

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

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

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему: Высокопроизводительный виртуальный скрининг аллостерических
ингибиторов EGFR

Студент

А.С. Мухина

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

Д.А. Хоченков

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Консультанты

О.А. Головач

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Допустить к защите

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

(личная подпись)

« _____ » _____ 2019 г.

Тольятти 2019

АННОТАЦИЯ

Целью данной выпускной работы является поиск новых аллостерических ингибиторов EGFR, преодолевающих C797S-опосредованную резистентность к предыдущим поколениям ингибиторов тирозинкиназы, и их конструирование с помощью программного обеспечения Schrödinger.

В теоретической части работы описан анализ аллостерических ингибиторов с точки зрения механизма связывания, а так же эффективности и селективности в отношении EGFR, несущего мутацию C797S.

В экспериментальной части построена виртуальная комбинаторная библиотека соединений, проведен молекулярный докинг с использованием режимов стандартной (SP) и дополнительной точности (XP). Полученные результаты проанализированы с помощью метода MM/GBSA. По результатам проведенного виртуального скрининга найдено 6 аллостерических ингибиторов, рекомендованных к синтезу.

ABSTRACT

The title of the graduation work is “High-throughput virtual screening of allosteric inhibitors of EGFR”.

The aim of this work is to search for potential allosteric inhibitors of EGFR using Schrödinger software.

The key issue of the senior thesis is the development of non-ATP-competitive tyrosine kinase inhibitors with high selectivity for triple mutants of EGFR, which is crucial in the discovery of next-generation drugs.

The first chapter describes mechanisms of resistance to EGFR inhibitors in NSCLC carrying the mutant; overcome resistance using allosteric inhibitors of the fourth generation EGFR.

The second chapter describes the construction of a virtual combinatorial library of chemical compounds and the process of high-performance virtual screening.

The third chapter describes the study of the docking, which was carried out with the use of the Extra-precision (XP) mode of the Glide package in the Schrödinger software with default parameters. Better docking configurations based on Glide scores (G-scores) were chosen as the most likely binding conformation.

The graduation work consists of an introduction, three chapters, a conclusion, list of 65 references, all of which are foreign sources. The text of the work contains 19 figures, 6 tables.

The results show that 6 allosteric inhibitors recommended for synthesis were found basing on the data obtained.

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1 Приобретенная устойчивость к третьему поколению ингибиторов EGFR.....	9
1.1.1 C797S-опосредованная резистентность к ингибиторам EGFR.....	11
1.1.2 Механизмы резистентности к ингибиторам EGFR при НМРЛ.....	11
1.2 Ингибиторы EGFR, преодолевающие устойчивость к мутанту C797S.....	12
1.2.1 EAI045	13
1.2.2 Бригатиноб.....	15
1.2.3 4-Аминопиразолопиримидины	17
1.2.4 Тризамещенные имидазолы	18
1.2.5 2-Арил-4-аминохиназолины.....	21
1.3 Циркулирующая ДНК опухоли - маркер НМРЛ	21
1.4 Заключение и перспективы на будущее	22
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	25
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	42
3.1 Подготовка комбинаторной библиотеки	42
3.2 Подготовка молекулы белка	42
3.3 Молекулярный докинг	42
3.4 Вычисление PrimeMM/GBSA	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	Ошибка! Закладка не определена.
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	45

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяют следующие термины и их определения:

ALK	киназа анапластической лимфомы
Arg	аргинин
Asn	аспарагин
Asp	аспарагиновая кислота
BTK	тирозинкиназа Брутона
cfDNA	бесклеточная ДНК
ctDNA	циркулирующая опухолевая ДНК
Cys	цистеин
ddPCR	капельная цифровая полимеразная цепная реакция
de novo	с самого начала
EGFR	рецепторы эпидермального фактора роста
EMT	эпителиально-мезенхимальный переход
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
FGFR	рецепторы фактора роста фибробластов
GI ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования пролиферации
Gln	глутамин
Gly	глицин
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования биологической активности
IGFR	рецептор инсулиноподобного фактора роста
in silico	компьютерное моделирование
in vitro	в лабораторных условиях
in vivo	на живом организме
Leu	лейцин
Lys	лизин
Met	метионин
MM/GBSA	Метод молекулярной механики с обобщенной поверхностью
NGS	Метод секвенирования нового поколения
ORR	объективная частота ответа
PFS	выживаемость без прогрессирования
Phe	фенилаланин
SAR	отношение структура-активность

Ser	серин
VEGF	факторы роста эндотелия сосудов
VEGFR	рецепторы фактора роста эндотелия сосудов
ХР	протокол дополнительной точности
АТФ	аденозинтрифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
МРЛ	мелкоклеточный рак легких
НМРЛ	немелкоклеточный рак легких
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ХЛЛ	хронический лимфолейкоз

ВВЕДЕНИЕ

Медицинская химия занимается разработкой методов получения новых химических соединений, которые могут использоваться в качестве лекарственных средств, обладать биологической активностью и нести положительный фармакологический эффект. Одной из важнейших задач современной химии в области медицины является разработка ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) для лечения онкологических образований, в частности немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Рак легких является основной причиной смерти от рака, а мутации киназного домена EGFR являются частой причиной возникновения НМРЛ.

Пациенты с НМРЛ, несущим мутации, вначале хорошо реагируют на ингибиторы EGFR, гефитиниб и эрлотиниб, но вскоре развивается резистентность из-за появления мутации T790M. Низкомолекулярные ингибиторы третьего поколения, такие как AZD9291, HM61713, CO-1686 и WZ4002, могут преодолевать T790M посредством ковалентного связывания с Cys 797, но в конечном итоге теряют свою эффективность при появлении мутации C797S, которая устраняет ковалентную связь. Аллостерические ингибиторы EAI001 и EAI045 представляют собой новый тип ингибиторов EGFR, которые связываются с EGFR вдали от сайта связывания АТФ и не зависят от Cys 797. В связи с этим возникает необходимость поиска новых аллостерических ингибиторов EGFR путем осуществления высокопроизводительного виртуального скрининга.

Цель работы:

Поиск новых аллостерических ингибиторов EGFR и их конструирование с помощью программного обеспечения Schrödinger.

Задачи:

1. Построение виртуальной комбинаторной библиотеки соединений;
2. Осуществление процедуры молекулярного докинга для данной библиотеки соединений в режимах стандартной SPи дополнительной точности XP и MM/GBSA;
3. Отбор соединений по показателям оценочных функций;
4. Анализ ключевых взаимодействий между соединением, которое прошло отбор, и белком.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Четверть всех случаев смерти от рака связана с раком легких, и 5-летняя относительная выживаемость пациентов в настоящее время составляет менее 20% [1]. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) является наиболее распространенным подтипом рака легких, на долю которого приходится около 80-85% случаев заболевания [2]. Представитель семейства ErbB, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) важен для пролиферации, выживания, миграции, адгезии и дифференцировки клеток и является одной из наиболее важных мишеней при лечении НМРЛ [3]. Единичная активирующая мутация в геноме опухоли у пациентов, например, замена одной аминокислоты в экзоне 21 (L858R) или делеция в экзоне 19 (delE746-A750, del19), требует лечения ингибиторами EGFR. [4]. В 2009 и 2013 годах FDA одобрило ингибитор EGFR первого поколения gefитиниб и эрлотиниб для лечения НМРЛ, несущего активирующие мутации EGFR, что привело к массивному и быстрому уменьшению объема опухоли [5]. Однако у пациентов обычно развивается вторичная лекарственная устойчивость T790M после 12 месяцев лечения [6]. Клиническое применение необратимого ингибитора второго поколения афатиниба (BIBW2992) ограничено из-за плохого терапевтического окна [7]. В настоящее время разрабатываются ингибиторы EGFR третьего поколения для преодоления резистентности, вызванной мутацией T790M, при сохранении EGFR дикого типа (рис. 1).

WZ4002 является первым зарегистрированным ингибитором третьего поколения, обладающим в 30-100 раз большей эффективностью против мутанта EGFR^{T790M}, чем против EGFR дикого типа [8]. Во второй фазе исследования руксолитиниба¹ (также известный как CO-1686, структурно сходный с WZ4002), T790M-положительные пациенты, прошедшие лечение, поддерживают скорость реакции 59% (27 из 46 пациентов) и высокий уровень контроля над заболеванием (93%), но T790M-отрицательные пациенты демонстрируют более низкие показатели 29% и 59%, соответственно [9].

Clovis остановил дальнейшую разработку руксолитиниба после того, как FDA отклонило запрос на ускоренное одобрение с требованием увеличить количество рандомизированных данных [10]. По данным клинических исследований руксолитиниб может вызывать гипергликемию путем нецелевого ингибирования рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR) и киназы инсулинового рецептора [11, 12]. Осимертиниб² (также известный как AZD9291), содержащий моноанилинопиримидиновый скаффолд, первый в мире одобренный ингибитор EGFR для T790M-положительных пациентов с НМРЛ в 2015 году после прогресса предыдущих поколений ингибиторов тирозинкиназы [13]. Олмутиниб³ (известный как HM61713),

содержащий ядро тиено[3,2-*d*]пиримидина, одобрен Министерством продовольственной и лекарственной безопасности Кореи в 2016 году для лечения пациентов с НМРЛ, несущим мутацию T790M. Другие ингибиторы EGFR третьего поколения, в том числе назартиниб **4** (EGF816, NCT02108964), наквотиниб **5** (ASP8273, NCT02500927), авитиниб **6** (AC0010, NCT02274337), и **7** (PF06747775, NCT02349633) в настоящее время находятся на ранних стадиях клинических испытаний [14-18].

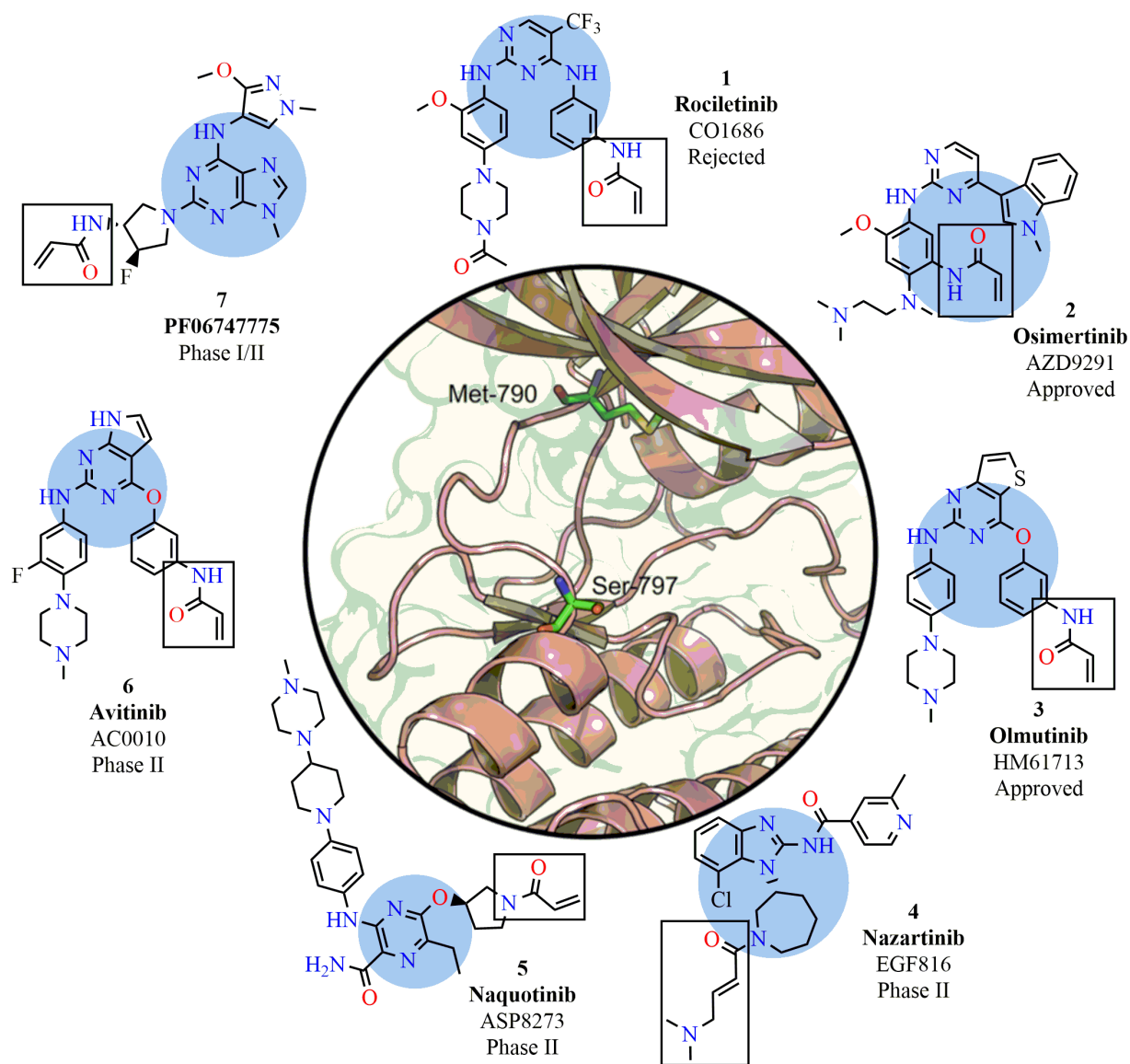


Рисунок 1 –Ингибиторы EGFR третьего поколения и статус их клинических испытаний

1.1 Приобретенная устойчивость к третьему поколению ингибиторов EGFR

Несмотря на успехи терапии ингибиторами EGFR третьего поколения, приобретенная резистентность остается значительной проблемой в продолжительности жизни пациента. Клинические испытания и экспериментальные модели *in vitro* соединений **1-3** указывают на многочисленные механизмы устойчивости, частично приписываемые

известной гетерогенности клеточной популяции НМРЛ. Наиболее признанные механизмы устойчивости к ингибиторам EGFR третьего поколения (табл. 1): EGFR-зависимая амплификация лиганда/рецептора и третичные мутации аминокислоты в сайте АТФ киназного домена, например, C797S, L718Q, G796D, L792F/Н, L798I, L692V, амплификация EGFR; EGFR-независимый (обходной) путь, обусловленный изменениями сигнальных каскадов, таких как MET, FGFR, передача сигналов IGF1R; трансформация фенотипа, например, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) и трансформация в мелкоклеточный рак легкого (МРЛ) [9, 19-30]. Среди всех этих возможных механизмов, третичная мутация C797S в киназном домене EGFR является наиболее сложным случаем и по клиническим данным встречается более чем у 20% заболевших [14, 31].

