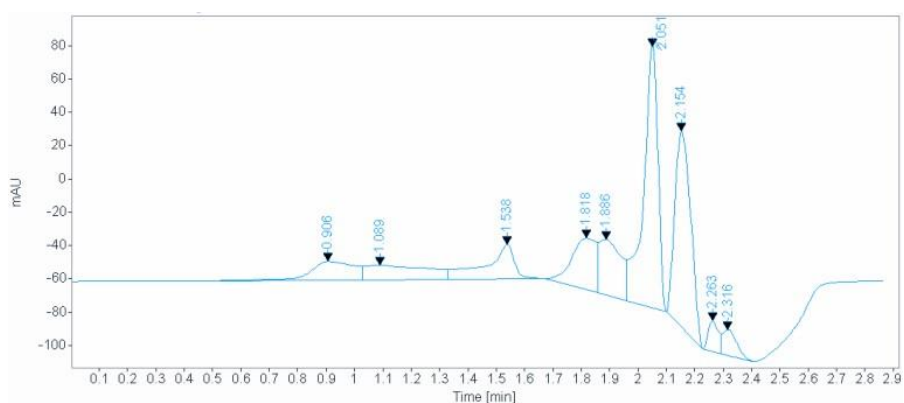


Рисунок Г39 – Хроматограмма соединения SAV-240 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 90 минут инкубации

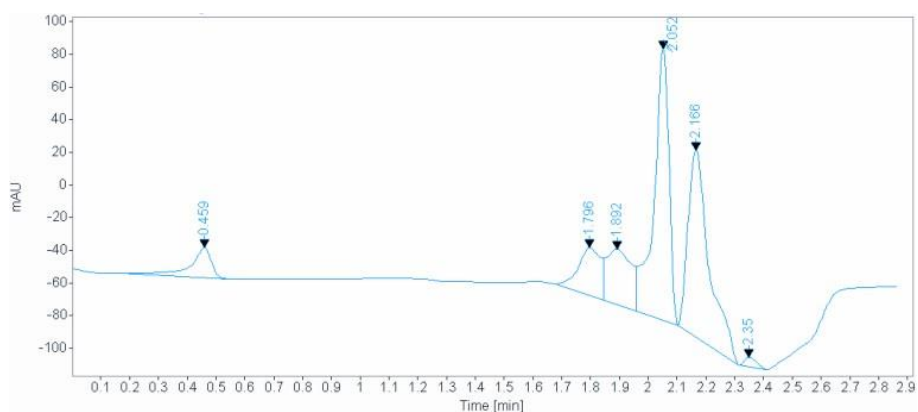


Рисунок Г40 – Хроматограмма соединения SAV-240 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 90 минут инкубации

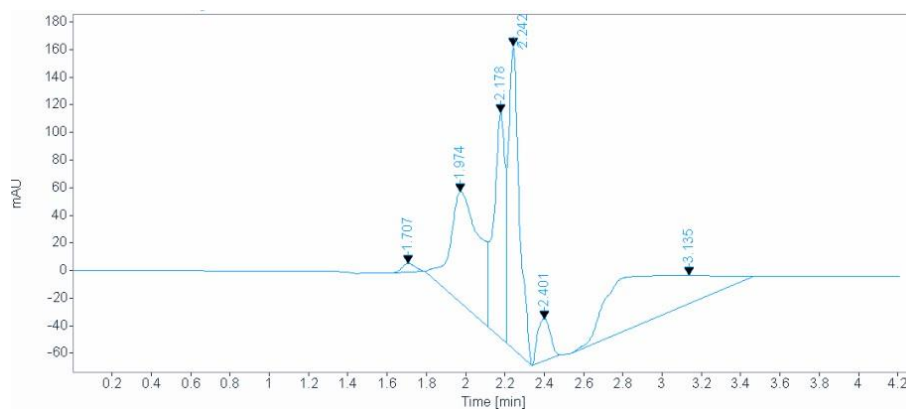


Рисунок Г41 – Хроматограмма соединения SAV-248 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 30 минут инкубации

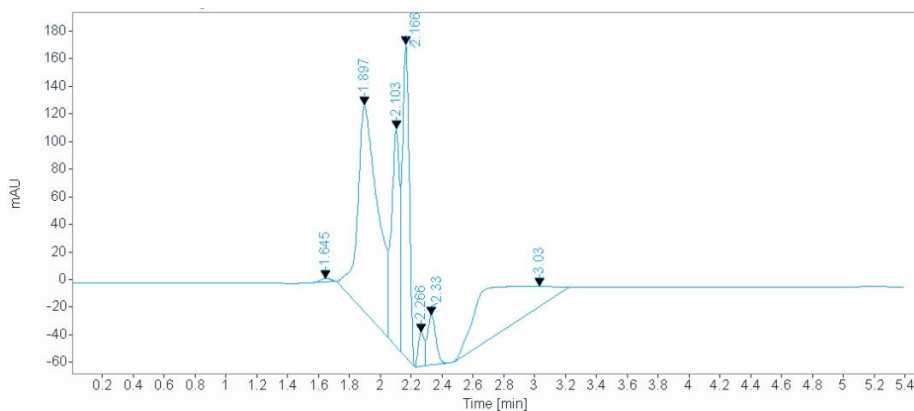


Рисунок Г42 – Хроматограмма соединения SAV-248 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 30 минут инкубации