Таблица 1 – Механизмы устойчивости к ингибиторам EGFR третьего поколения

Лекарственное средство	Тип резистентности	Механизмы резистентности
Осимертиниб	EGFR-зависимые механизмы	Мутация C797S/C797G
		L718Q
		G796D
		L792F/Н
		Потеря T790M
		Сверхэкспрессия лиганда EGFR
	EGFR-независимые механизмы	Амплификация EGFR
		Амплификация с-MET
		Амплификация ErbB2
		Трансформация в МРЛ
		Мутация NRAS/KRAS
		Мутация BRAF V600E
		Активация сигнального пути SFK/FAK
		Мутация PIK3CA E545K
Руксолитиниб	EGFR-зависимые механизмы	Мутация C797S
		L798I
		E709K
		L692V
		L718Q
	EGFR-независимые механизмы	L844V
		Амплификация с-MET
		Амплификация ErbB2
		Мутация KRAS
		Мутация PIK3CA E545K
Олмутиниб	EGFR-зависимые механизмы	Мутация C797S
		Мутация C797S
WZ4002	EGFR-зависимые механизмы	L718Q
		L844V
	EGFR-независимые механизмы	Активация IGF1R

1.1.1 C797S-опосредованная резистентность к ингибиторам EGFR

Ингибиторы EGFR третьего поколения содержат акцептор Михаэля, который может реагировать с активными тиолами Cys797 в АТФ-связывающем домене EGFR, тем самым образуя ковалентную связь. Однако мутантный EGFR^{C797S} не может образовывать ковалентную связь с ингибиторами EGFR третьего поколения, поскольку серин не способен к образованию ковалентной связи с акцептором Михаэля в физиологических условиях, тем самым обеспечивается ключевой механизм устойчивости. В 2014 году Byrd и коллеги сообщили о мутации цистеина в серин в тирозинкиназе Брутона (ВТК), которая придает устойчивость к ингибитору EGFR, ибрутинибу, при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) [32, 33]. Результаты указывают на то, что устойчивость к ВТК C481S согласуется с механизмом резистентности мутации EGFR^{C797S}. Thress и другие выполнили капельную цифровую ПЦР (ddPCR), используя циркулирующую свободную ДНК (cfDNA), собранную у 15 пациентов, принимавших осимертиниб 2 в I/II фазе исследования AURA (NCT01802632) [19]. Результаты показали, что приобретенная мутация C797S встречается у значительной части пациентов с резистентностью к осимертинибу (6 из 15 случаев, 40%). В другом случае, у пациентки с аденокарциномой легкого IV стадии, у которой уже имеются делеция 19 экзона EGFR и вторичные мутации T790M, развивается третичная мутация C797S после 9 месяцев лечения осимертинибом 2 [34]. Ahn и коллеги сообщили о случае мутации C797S в качестве механизма резистентности к олмутинибу 3 [35]. В исследовании I/II фазы у 57-летней женщины с делецией 19 экзона EGFR развивается мутация T790M после лечения гефитинибом и приобретает мутация C797S после 17 месяцев лечения олмутинибом 3. Недавнее клиническое исследование с использованием осимертиниба 2 в качестве первой линии лечения прогрессирующего НМРЛ, несущего мутанта EGFR, (NCT01802632) продемонстрировало устойчивую ORR и пролонгированную PFS у пациентов. Но у 2 из 9 пациентов с резистентностью обнаружена мутация EGFR^{C797S} [36].

1.1.2 Механизмы резистентности к ингибиторам EGFR при НМРЛ

В дополнение к приобретенной мутации C797S EGFR-независимый путь также приводит к устойчивости к ингибиторам EGFR третьего поколения. Исследование, основанное на биопсии тканей после лечения осимертинибом 2, показало, что амплификация MET является одним из приобретенных механизмов резистентности [26]. Стратегия комбинированных ингибиторов EGFR с подавлением передачи сигналов по EGFR-независимому пути достигает хороших результатов в лечении пациентов, эффективна в замедлении или преодолении приобретенной резистентности.

Большинство стратегий основывалось на использовании блокатора EGFR в сочетании с ингибитором EGFR-независимого пути, Моогес и другие недавно разработали антитело со способностью ингибировать первичные/приобретенные мутации EGFR, а также сигнальный путь MET [15, 37, 38]. В таблице 2 перечислены текущие клинические испытания, проводимые для оценки комбинированной терапии ингибиторами EGFR третьего поколения с ингибиторами EGFR-независимого пути. В настоящее время продолжаются более 13 ранних клинических испытаний осимертиниба **2**, в том числе TORC1/2 (NCT02503722), Bcl2 (NCT02520778), VEGFR2 (NCT02789345), MEK (NCT02143466), MET (NCT02143466), Abl1/Src (NCT02954523), JAK-1 (NCT02917993), FGFR (NCT02664935) и АКТ (NCT02664935).

Таблица 2 – Комбинированные испытания ингибиторов EGFR третьего поколения

Ингибитор EGFR	Комбинированный препарат	Мишень комбинированного препарата	Спонсор	Фаза	Идентификатор пробной версии
Осимертиниб	INK128	TORC1/2	National Cancer Institute	1	NCT02503722
	Навитоклак	Bcl2	National Cancer Institute	1b	NCT02520778
	Рамуцирумаб	VEGFR	Eli Lilly and Company	1	NCT02789345
	Бевацизумаб	VEGF	European Thoracic Oncology Platform	2	NCT03133546
	Селуметиниб	MEK	AstraZeneca	1b	NCT02143466
	AZD6094	MET	AstraZeneca	1b	NCT02143466
	Дазатиниб	Abl1/Src	Giuseppe Giaccone	1/2	NCT02954523
	Итацитиниб	JAK-1	Incyte Corporation	1/2	NCT02917993
	AZD4547	FGFR	University of Birmingham	2	NCT02664935
	AZD2014	TORC1/2	University of Birmingham	2	NCT02664935
	Кризотиниб	ALK/MET/ROS1	University of Birmingham	2	NCT02664935
	Селуметиниб	MEK	University of Birmingham	2	NCT02664935
AZD5363	АКТ	University of Birmingham	2	NCT02664935	
Назартиниб	INC280	MET	Novartis Pharmaceuticals	1/2	NCT02335944
Руксолитиниб	Траметиниб	MEK	Clovis Oncology, Inc.	1/2	NCT02580708

1.2 Ингибиторы EGFR, преодолевающие устойчивость к мутанту C797S

Мутация EGFR^{C797S} является наиболее распространенным механизмом приобретенной резистентности к ингибиторам EGFR третьего поколения. Niederst и коллеги сообщили, что взаимное расположение мутаций T790M и C797S после лечения ингибиторами EGFR третьего поколения может повлиять на последующие этапы клинического лечения [39]. Например, в случаях мутаций C797S и T790M в транс-

положении раковые клетки устойчивы к ингибиторам третьего поколения, но чувствительны к комбинированному лечению ингибиторами первого и третьего поколений. Однако если мутации находятся в цис-положении, то нынешние ингибиторы EGFR неэффективны в подавлении прогрессирующей опухоли [39]. Wang и другие впервые сообщили о клинической эффективности комбинированного лечения ингибиторами EGFR первого и третьего поколений, нацеленных на мутации EGFR^{T790M} и EGFR^{C797S} в транс-положении [40]. Однако через 3 месяца PFS у пациента наблюдалось обострение с появлением мутанта EGFR^{C797S}, расположенного в цис-положении к T790M.

Новые агенты для преодоления мутаций EGFR^{L858R/T790M/C797S} или EGFR^{del19/T790M/C797S} являются важными. Структурные исследования мутантов EGFR дают бесценную информацию о способах связывания и фармакологическом значении. Недавно Kong и коллеги создали сложные кристаллические структуры мутантов EGFR^{T790M/C797S} и обнаружили, что мутация C797S увеличивает локальную гидрофильность вокруг остатка 797, не влияя на структуру и функцию киназного домена [41]. Поэтому, помимо важности ковалентного связывания с Cys797, конструирование низкомолекулярных ингибиторов, которые усиливают связывающую способность с другими областями киназного домена EGFR, и идентификация новых аллостерических сайтов, являются ключевыми элементами в разработке ингибиторов EGFR четвертого поколения.

1.2.1 EAI045

В поисках аллостерического ингибитора EGFR Jia и другие проверили библиотеку 2,5 миллионов соединений, выявив EAI001 **8** (рис. 2, фигура (A)), *N*-(4,5-дигидро-1,2,4-триазол-2-ил)-2-(1-оксоизоиндолин-2-ил)-2-фенилацетамид [42, 43]. Данное соединение обладает селективностью в отношении мутанта EGFR^{L858R/T790M}, но не затрагивает EGFR дикого типа. Скрининг при высокой концентрации АТФ также подтверждает, что EAI001 **8** является не-АТФ-конкурентным (аллостерическим) ингибитором.

Сокристаллическая структура EAI001 **8** с мутантной киназой EGFR^{T790M} показывает ингибитор, связанный с аллостерическим сайтом рядом с классическим АТФ-связывающим карманом, который частично образован смещением наружу структуры α -спирали (рис. 2, фигура (D)) [42]. EAI001 **8** связывается как “трехлопастный винт” или “Y-образная” конфигурация [14]. Как показано на рисунке 2 (фигура (B)), аминотриазольный фрагмент располагается до T790M, что объясняет селективность по отношению к мутанту EGFR^{T790M}.

Фенильная группа встраивается в гидрофобный промежуток в задней части АТФ-связывающего кармана, тем самым взаимодействуя с остатками Leu-777 и Phe-856, в то время как третий участок, оксоизоиндолильный фрагмент, простирается вдоль α С-спирали в направлении области, открытой для растворителя. Кроме того, амидная группа из EAI001 **8** образует водородную связь с Asp-855 в мотиве Asp-Phe-Gly (DFG) [42]. Дальнейшая оптимизация химического состава его фенильной группы приводит к получению более мощного ингибитора EAI045 **9** (рис. 2, фигура С, EGFR^{L858R/T790M} IC₅₀=3 нМ) и позволяет сохранить 1000-кратную селективность в отношении EGFR дикого типа.

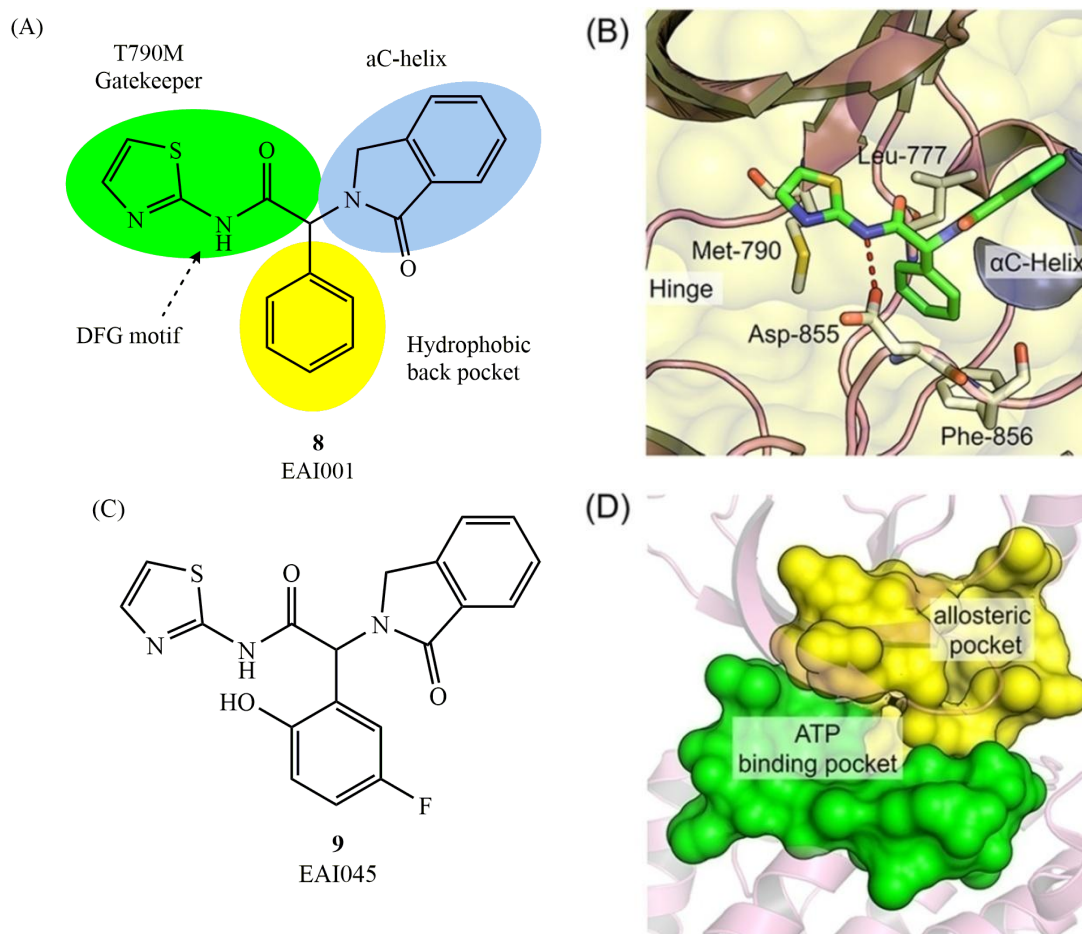


Рисунок 2 – Структура и режим связывания аллостерических ингибиторов **8-9**
 (А) Химическая структура **8**. (В) Вид **8** с мутантом EGFR^{T790M/V948R} (С) Химическая структура **9**. (D) Вид АТФ-связывающего кармана EGFR и созданного аллостерического сайта.

Однако сайт связывания EAI045 **9** создан движением α С-спирали, когда киназа EGFR находилась в неактивной конформации. Две субъединицы асимметричного димера ErbB делают аллостерический сайт связывания недоступным ингибитору **9**; таким образом, эффективность использования только одного агента EAI045 ограничена. При комбинации используют димер-разрушающее антитело цетуксимаб так, что каждый

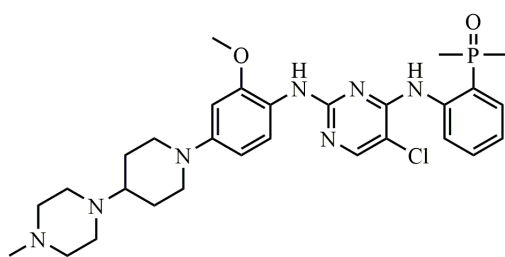
домен киназы EGFR может быть доступен для ингибитора EAI045. Соединение EAI045 **9** синергизируется с цетуксимабом, чтобы способствовать регрессии опухоли мутантов EGFR^{L858R/T790M} и EGFR^{L858R/T790M/C797S} на мышинной модели рака легких [44]. Из-за связывания EAI045 с аллостерическим сайтом вдали от активного сайта предполагается, что комбинированное использование АТФ сайт-направленных ингибиторов и EAI045 **9** преодолевает приобретенную устойчивость. Ингибитор EGFR второго поколения нератиниб не только занимает сайт АТФ, но также распространяется в аллостерический карман, занимая две из трех “лопастей” EAI045 [45]. Структурный дизайн ингибиторов EGFR четвертого поколения, обеспечивающих взаимодействие как с АТФ, так и с аллостерическим сайтом, имеет большое значение.

1.2.2 Бригатиниб

Duong-Ly и коллеги провели скрининг 183 низкомолекулярных соединений против 76 устойчивых к лекарственным средствам мутантных киназ и сообщили о потенциальных возможностях повторного использования ингибиторов киназы, одобренных FDA [46]. На основании данной информации Uchibori и другие провели целенаправленный скрининг лекарственных препаратов для изучения их эффективности в отношении тройного мутанта EGFR^{del19/T790M/C797S} [47]. Из 30 отобранных соединений бригатиниб **10** эффективно ингибирует пролиферацию клеток Ва/Ф3, несущих тройную мутацию. В отличие от механизма ингибирования EAI045 **9**, бригатиниб **10** действует на киназный домен EGFR путем конкурентного ингибирования связывания АТФ [47]. Бригатиниб **10** разработан в качестве ингибитора следующего поколения, нацеленного на киназу анапластической лимфомы (ALK). Несколько других ингибиторов ALK с химической структурой, аналогичной **10**, также были исследованы, а именно **11** (ТАЕ684), **12** (ASP3026), **13** (аналог AP26113), **14** церитиниб и **15** (AZD3463) (рис. 3) [48, 49].

Исходный анализ отношения структура-активность (SAR) выявляет функциональные группы, важные для поддержания активности к тройному мутанту EGFR. Замена 4-метилпиперазиновой группы в **10** диметиламиногруппой в **13** едва ли влияет на ингибирующую активность в отношении тройного мутанта EGFR^{del19/T790M/C797S}. Однако введение изопропилсульфонильной в **11** и индольной в **15** групп снижает активность в отношении тройного мутанта EGFR, это означает, что фосфиноксидная группа в **10** более предпочтительна. Удаление хлорида в **12** приводит к значительной потере активности, и, кроме того, изопропокси группа в **14** может оказывать отрицательное влияние на ингибирующую активность. Исследования стыковки *in silico* показывают, что 2-аминопиримидин в бригатиниб **10** образует две водородные связи с

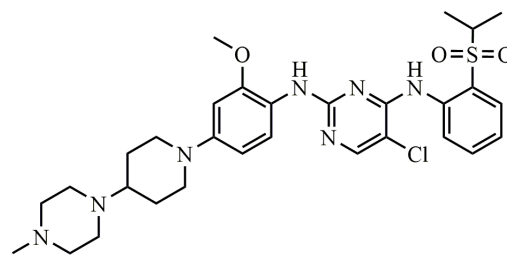
амидом основной цепи остатка Met793 и помещается в карман без стерических помех с C797S или T790M.



10

Brigatinib

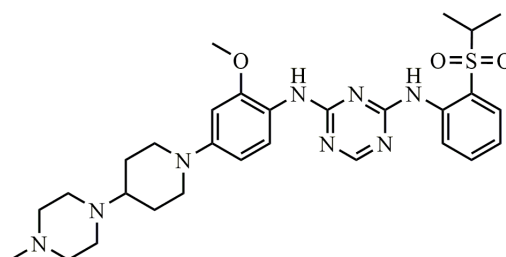
GI_{50} (Ba/F3-EGFR-del19/T790M/C797S)
= 67.2 nM



11

TAE684

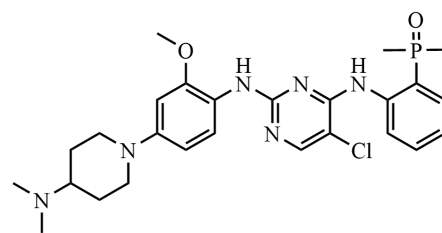
GI_{50} (Ba/F3-EGFR-del19/T790M/C797S)
= 340.7 nM



12

ASP3026

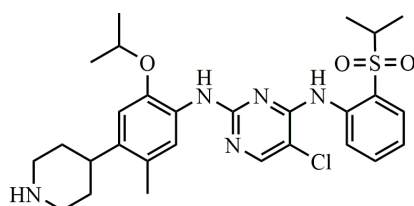
GI_{50} (Ba/F3-EGFR-del19/T790M/C797S)
= 1508 nM



13

AP26113-analog

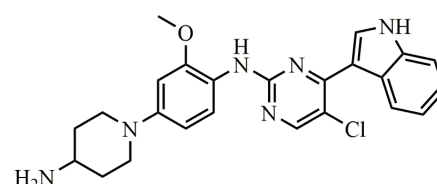
GI_{50} (Ba/F3-EGFR-del19/T790M/C797S)
= 59.1 nM



14

Ceritinib

GI_{50} (Ba/F3-EGFR-del19/T790M/C797S)
= 780.5 nM



15

AZD3463

GI_{50} (Ba/F3-EGFR-del19/T790M/C797S)
= 131.5 nM

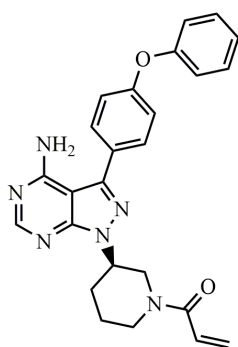
Рисунок 3 – Химическая структура ингибиторов **10-15** и их активность по ингибированию роста клеток Ba/F3, экспрессирующих del19/T790M/C797S

Фосфиноксидная часть полностью занимает трифосфатсвязывающую область в АТФ-связывающем кармане, обеспечивая электростатические или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Связанные с фосфиноксидом фенильные и пиперидиновые группы вносят меньший вклад в состав, чем другие компоненты, и допускают дальнейшую структурную модификацию. В эксперименте на мышах с имплантированными EGFR^{del19/C797S/T790M}-экспрессирующими клетками РС9 обработка бригатинибом **10** при 75 мг/кг в день показала значительное ингибирование роста опухоли по сравнению с осимертинибом **2** (50 мг/кг в день). Введение бригатиниба **10** (75 мг/кг) в сочетании с цетуксимабом (1 мг на мыш) три раза в неделю синергически подавляло рост

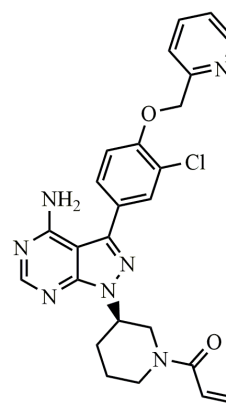
экспрессирующих EGFR^{del19/C797S/T790M} клеток *in vivo* [47]. Данное исследование *in vivo* демонстрирует потенциал бригаиниба. Вторая фаза исследований продолжается для оценки предварительной противоопухолевой активности бригаиниба **10**, как при НМРЛ с перестройкой гена ALK, так и с мутантным EGFR (NCT01449461). Однако бригаиниб является ингибитором, нацеленным на множественные киназы, включая ALK, ROS1, FLT3 и EGFR. Предполагается, что бригаиниб **10** может быть соединением-лидером для разработки ингибиторов EGFR следующего поколения. Крайне важно разработать более специфичные и мощные ингибиторы против тройных мутантов EGFR методами медицинской химии.

1.2.3 4-Аминопиразолопиримидины

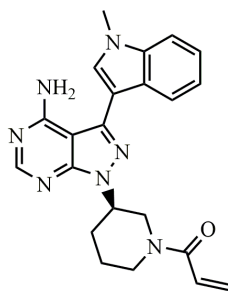
4-Аминопиразолопиримидин является одним из важных фармакофоров, связывающихся с широким диапазоном киназ [50]. Наиболее тщательно изученная молекула 4-аминопиразолопиримидина -ибрутиниб**16** (рис. 4), обладает высокой противоопухолевой активностью по отношению к мутанту EGFR и в настоящее время находится в I/II фазе клинического испытания на НМРЛ (NCT02321540) [51].



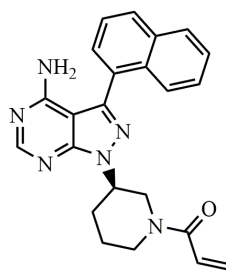
16
Ibrutinib



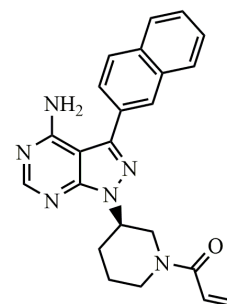
17
CHMFL-EGFR-202
GI₅₀ (Ba/F3-EGFR/T790M-L858R) < 0.3 nM
(Ba/F3-EGFR/T790M-L858R/C797S) = 7900 nM



18
IC₅₀ EGFR kinase (WT) = 35 nM
(T790M/C797S) = 2.5 nM
(L858R/T790M/C797S) = 838 nM



19
IC₅₀ EGFR kinase (WT) = 58 nM
(T790M/C797S) = 1.9 nM
(L858R/T790M/C797S) = 7900 nM



20
IC₅₀ EGFR kinase (WT) = 16 nM
(T790M/C797S) < 1 nM
(L858R/T790M/C797S) = 88 nM

Рисунок 4 – Химическая структура ингибиторов **16-20** и их активность в отношении киназы EGFR и ее мутантных форм

На основании исследования ибрутиниба Wang и коллеги обнаружили SHMFL-EGFR-202 **17** с высокой активностью в отношении резистентного к лекарственным средствам мутанта EGFR^{L858R/T790M} ($IC_{50} < 0.3$ нМ) [52]. Однако соединение **17** обладает только умеренной антипролиферативной активностью в изогенных клеточных линиях EGFR-Вa/F3, содержащих мутацию C797S ($IC_{50} > 2$ мкМ).

Engel и другие сообщили о трех 4-аминопиразолопиримидинах **18-20** (рис. 4) и оценили их эффективность в отношении устойчивых к лекарственным средствам мутантов EGFR, включая недавно обнаруженную третичную мутацию EGFR^{C797S} [53].

Соединения **18-20** демонстрируют превосходное ингибирование в клетках H1975 (значения $GI_{50} = 0.21$ мкМ, 0.49 мкМ и 0.14 мкМ соответственно). Соединение **20**, содержащее 2-нафталиновый фрагмент, обладает высокой активностью в отношении мутанта EGFR^{L858R/T790M/C797S} с $IC_{50} = 88$ нМ. Соединение **20** структурно похоже на соединение SHMFL-EGFR-202 **17**, которое имеет умеренную активность. Для дальнейшего подтверждения необходимо дополнительное исследование соединения **20** на линиях клеток с мутацией C797S, а также *in vivo*.

1.2.4 Тризамещенные имидазолы

Посредством скрининга на селективность ингибитора p38 α MAP-киназы **21** (рис. 5), Selig и коллеги обнаружили, что EGFR является одной из его мишеней [54].

Поскольку соединение **21** обладает низкой токсичностью, Laufer и другие разработали целевые стратегии для обнаружения новых ингибиторов EGFR против мутантов EGFR^{L858R/T790M} и EGFR^{L858R/T790M/C797S}, основываясь на **21** [55, 56]. Путем замены ароматической фенильной группы в **21** на цепь алифатического спирта образуются активные соединения **22** (содержит 2-гидроксипропил) и **23** (содержит 4-гидроксипропил), которые ингибируют тройного мутанта со значениями IC_{50} 7.6 нМ (**22**) и 8.4 нМ (**23**), соответственно. Для сравнения, соединение **2** демонстрирует примерно в 35 раз более слабую активность, чем **22** и **23**, при значении $IC_{50} = 278$ нМ [56]. Исследования молекулярной стыковки показывают, что цепи алифатических спиртов образуют водородные связи с Asn-842, благоприятствуя тем самым увеличению ингибирующей активности [55].

Laufer и коллеги провели скрининг около 2000 соединений, которые структурно родственны с **21**, и обнаружили **24** в качестве перспективного соединения-лидера для дальнейшей модификации [55]. Исследование SAR привело к разработке активных

соединений, содержащих множество гидрофобных и полярных взаимодействий с несколькими областями внутри АТФ-связывающего домена EGFR. Соединения **25-27**, содержащие акцептор Михаэля **25** и **27** и без него **26**, обратимо ингибируют тройной мутант EGFR^{L858R/T790M/C797S} с низкими наномолярными значениями IC₅₀ [57]. Исследования *insilico* **25** с мутантом EGFR^{T790M/C797S} показывают, что аминопиридиновая часть связывается с шарнирной областью с бидентатными водородными связями, а фторфенильная группа способствует гидрофобным взаимодействиям с окружающими остатками (рис. 6, фигура (A), (B)).

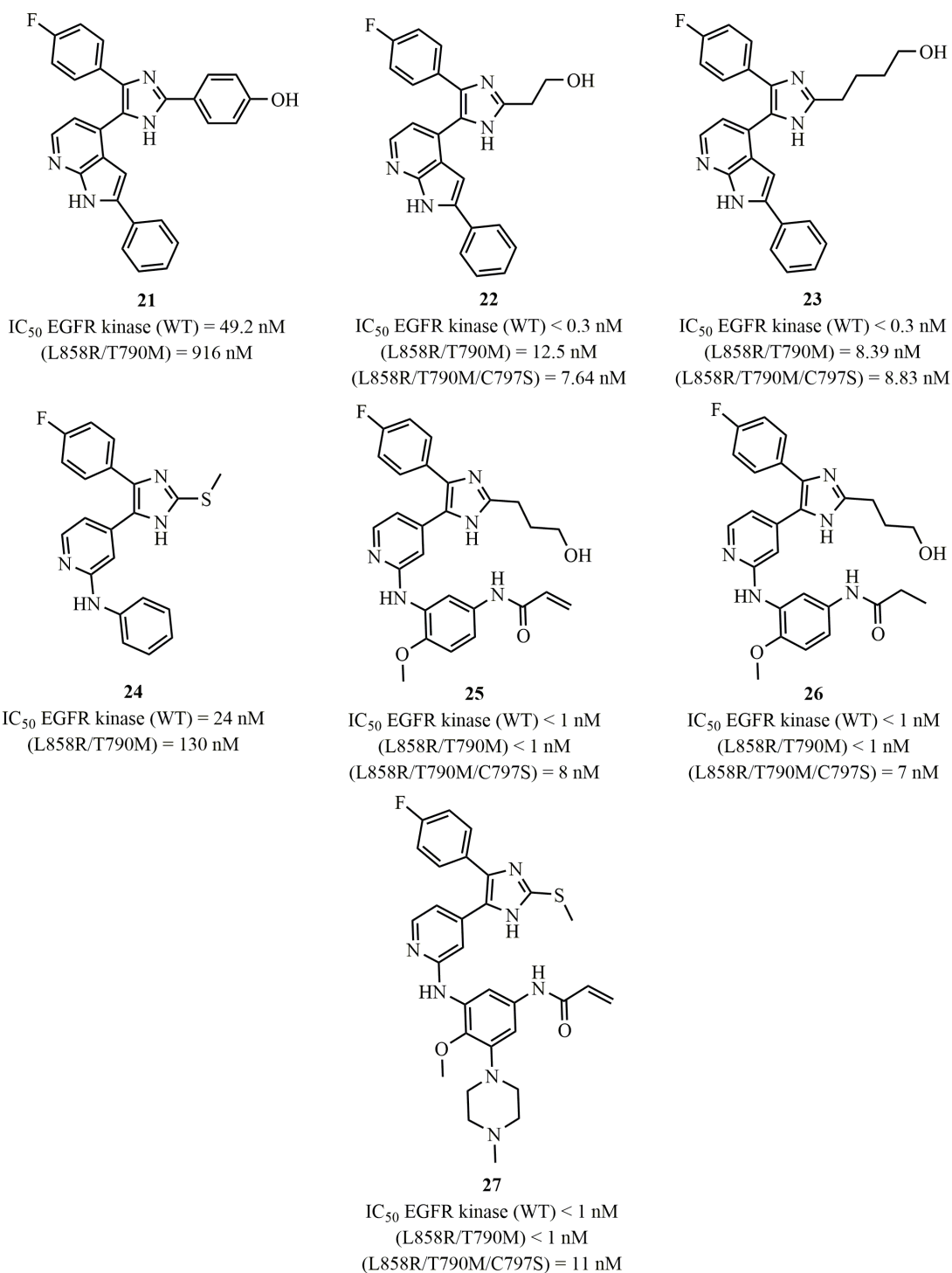


Рисунок 5 – Химическая структура ингибиторов **21-27** и их активность в отношении киназы EGFR и ее мутантов

Происходит полярный контакт между гидроксильной группой и Arg-841. Две водородные связи образуются между карбонильной группой и мутировавшим Ser-797. Что касается открытия ингибиторов, нацеленных на C797S, соединения без акцептора Михаэля (например, **26**) могут быть более селективными и безопасными, поскольку они теряют способность ковалентно связываться с киназами, которые не являются мишенью ингибитора.