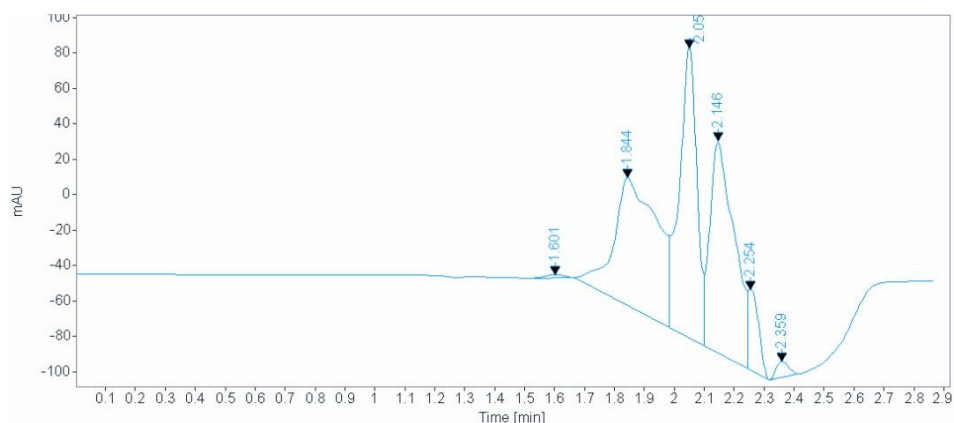


Рисунок Г43 – Хроматограмма соединения SAV-248 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 60 минут инкубации

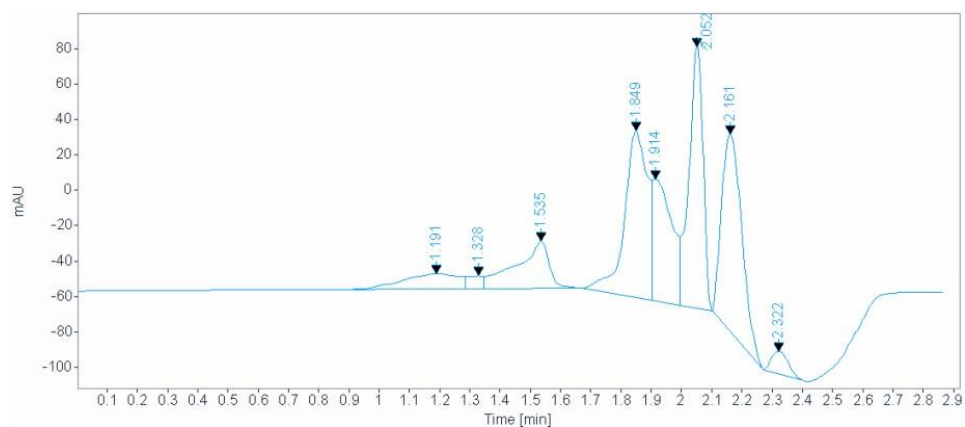


Рисунок Г44 – Хроматограмма соединения SAV-248 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 60 минут инкубации

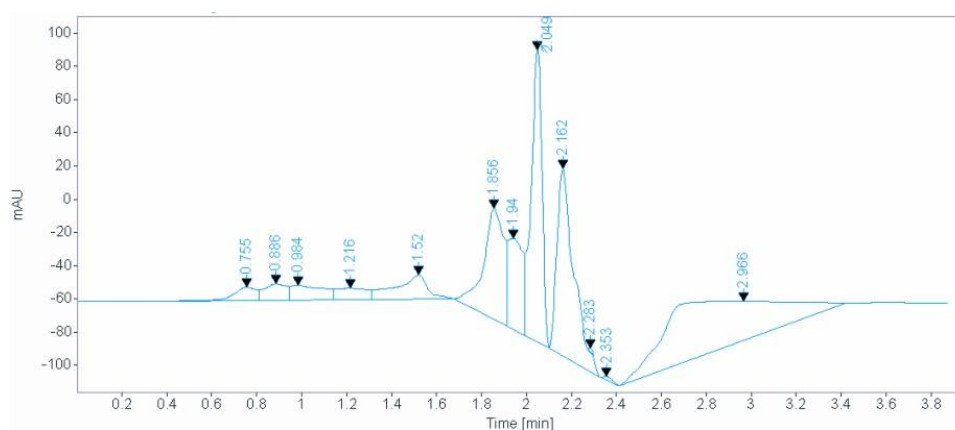


Рисунок Г45 – Хроматограмма соединения SAV-248 в направлении из апикальной в базолатеральную камеру после 90 минут инкубации

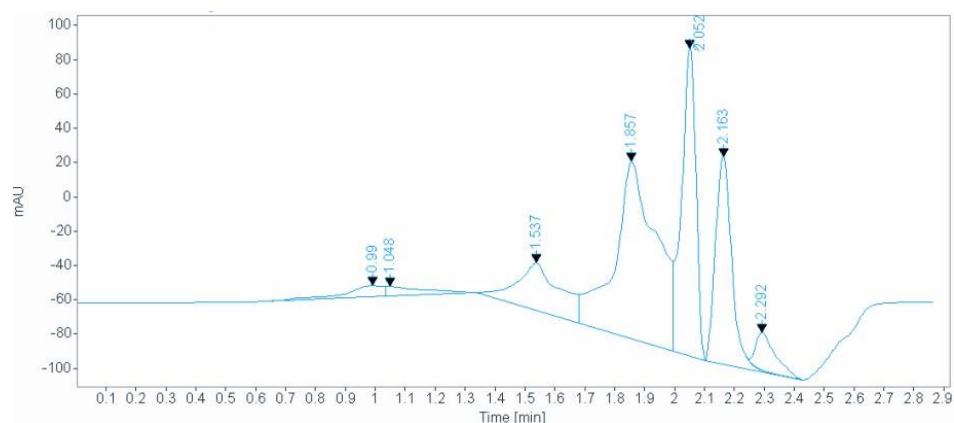


Рисунок Г46 – Хроматограмма соединения SAV-248 в направлении из базолатеральной в апикальную камеру после 90 минут инкубации