Тризамещенные имидазолы могут служить потенциальными соединениями для дальнейшей разработки высокоэффективных ингибиторов EGFR четвертого поколения. Дополнительная оптимизация должна снизить ингибирующую активность в отношении EGFR дикого типа.

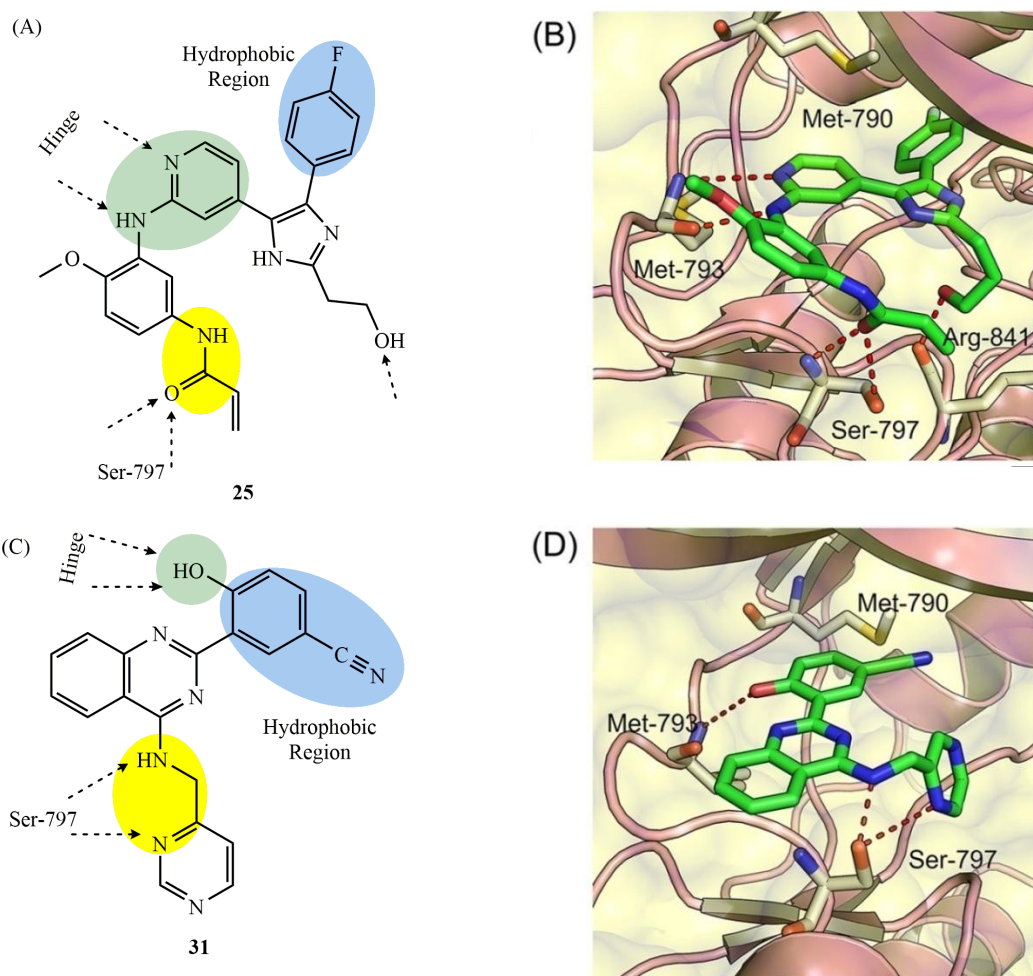


Рисунок 6 – Связывание ингибиторов с мутантом EGFR^{C797S/T790M}

(A) Химическая структура **25** и его изображенный режим связывания; (B) Режим связывания **25** с мутантом EGFR^{C797S/T790M}; (C) Химическая структура **31** и его способ связывания; (D) Режим связывания **31** с мутантом EGFR^{C797S/T790M}

1.2.5 2-Арил-4-аминохиназолины

Park и другие полагались на стратегию двухэтапного виртуального скрининга для поиска селективных ингибиторов против мутанта EGFR^{del/T790M/C797S} с низкой свободной энергией связывания, но высокой свободной энергией связывания с EGFR дикого типа [58]. После виртуального и экспериментального скрининга базы данных 670000 химических соединений найдено соединение-хит **28** (рис. 7), обладающее субмикромольной ингибирующей активностью в отношении мутанта EGFR^{del/T790M/C797S} и 163-кратной селективностью по отношению к EGFR дикого типа.

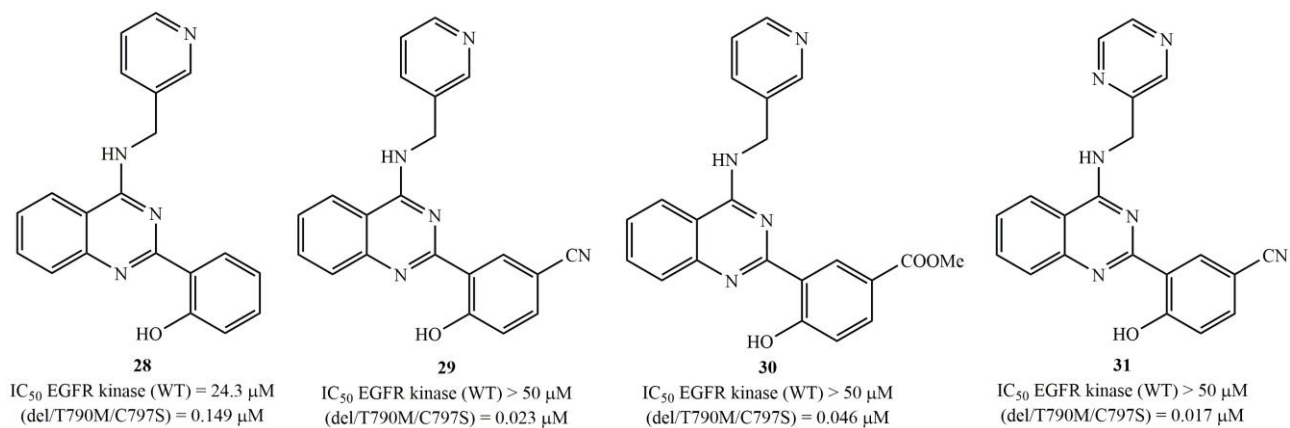


Рисунок 7 – Химическая структура ингибиторов **28–31** и их активность в отношении киназы EGFR и ее мутантов

Исследование SAR показывает, что соединения **29–31** проявляют более чем 1000-кратную селективность к тройному мутанту, чем к EGFR дикого типа, а также наномольную ингибирующую активность [58]. Анализ режима связывания (рис. 6, фигура (C), (D)) показывает концевую фенильную группу в **31**, которая образует две водородные связи с Met-793 и Gln-791 соответственно. Кроме того, пиридин-3-илметиламинный фрагмент образует еще две водородные связи с гидроксигруппой мутировавшего Ser-797. Удаление группы -OH или замена -NH на кислород приводит к потере ингибирующей активности, что дополнительно подтверждает сильные взаимодействия между соединениями, остатками Ser-797 и Met-793 [58].

1.3 Циркулирующая ДНК опухоли - маркер НМРЛ

Персонализированная медицина в лечении рака основывается на индивидуальном подходе к медицинскому обслуживанию, которое ориентируется на молекулярный анализ [59]. В клинических условиях образец опухоли на тканевой основе не может отражать

общую гетерогенность опухоли и не может быть получен повторно из-за ее инвазивной процедуры. Напротив, обнаружение циркулирующей опухолевой ДНК (ctDNA), обычно известной как “жидкая биопсия”, может помочь контролировать реакцию на терапию, своевременно выявлять приобретенную лекарственную устойчивость и позволяет врачам многократно и неинвазивно получать образцы крови для отслеживания прогрессирования рака [60]. За последние 5 лет технологии для анализа ctDNA, в особенности капельная цифровая ПЦР (ddPCR) и секвенирование следующего поколения (NGS), значительно продвинулись вперед. В частности, ddPCR может отслеживать динамические индивидуальные мутации, но требуется знание мутантного аллеля перед процедурой. Тем не менее, NGS имеет значительные преимущества перед ddPCR в обнаружении новых мутировавших вариаций и становится ключевым инструментом для точной медицины. Хотя клиническую пользу NGS еще предстоит проверить во всесторонних исследованиях, этот подход может стать предпочтительнее, чем ddPCR, во время лечения НМРЛ из-за высокого уровня сложности и непредсказуемости мутаций C797S, включая множественные варианты ДНК, цис-транс, различные сопутствующие C797S мутации и другие третичные мутации EGFR [61]. FDA США недавно одобрило использование жидких биопсий для выявления мутаций EGFR у пациентов с НМРЛ. Такие методы дают полное представление о специфических механизмах резистентности в течение периода лечения, таких как мутации C797S, связанные с лечением ингибиторами EGFR [59, 62, 63].

1.4 Заключение и перспективы на будущее

Лечение пациентов с НМРЛ, несущим мутацию T790M, ингибиторами EGFR третьего поколения является весьма перспективным, но лекарственная устойчивость все же сохраняется. Новые технологии, которые обнаруживают ctDNA, очень полезны в отслеживании динамических мутаций по ходу прогрессирования заболевания. Среди известных механизмов точечная мутация C797S является наиболее частым механизмом приобретенной устойчивости к ингибиторам тирозинкиназы третьего поколения, обусловленным потерей сайта связывания с ингибиторами EGFR третьего поколения. В настоящее время нет доступных терапевтических препаратов для подавления прогрессирования заболевания при расположении мутаций C797S и T790M в цис-положении. Таким образом, существует острая необходимость в разработке терапевтических средств, эффективных против третичных мутантов EGFR. Важно развитие низкомолекулярных ингибиторов EGFR следующего поколения с различными скаффолдами и механизмами связывания. Текущие комбинированные испытания с

ингибиторами третьего поколения могут изменить парадигму лечения НМРЛ, несущего мутации EGFR, в ближайшем будущем (рис. 8).

За последнее десятилетие в многочисленных клинических исследованиях были разработаны и испытаны высокоэффективные не-АТФ-конкурентные, аллостерические ингибиторы MEK1/2 (кобиметиниб и рефаметиниб) [64, 65]. Недавно разработанный аллостерический ингибитор EAI045 **9** продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность при раке легких, вызванном тройным мутантом EGFR^{L858R/T790M/C797S} при синергизме с цетуксимабом. Посредством виртуального скрининга лекарств и оптимизации *de novo* на основе структуры были идентифицированы другие новые АТФ-конкурентные ингибиторы, с отличными от ингибиторов EGFR третьего поколения скаффолдами, которые продемонстрировали высокую ингибирующую активность в отношении устойчивого мутанта EGFR^{C797S}.

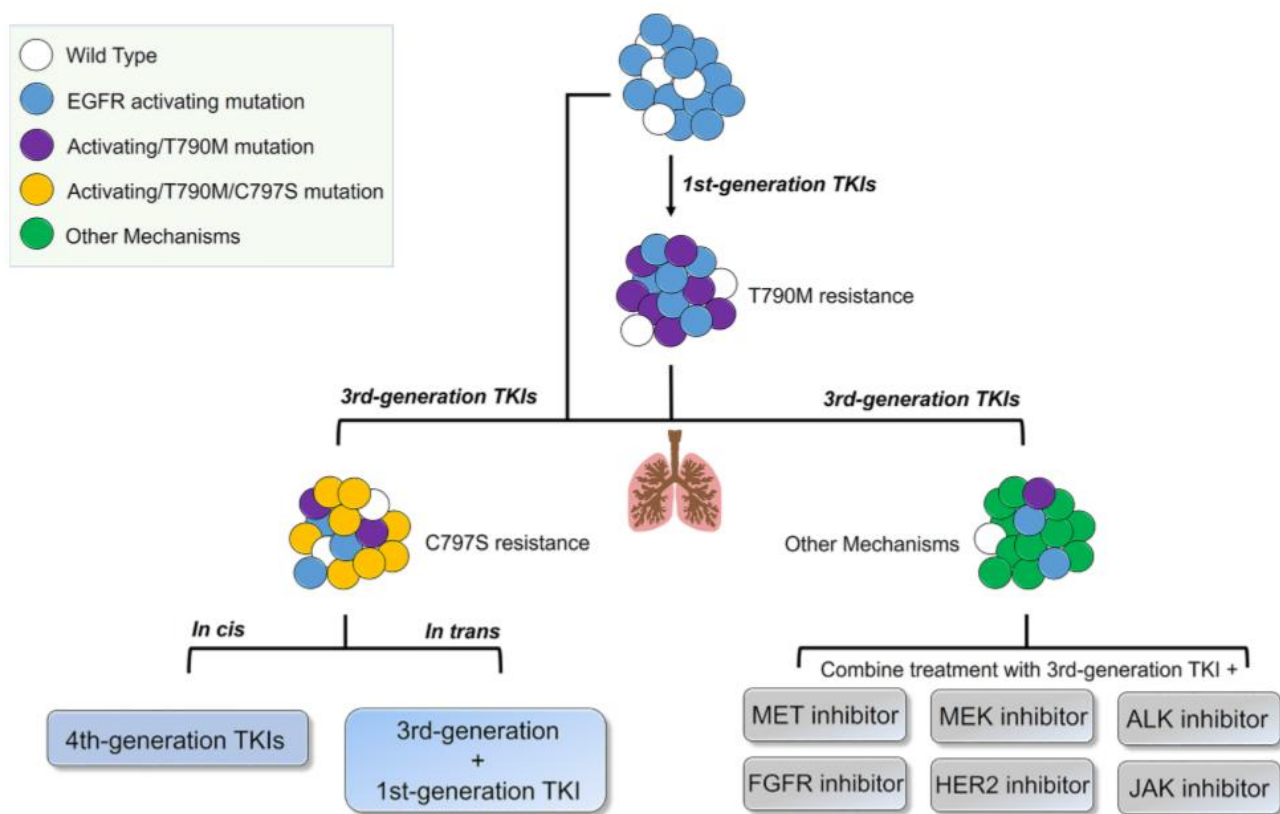


Рисунок 8 – Внутриопухолевая гетерогенность и будущая парадигма лечения пациентов с мутантной формой EGFR при НМРЛ

Несмотря на эти достижения, остается ряд серьезных ограничений и проблем. Аллостерический ингибитор EAI045 **9** способен ингибировать мутацию EGFR^{L858R/T790M/C797S}, но имеет низкую эффективность против мутанта EGFR^{del19/T790M/C797S} из-за уменьшенного пространства аллостерического кармана. Конкурентный ингибитор бригатиниб **10** имеет тенденцию быть менее чувствительным к мутанту

EGFR^{L858R/T790M/C797S}, чем EGFR^{del19/T790M/C797S}. Кроме того, как **9**, так и **10** демонстрируют механистическую синергию в сочетании с цетуксимабом, но эффективность однократной терапии не удовлетворяет *in vivo*. Таким образом, остается большая проблема в разработке ингибиторов четвертого поколения с более высокой селективностью к устойчивым к лекарственным средствам мутантам и большей ингибирующей способностью. Несколько недавно открытых молекул, то есть тризамещенные имидазолы и 4-аминопиразолопиримидины, проявляют высокую активность против мутанта C797S, но имеют низкую или не имеют селективности в отношении EGFR дикого типа. Учитывая общепризнанную важность мутантов EGFR^{T790M} и EGFR^{C797S} в приобретенной резистентности, разработка ингибиторов с высокой селективностью по отношению к мутантам является определяющей для открытия лекарств следующего поколения. Для подтверждения их эффективности *in vitro* необходимы всесторонние исследования недавно разработанных агентов *in vivo*.

2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современной терапии злокачественных новообразований вопросы вторичной резистентности приобретённой к таргетным препаратам становятся основополагающими для успешной борьбы с онкологическими заболеваниями. Несмотря на достаточно большой структурный ряд различных ингибиторов EGFR как первого, так и второго поколения, действенных препаратов в отношении опухолевых клеток НМРЛ, несущих мутацию C797S, в арсенале медиков нет.

В начале 2017 года появились данные об открытии эффективного ингибитора EGFR^{C797S} в ходе проведения высокопроизводительного скрининга. Выявленная молекула EAI001 оказывала мощный ингибирующий эффект в отношении EGFR^{C797S} в условиях аллостерического ингибирования.

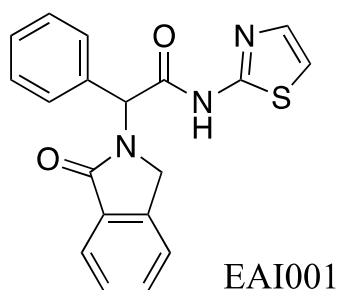


Рисунок 9 – Химическая структура аллостерического ингибитора EAI001

В представленной работе представлены результаты оптимизации молекулы EAI001 с целью повышения аффинности к мишени, и поиску новых соединений-хитов, рекомендованных к синтезу и биологическим исследованиям.

Основная стратегия оптимизации структуры EAI001 представлена на схеме ниже.

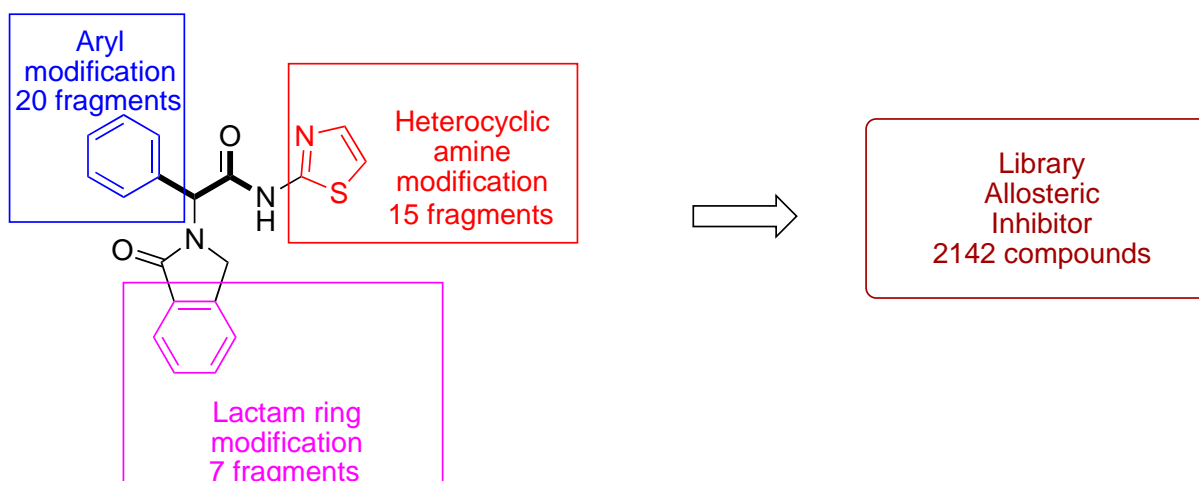


Рисунок 10 – Стратегия оптимизации структуры EAI001

В таблице 1 представлены результаты молекулярного докинга для библиотеки соединений, в которой осуществлялась модификация амидного фрагмента. Как видно из представленных данных замена тиазольного фрагмента на фрагмент

электронодефицитного пиридина и приводит к более эффективной стыковке в аллостерический сайт связывания, более того наблюдается увеличение аффинности. Наилучших результатов удалось достичь в ходе введения тиadiaзольного фрагмента в молекулу ингибитора.

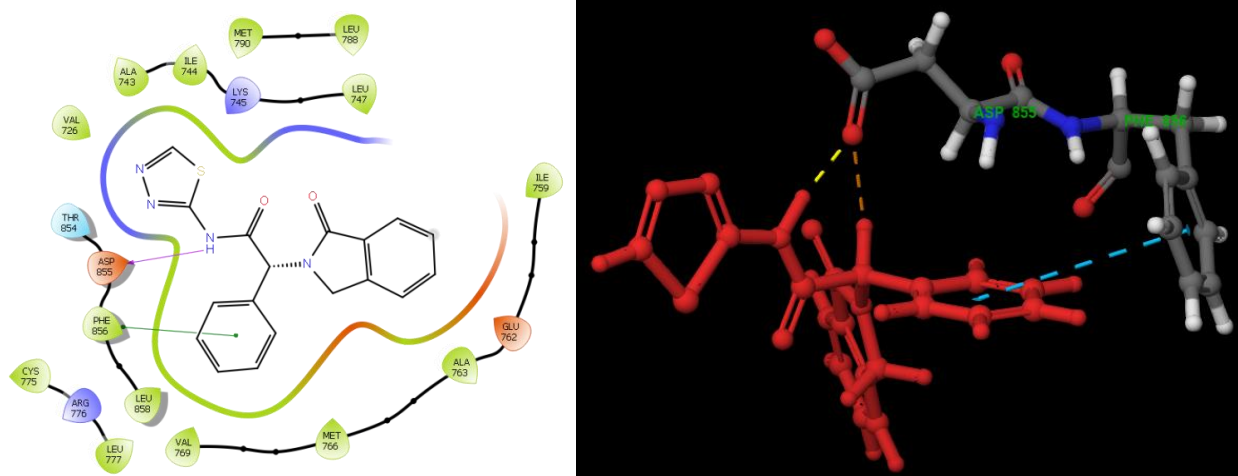


Рисунок 11–Структура комплекса A9–EGFR^{C797S} и ключевые взаимодействия

В таблице 2 представлены результаты молекулярного докинга для библиотеки соединений, в которой осуществлялась модификация арильного фрагмента. Как видно из представленных данных значительную роль в связывании играет наличие доноров водородной связи в качестве функциональных групп арильного фрагмента. Также следует отметить, что введение удлиненного алкильного линкера связывающего арильный фрагмент с аминокислотным остовом не приводит к повышению аффинности лиганда.

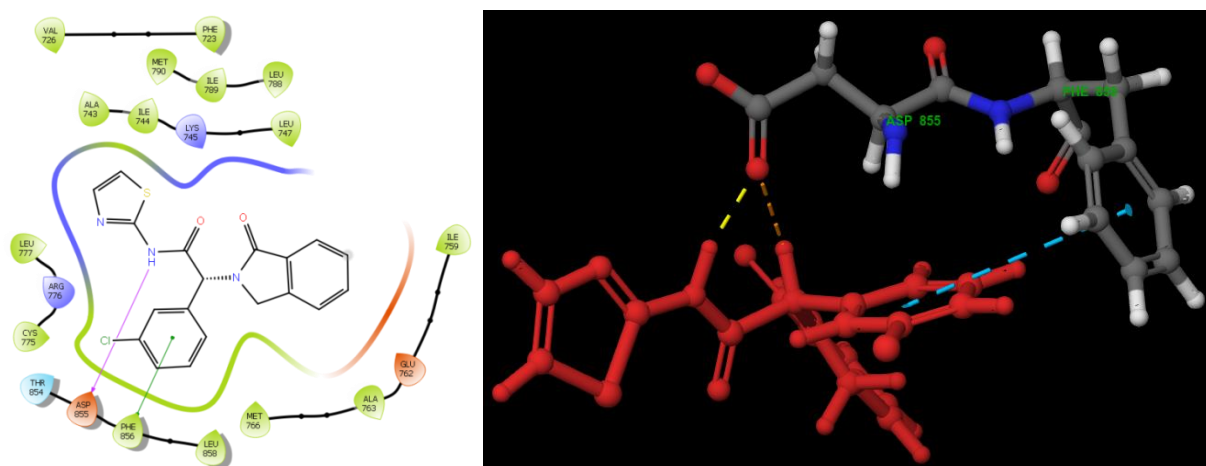


Рисунок 12– Структура комплекса B10–EGFR^{C797S} и ключевые взаимодействия

Результаты докинга, основанные на модификации лактамного фрагмента, представлены в таблице 3. Как видно из представленных данных изоиндорлиновый фрагмент является наиболее приемлемым и обеспечивает наиболее эффективные гидрофобные взаимодействия в кармане аллостерического сайта связывания.

Повышение акцепторной природы лактамного фрагмента не приводит к повышению эффективности стыковки лиганда и дополнительному приросту аффинности.

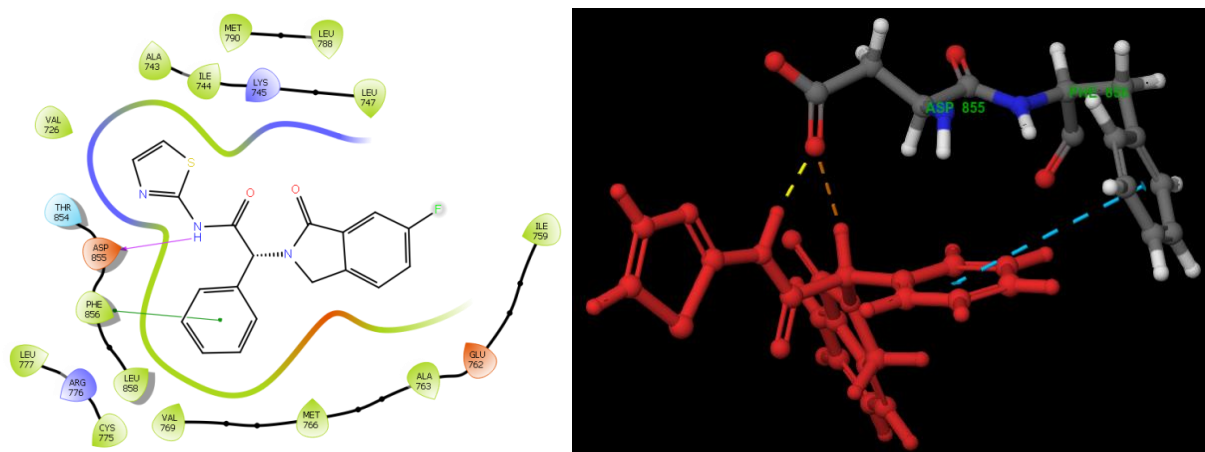


Рисунок 13 – Структура комплекса C2–EGFR^{C797S} и ключевые взаимодействия

На основании ранее рассмотренных фрагментов нами сконструирована новая комбинаторная библиотека, которая насчитывает 2142 лиганда, в ходе высокопроизводительного молекулярного докинга было выбрано 6 соединений-хитов, обеспечивающих максимальную эффективность стыковки и высокую аффинность по отношению к исследуемой мишени. Как видно из результатов, представленных в таблице 4, наиболее эффективными лигандами оказались те, что содержали гидроксифенильные фрагменты, пиридиновые фрагменты, а также электронодефицитные индолиновые и азаиндолиновые фрагменты. Наличие гидроксильных групп способствует дополнительной стабилизации комплекса белок-лиганд за счет водородной связи с остатками CYS775.

На рисунках 14-19 представлены структуры комплексов соединений-хитов и ключевые взаимодействия, реализованные в комплексе с EGFR^{C797S}.

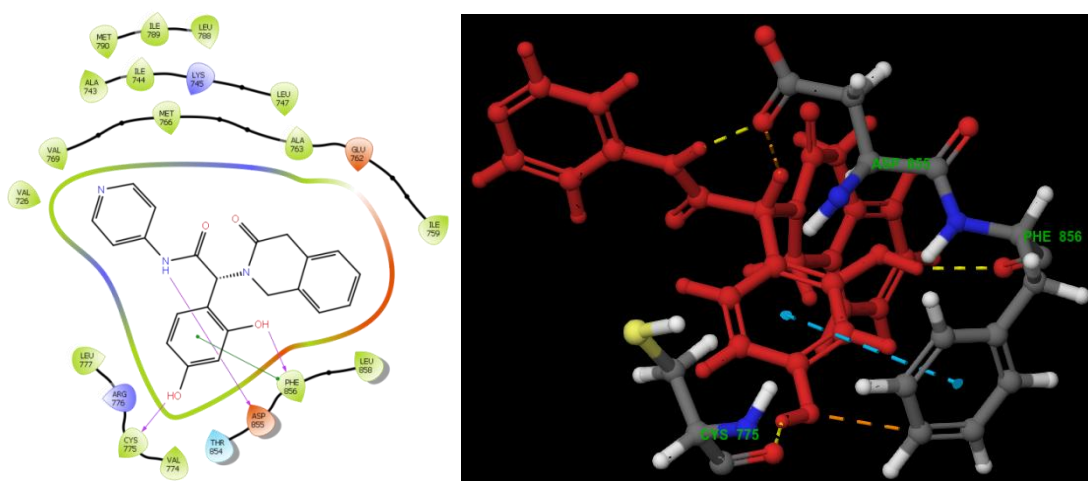


Рисунок 14 –Комплекс ABC1–EGFR^{C797S}

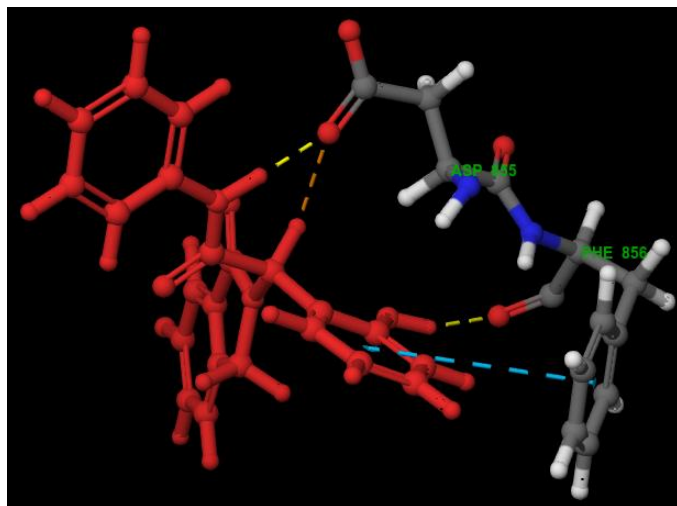
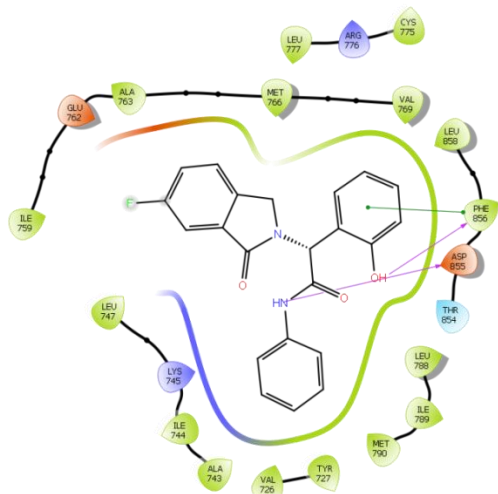


Рисунок 15 – Комплекс ABC2–EGFR^{C797S}

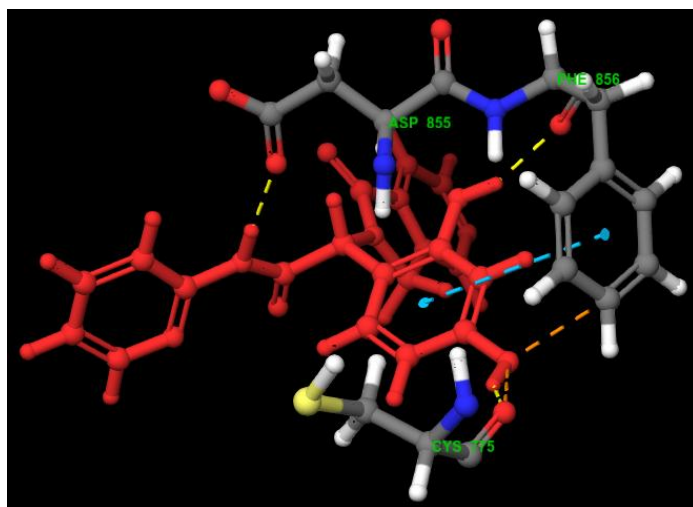
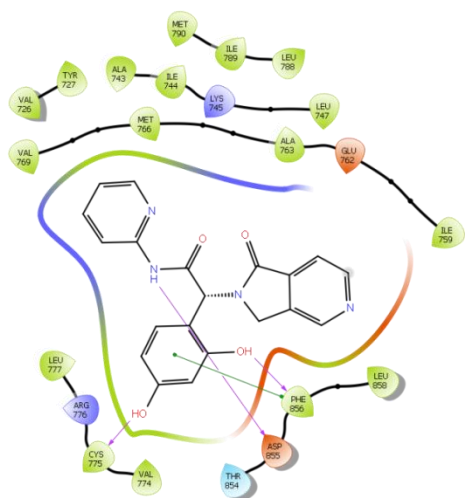


Рисунок 16 – Комплекс ABC3–EGFR^{C797S}

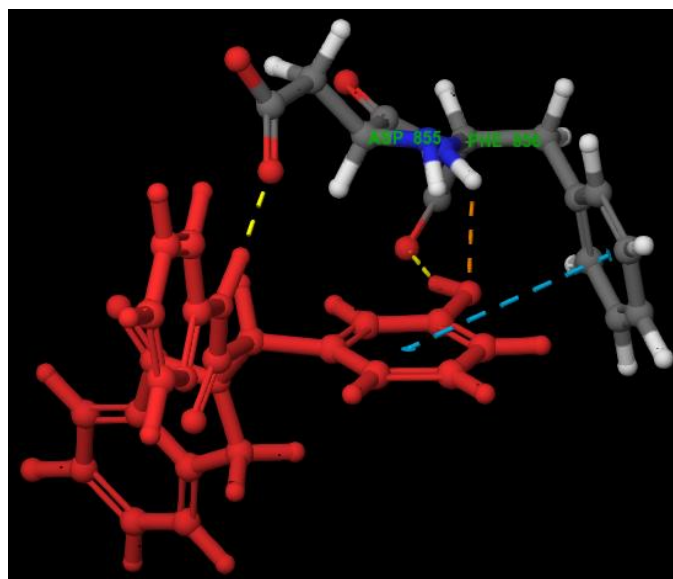
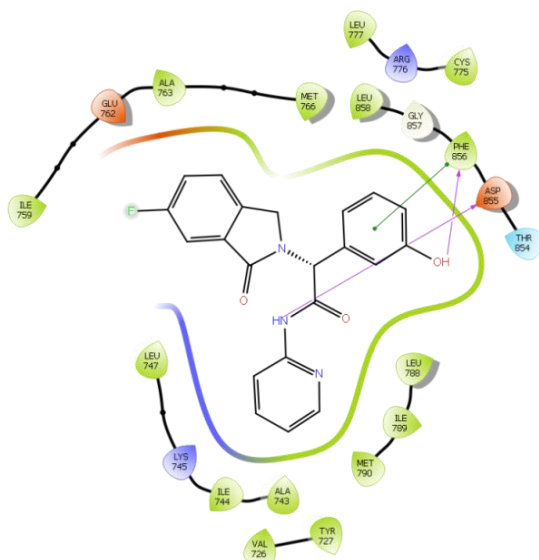


Рисунок 17 – Комплекс ABC4–EGFR^{C797S}

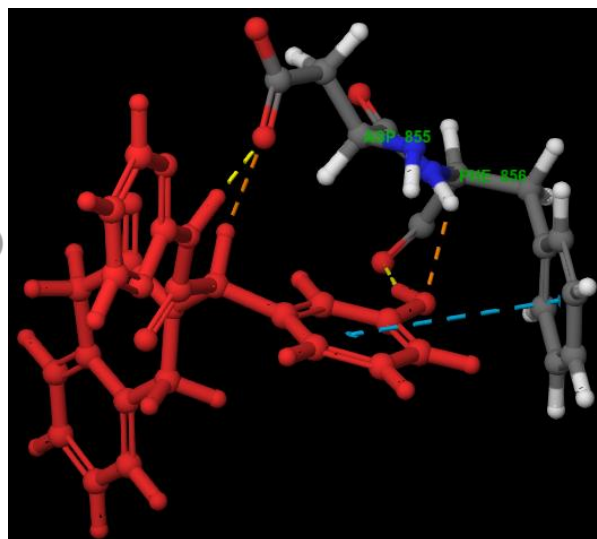
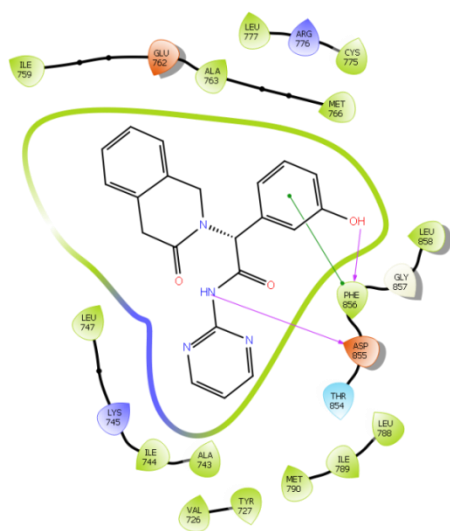


Рисунок 18 – Комплекс ABC5-EGFR^{C797S}

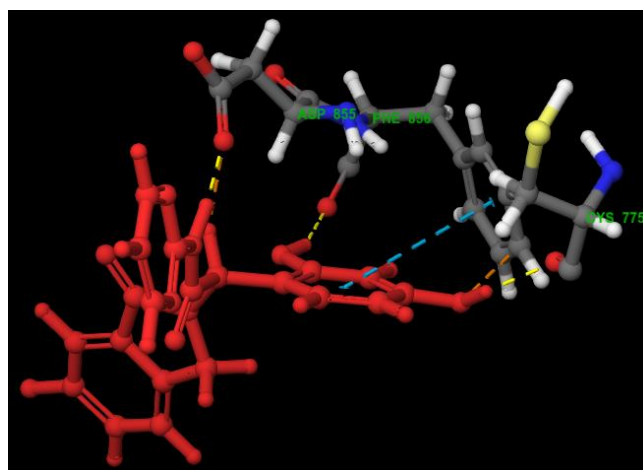
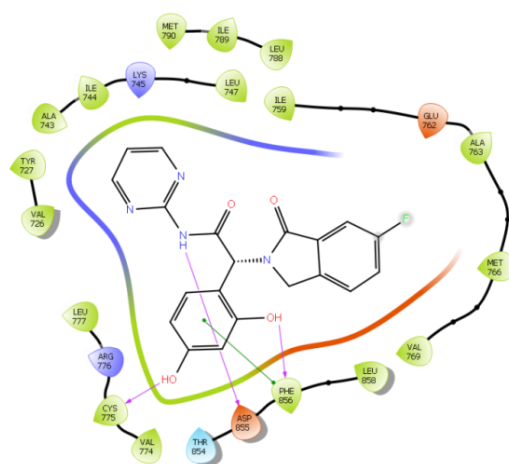
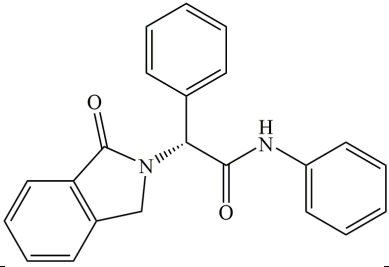
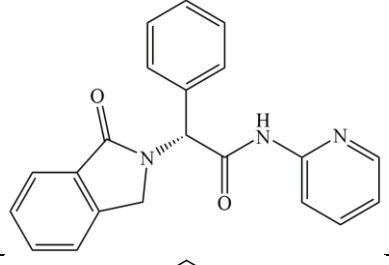
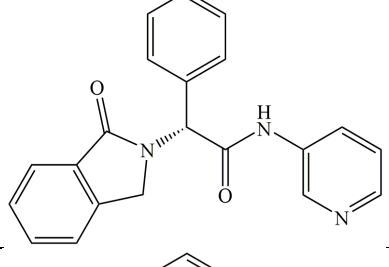
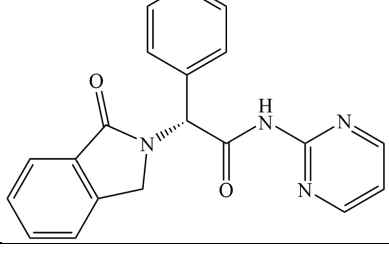
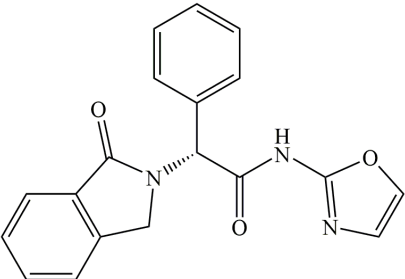
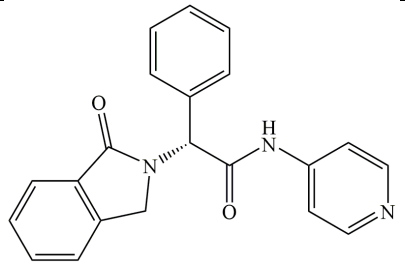
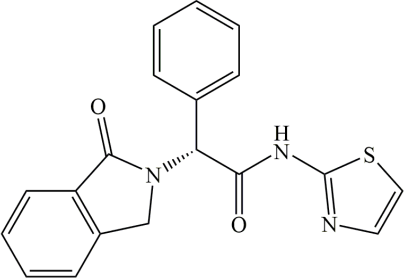
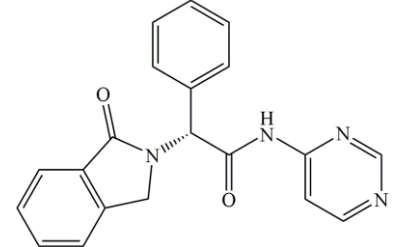


Рисунок 19 – Комплекс ABC6-EGFR^{C797S}

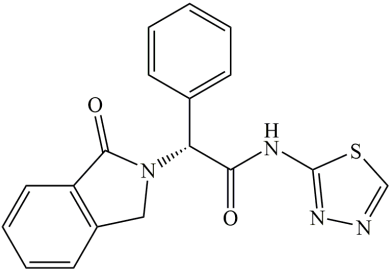
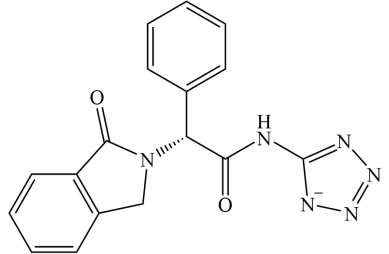
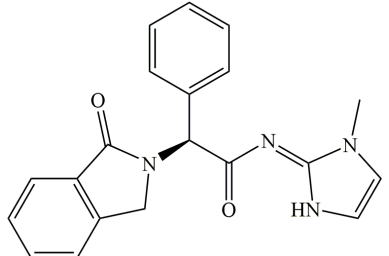
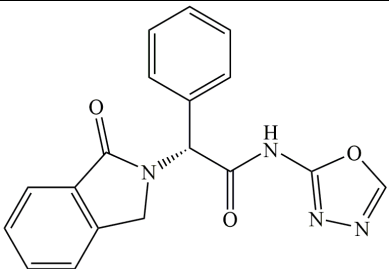
Таблица 1 –Модификация амидного фрагмента

Код соединения	№	Структура	Glide gscore	Glide emodel	Docking score	XP GScore	MMGBSA dG Bind	Ключевые взаимодействия
1	2	3	4	5	6	7	8	9
A1	1		-10.588	-93.971	-10.588	-10.588	-72.658	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A2	2		-10.445	-94.350	-10.445	-10.445	-71.148	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A3	3		-10.353	-90.687	-10.352	-10.353	-72.752	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A4	4		-9.886	-98.123	-9.886	-9.886	-70.704	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
A5	5		-9.832	-98.205	-9.706	-9.832	-72.192	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A6	6		-9.601	-96.430	-9.599	-9.601	-74.911	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A7	7		-9.537	-101.958	-9.537	-9.537	-75.839	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A8	8		-9.441	-100.597	-9.441	-9.441	-71.805	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
A9	9		-9.211	-101.952	-8.928	-9.211	-77.070	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
A10	10		-8.529	-98.739	-8.529	-8.529	-17.669	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг) LYS745 (солевой мостик)
A11	11		-8.816	-77.861	-8.442	-8.816	-43.859	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг) LYS745 (водородная)
A12	12		-9.386	-102.590	-8.269	-9.386	-73.326	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 1

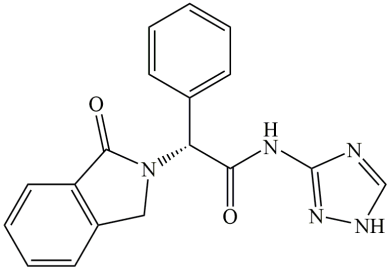
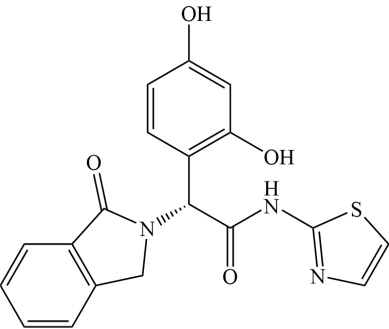
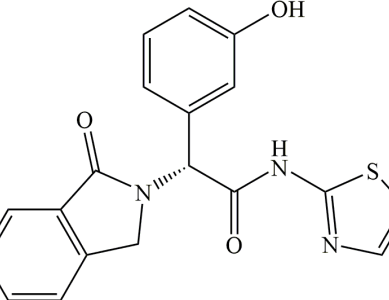
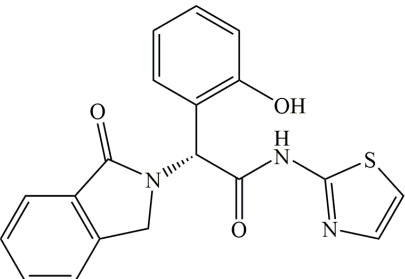
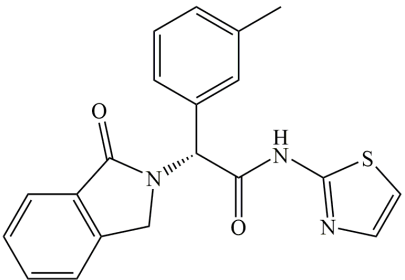
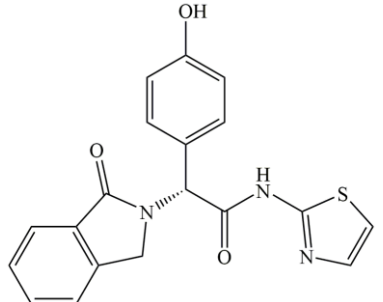
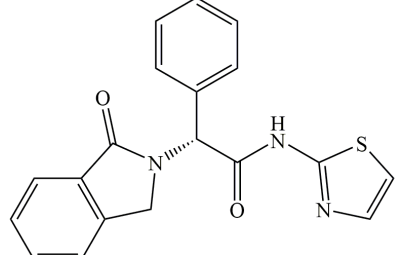
1	2	3	4	5	6	7	8	9
A13	13		-8.910	-101.365	-6.639	-8.910	-61.954	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

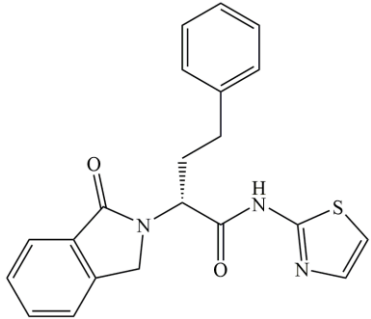
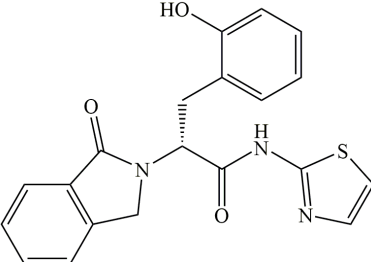
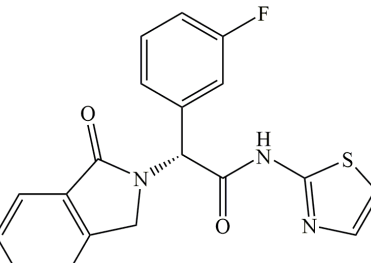
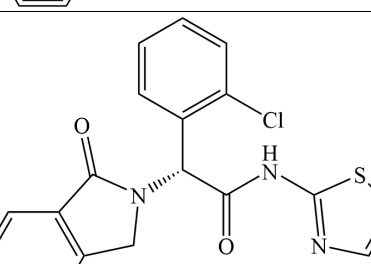
Таблица 2 – Модификация арильного фрагмента

Код соединения	№	Структура	Glide gscore	Glide emodel	Docking score	XP GScore	MMGBSA dG Bind	Ключевые взаимодействия
1	2	3	4	5	6	7	8	9
B1	14		-10.484	-96.688	-10.479	-10.484	-65.562	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная) CYS775 (водородная)
B2	15		-10.040	-107.129	-10.040	-10.040	-76.479	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

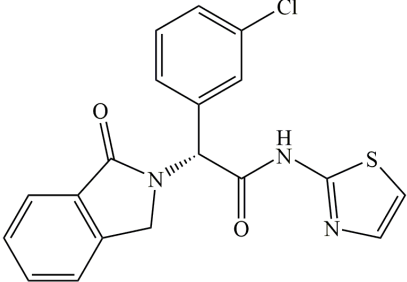
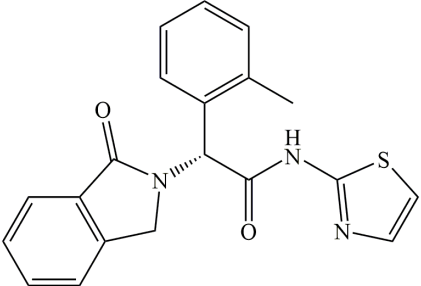
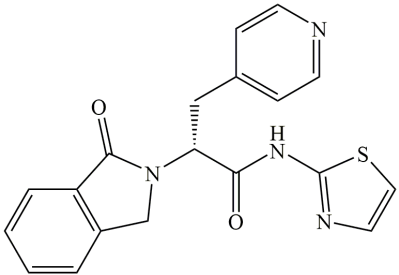
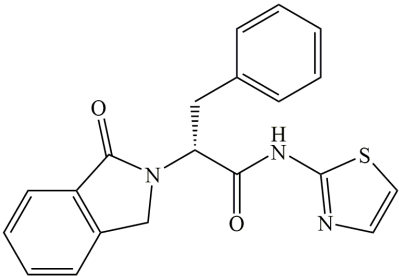
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
B3	16		-9.944	-94.505	-9.944	-9.944	-75.588	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная)
B4	17		-9.900	-103.659	-9.900	-9.900	-77.324	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B5	18		-9.670	-96.403	-9.665	-9.670	-73.883	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг) CYS775 (водородная)
A7	19		-9.620	-101.299	-9.620	-9.620	-75.999	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

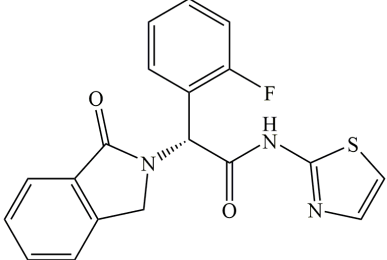
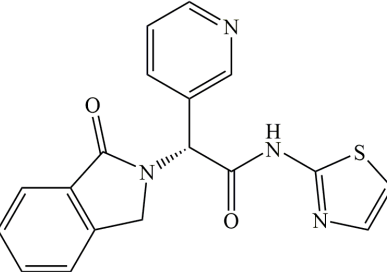
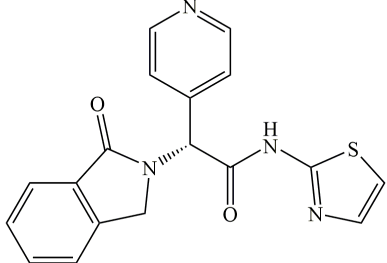
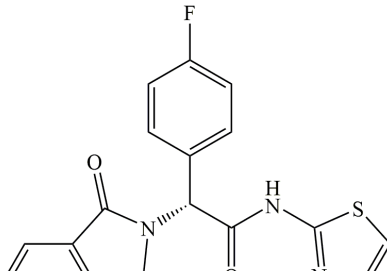
Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
B6	20		-9.589	-77.833	-9.589	-9.589	-66.924	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B7	21		-9.558	-89.593	-9.558	-9.558	-70.356	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная)
B8	22		-9.555	-99.021	-9.551	-9.555	-73.851	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B9	23		-9.444	-92.413	-9.439	-9.444	-72.781	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
B10	24		-9.376	-100.612	-9.371	-9.376	-79.271	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B11	25		-9.353	-96.535	-9.353	-9.353	-70.258	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B12	26		-9.355	-83.986	-9.343	-9.355	-69.695	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B13	27		-9.324	-87.426	-9.324	-9.324	-67.805	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
B14	28		-9.298	-96.184	-9.298	-9.298	-75.771	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B15	29		-9.232	-100.421	-9.232	-9.232	-73.902	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B16	30		-9.197	-100.788	-9.197	-9.197	-74.887	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B17	31		-9.111	-94.677	-9.111	-9.111	-72.299	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 2

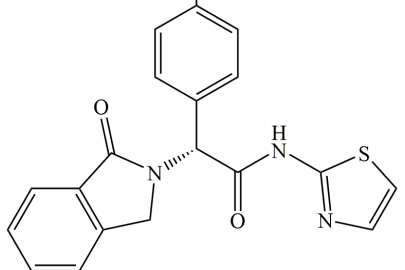
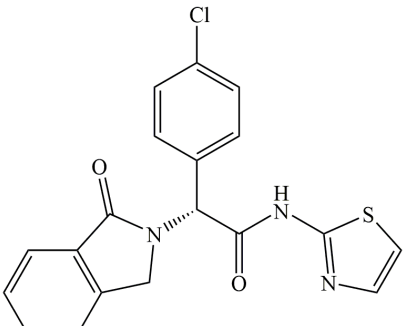
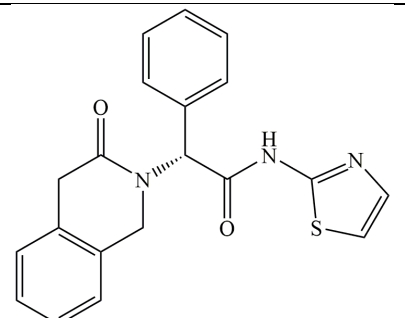
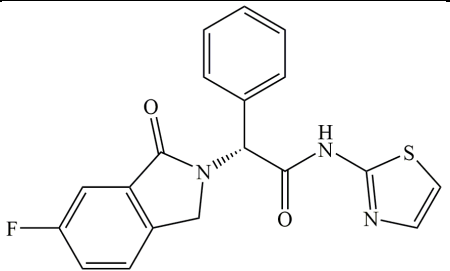
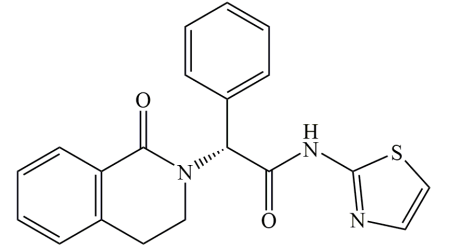
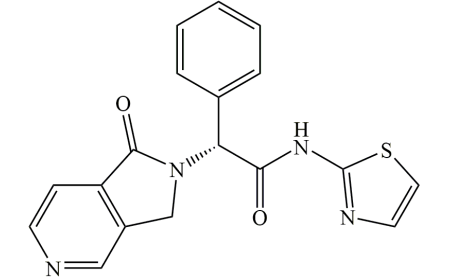
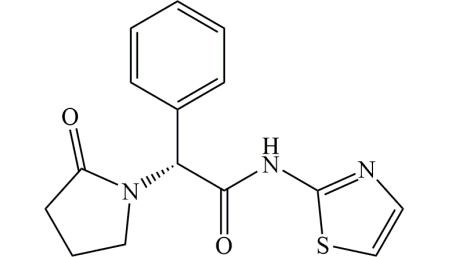
1	2	3	4	5	6	7	8	9
B18	32		-8.906	-84.901	-8.906	-8.906	-66.376	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
B19	33		-8.796	-75.643	-8.796	-8.796	-67.245	ASP855 (водородная)

Таблица 3–Модификация лактамного фрагмента

Код соединения	№	Структура	Glide gscore	Glide emodel	Docking score	XP GScore	MMGBSA dG Bind	Ключевые взаимодействия
1	2	3	4	5	6	7	8	9
C1	34		-9.556	-94.906	-9.556	-9.556	-73.955	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг) LYS745 (водородная)

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
C2	35		-9.450	-101.482	-9.450	-9.450	-77.299	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
C3	36		-9.166	-94.393	-9.166	-9.166	-69.287	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
C4	37		-9.132	-98.267	-9.132	-9.132	-73.552	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)
C5	38		-7.979	-77.110	-7.979	-7.979	-66.111	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Продолжение таблицы 3

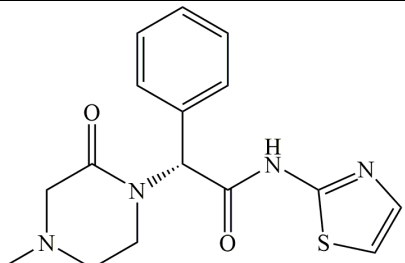
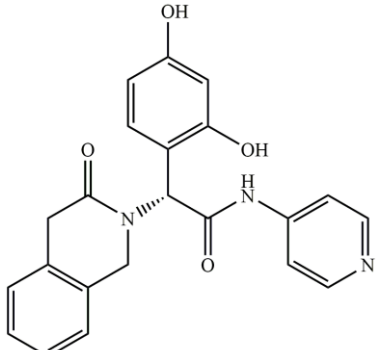
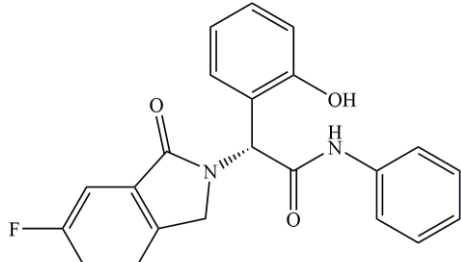
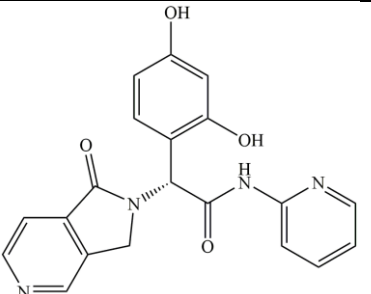
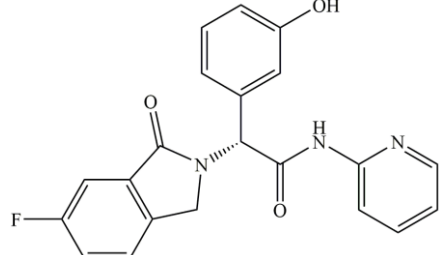
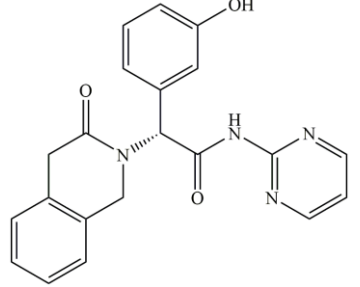
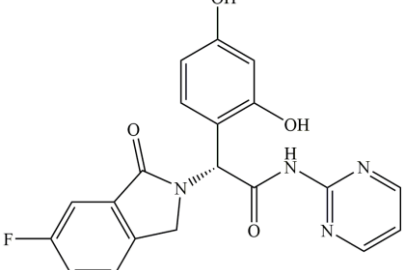
1	2	3	4	5	6	7	8	9
C6	39		-7.443	-85.224	-6.684	-7.443	-63.268	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг)

Таблица 4–Соединения-хиты

Код соединения	№	Структура	Glide gscore	Glide emodel	Docking score	XP GScore	MMGBSA dG Bind	Ключевые взаимодействия
1	2	3	4	5	6	7	8	9
ABC1	1		-11.385	-42.603	-11.385	-11.385	-63.085	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная) CYS775 (водородная)
ABC2	2		-11.379	-87.924	-11.379	-11.379	-75.456	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная)

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
ABC3	3		-11.169	-86.373	-11.169	-11.169	-59.390	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная) CYS775 (водородная)
ABC4	4		-11.011	-100.014	-11.011	-11.011	-73.569	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная)
ABC5	5		-11.002	-88.153	-11.001	-11.002	-68.713	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная)
ABC6	6		-10.866	-90.450	-10.862	-10.866	-63.723	ASP855 (водородная) PHE856 (π - π стэкинг, водородная) CYS775 (водородная)

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все расчеты в рамках выполненной работы проводили с применением программного пакета SchrodingerSuite 2017-1 (demo-лицензия).

3.1 Подготовка комбинаторной библиотеки

Исходные 3D-структуры исследуемых аллостерических лигандов были построены с использованием панели сборки Maestro в пакете Schrödinger. Модуль Ligprep был использован для генерации всех возможных состояний в физиологическом диапазоне pH 7 ± 2 с учетом наименьшей потенциальной энергии конформации лиганда, с использованием силового поля OPLS_2005. Все полученные структуры соединений были использованы для исследований молекулярной стыковки и свойств ADME с использованием модуля Qikprop.

3.2 Подготовка молекулы белка

Кристаллическую структуру тирозинкиназы EGFR, несущую мутацию C797S, разрешение не выше 2.4 Å, загружали из банка данных белков RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (PDB 5D41). Белок был приготовлен с использованием модуля мастера подготовки ProteinPreparationWizard. Все молекулы воды и гетероатомы, кроме нативного лиганда, были удалены и атомы водорода были добавлены к кристаллической структуре. Комплекс был оптимизирован, чтобы уменьшить стерические столкновения, с применением силового поля OPLS 2005. Модуль SiteMap использовался для оценки характеристики функций сайтов связывания. На его основе генерируются карты гидрофобных и гидрофильных взаимодействий, которые определяют донорные, акцепторные и гидрофобные области сайта связывания.

3.3 Молекулярный докинг

Активный сайт для стыковки лигандов определялся с использованием модуля GenerateGridGeneration в Glide. В качестве модельного был выбрансокристаллизованныйнативныйлиганд, сетка генерировалась вокруг активного участка собственной области EGFR с использованием масштабирующего коэффициента ван-дер-ваальсовых взаимодействий равного 0.9. Для анализа режимов стыковкиисследуемых ингибиторов использовались два разных протокола стыковки, протокол стандартной точности (SP) и протокол дополнительной точности (XP).

3.4 Вычисление PrimeMM/GBSA

Для оценки относительной аффинности лигандов используется метод молекулярной механики с обобщенной поверхностью (MM/GBSA). PrimeMM/GBSA модуль использовался для расчета свободной энергии связывания для каждой молекулы.

Комплексы лиганд-белок, полученные из стыковки ХР, были подвергнуты расчетам ММ/GBSA.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- Методами высокопроизводительного молекулярного докинга найдено 6 новых производных молекулы EAI001, превосходящих ее по параметрам стыковки и аффинности в активный сайт EGFR^{C797S}-киназы.
- Показано, что наиболее чувствительны к модификации амидные и арильные фрагменты молекулы EAI001, наименее чувствительны к параметрам стыковки и аффинности индолиновые фрагменты.
- Установлено, что введение Н-донорных гидроксильных групп в арильный фрагмент лиганда EAI001 способствует дополнительной стабилизации комплекса белок-лиганд за счет дополнительной межмолекулярной водородной связи с остатками CYS775.
- Предложены к синтезу и биологическим испытаниям *in vitro* 6 новых низкомолекулярных ингибиторов EGFR-киназы, несущей C797S-мутацию.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegel, R. L. Cancer statistics / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal // *Ca-Cancer J. Clin.* – 2017. – №67. – P. 7–30.
2. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer / F. A. Shepherd et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – № 353. – P. 123–132.
3. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer / S. V. Sharma et al. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – № 7. – P. 169–181.
4. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib / T. J. Lynch et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – № 350. – P. 2129–2139.
5. North-East Japan Study, G. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR / M. Maemondo et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – № 362. – P. 2380–2388.
6. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib / S. Kobayashi et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – № 352. – P. 786–792.
7. Camidge, D. R. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer / D. R. Camidge, W. Pao, L. V. Sequist // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2014. – № 11. – P. 473–481.
8. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M / W. Zhou et al. // *Nature.* – 2009. – № 462. – P. 1070–1074.
9. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC / A. O. Walter et al. // *Cancer Discovery.* – 2013. – № 3. – P. 1404–1415.
10. Third-generation tyrosine kinase inhibitors targeting epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer / T. A. Barnes et al. // *Front. Oncol.* – 2017. – № 7. – P. 113.
11. Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer / L. V. Sequist et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – № 372. – P. 1700–1709.
12. Management of hyperglycemia from epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) targeting T790M-mediated resistance / J. Villadolid et al. // *Transl. Lung Cancer Res.* – 2015. – № 4. – P. 576–583.
13. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer / D. A. Cross et al. // *Cancer Discovery.* – 2014. – № 4. – P. 1046–1061.

14. Recent updates on third generation EGFR inhibitors and emergence of fourth generation EGFR inhibitors to combat C797S resistance / H. Patel et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2017. – № 142. – P. 32–47.
15. EGF816 exerts anticancer effects in non-small cell lung cancer by irreversibly and selectively targeting primary and acquired activating mutations in the EGF receptor / Y. Jia et al. // *Cancer Res.* – 2016. – № 76. – P. 1591–1602.
16. Wang, S. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer / S. Wang, S. Cang, D. Liu // *J. Hematol. Oncol.* – 2016. – № 9. – P. 34.
17. Xu, X. Parallel phase 1 clinical trials in the US and in China: accelerating the test of avitinib in lung cancer as a novel inhibitor selectively targeting mutated EGFR and overcoming T790M-induced resistance / X. Xu // *Chin. J. Cancer.* – 2015. – № 34. – P. 285–287.
18. Discovery of N-((3R,4R)-4-Fluoro-1-(6-((3-methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-9-methyl-9H-purin-2-yl)pyrrolidine-3-yl)acrylamide (PF-06747775) through structurebased drug design: a high affinity irreversible inhibitor targeting oncogenic EGFR mutants with selectivity over wild-type EGFR / S. Planken et al. // *J. Med. Chem.* – 2017. – № 60. – P. 3002–3019.
19. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M / K. S. Thress et al. // *Nat. Med.* – 2015. – № 21. – P. 560–562.
20. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients / J. J. Chabon et al. // *Nat. Commun.* – 2016. – № 7. – P. 11815.
21. L718Q mutation as new mechanism of acquired resistance to AZD9291 in EGFR-mutated NSCLC / M. Bersanelli et al. // *J. Thorac. Oncol.* – 2016. – № 11. – P. e121–123.
22. EGFR G796D mutation mediates resistance to osimertinib / D. Zheng et al. // *Oncotarget.* – 2017. – № 8. – P. 49671–49679.
23. Novel mutations on EGFR Leu792 potentially correlate to acquired resistance to osimertinib in advanced NSCLC / K. Chen et al. // *J. Thorac. Oncol.* – 2017. – № 12. – P. e65–e68.
24. Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR

- (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib / S. I. Ou et al. // *Lung Cancer*. – 2017. – № 108. – P. 228–231.
25. Sequential liquid biopsies reveal dynamic alterations of EGFR driver mutations and indicate EGFR amplification as a new mechanism of resistance to osimertinib in NSCLC / F. H. Knebel et al. // *Lung Cancer*. – 2017. – № 108. – P. 238–241.
 26. Ou, S. H. High MET amplification level as a resistance mechanism to osimertinib (AZD9291) in a patient that symptomatically responded to crizotinib treatment post-osimertinib progression / S. H. Ou, N. Agarwal, S. M. Ali // *Lung Cancer*. – 2016. – № 98. – P. 59–61.
 27. EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients / D. Planchard et al. // *Ann. Oncol.* – 2015. – № 26. – P. 2073–2078.
 28. Mechanisms of acquired resistance to AZD9291: a mutation-selective, irreversible EGFR inhibitor / T. M. Kim et al. // *J. Thorac. Oncol.* – 2015. – № 10. – P. 1736–1744.
 29. Activation of the IGF1R pathway potentially mediates acquired resistance to mutant-selective 3rd-generation EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer / J. H. Park et al. // *Oncotarget*. – 2016. – № 7. – P. 22005–22015.
 30. Transformation to small-cell carcinoma as an acquired resistance mechanism to AZD9291: a case report / L. Li et al. // *Oncotarget*. – 2017. – № 8. – P. 18609–18614.
 31. Ke, E. E. EGFR as a pharmacological target in EGFRmutant non-small-cell lung cancer: where do we stand now? / E. E. Ke, Y. L. Wu // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2016. – № 37. – P. 887–903.
 32. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib / J. A. Woyach et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – № 370. – P. 2286–2294.
 33. Functional characterization of BTK(C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: exploration of alternative kinase inhibitors / S. Cheng et al. // *Leukemia*. – 2015. – № 29. – P. 895–900.
 34. Acquired resistance of EGFR-mutant lung cancer to a T790M-specific EGFR inhibitor: Emergence of a third mutation (C797S) in the EGFR tyrosine kinase domain / H. A. Yu et al. // *JAMA Oncol.* – 2015. – № 1. – P. 982–984.
 35. Acquired C797S mutation upon treatment with a T790M-specific third-generation EGFR inhibitor (HM61713) in nonsmall cell lung cancer / H. N. Song et al. // *J. Thorac. Oncol.* – 2016. – № 11. – P. e45–47.
 36. Osimertinib as first-line treatment of EGFR mutationpositive advanced non-small-cell lung cancer / S. S. Ramalingam et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2017.

37. A novel bispecific antibody targeting EGFR and cMet is effective against EGFR inhibitor-resistant lung tumors / S. L. Moores et al. // *Cancer Res.* – 2016. – № 76. – P. 3942–3953.
38. Minari, R. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance / R. Minari, P. Bordi, M. Tiseo // *Transl. Lung Cancer Res.* – 2016. – № 5. – P. 695–708.
39. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies / M. J. Niederst et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2015. – № 21. – P. 3924–3933.
40. Brief Report: lung adenocarcinoma harboring EGFR T790M and in trans C797S responds to combination therapy of first and third generation EGFR-TKIs and shifts allelic configuration at resistance / Z. Wang et al. // *J. Thorac. Oncol.* – 2017. – № 12. – P. 1723–1727.
41. Structural pharmacological studies on EGFR T790M/C797S / L. L. Kong et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – № 488. – P. 266–272.
42. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors / Y. Jia et al. // *Nature.* – 2016. – № 534. – P. 129–132.
43. Wang, S. EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance / S. Wang, Y. Song, D. Liu // *Cancer Lett.* – 2017. – № 385. – P. 51–54.
44. Allosteric EGFR inhibitors overcome resistance mutations / *Cancer Discovery.* – 2016. – № 6. – P. 691.
45. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP / C. H. Yun et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – № 105. – P. 2070–2075.
46. Kinase inhibitor profiling reveals unexpected opportunities to inhibit disease-associated mutant kinases / K. C. Duong-Ly et al. // *Cell Rep.* – 2016. – № 14. – P. 772–781.
47. Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated nonsmall-cell lung cancer / K. Uchibori et al. // *Nat. Commun.* – 2017. – № 8. – P. 14768.
48. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors / T. Sasaki et al. // *Cancer Res.* – 2011. – № 71. – P. 6051–6060.

49. Two novel ALK mutations mediate acquired resistance to the next-generation ALK inhibitor alectinib / R. Katayama et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – № 20. – P. 5686–5696.
50. UNC1062, a new and potent Mer inhibitor / J. Liu et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2013. – № 65. – P. 83–93.
51. Ibrutinib selectively and irreversibly targets EGFR (L858R, Del19) mutant but is moderately resistant to EGFR (T790M) mutant NSCLC cells / H. Wu et al. // *Oncotarget.* – 2015. – № 6. – P. 31313–31322.
52. Discovery of (R)-1-(3-(4-Amino-3-(3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)-phenyl)-1Hpyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one (CHMFL-EGFR-202) as a novel irreversible EGFR mutant kinase inhibitor with a distinct binding mode / A. Wang et al. // *J. Med. Chem.* – 2017. – № 60. – P. 2944–2962.
53. Insight into the inhibition of drug-resistant mutants of the receptor tyrosine kinase EGFR / J. Engel et al. // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2016. – № 55. – P. 10909–10912.
54. A frozen analogue approach to aminopyridinylimidazoles leading to novel and promising p38 MAP kinase inhibitors / R. Selig et al. // *J. Med. Chem.* – 2012. – № 55. – P. 8429–8439.
55. Lung cancer: EGFR inhibitors with low nanomolar activity against a therapyresistant L858R/T790M/C797S mutant / M. Gunther et al. // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2016. – № 55. – P. 10890–10894.
56. Trisubstituted imidazoles with a rigidized hinge binding motif act as single digit nM inhibitors of clinically relevant EGFR L858R/T790M and L858R/T790M/C797S mutants: an example of target hopping / M. Juchum et al. // *J. Med. Chem.* – 2017. – № 60. – P. 4636–4656.
57. Trisubstituted pyridinylimidazoles as potent inhibitors of the clinically resistant L858R/T790M/C797S EGFR mutant: targeting of both hydrophobic regions and the phosphate binding site / M. Gunther et al. // *J. Med. Chem.* – 2017. – № 60. – P. 5613–5637.
58. Discovery of EGF receptor inhibitors that are selective for the d746-750/T790M/C797S mutant through structure-based de novo design / H. Park et al. // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2017. – № 56. – P. 7634–7638.
59. Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring / D. Perez-Callejo et al. // *Transl. Lung Cancer Res.* – 2016. – № 5. – P. 455–465.

60. Integrating liquid biopsies into the management of cancer / G. Siravegna et al. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2017. – № 14. – P. 531–548.
61. Accessing genetic information with liquid biopsies / X. Cai et al. // *Trends Genet.* – 2015. – № 31. – P. 564–575.
62. Using circulating cell-free DNA to monitor personalized cancer therapy / M. Oellerich et al. // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 2017. – № 54. – P. 205–218.
63. Osimertinib benefit in EGFRmutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA / J. Remon et al. // *Ann. Oncol.* – 2017. – № 28. – P. 784–790.
64. Zhao, Y. The clinical development of MEK inhibitors / Y. Zhao, A. A. Adjei // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2014. – № 11. – P. 385–400.
65. Novel carboxamide-based allosteric MEK inhibitors: discovery and optimization efforts toward XL518 (GDC-0973) / K. D. Rice et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2012. – № 3. – P. 416–421.