

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 Молекулярное моделирование тройного комплекса BRD4-PROTAC-CRBN

Обучающийся

А.О. Бондина

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

д. х. н., доцент, З.П. Белоусова

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

Консультант

А.Ю. Кудинов

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

Тольятти 2023

Аннотация

Технология химер, направленных на протеолиз (*англ.* PROTAC – PROteolysis TArgeting Chimera), в последние годы стала новой терапевтической парадигмой. PROTAC представляют собой гетеробифункциональные молекулы, которые разрушают белки-мишени, рекрутируя для этого убиквитин-протеасомную систему. В отличие от небольших молекул, модулирующих активность мишени путем оккупации активного сайта, химерные деградеры «ингибируют» всю биологическую функцию целевого белка, вызывая его протеасомную деградацию. PROTAC представляют собой инструмент, позволяющий действовать против представителей «неуловимого» протеома, активность трудно регулировать классическими маломолекулярными агентами: факторов транскрипции, ядерных и каркасных белков. В настоящее время PROTAC успешно деградируют различные мишени, такие как BTK, BRD4, ER, STAT3, IRAK4, Tau и т. д. ARV-110 и ARV-471, деградеры AR, уже продемонстрировали превосходную эффективность в клинических испытаниях фазы II в качестве препаратов для борьбы с раком простаты. Тем не менее, многие аспекты, касающиеся данной концепции, еще предстоит изучить: например, как рационально разработать эффективный PROTAC и оптимизировать его, чтобы он был эффективен при пероральном введении? В этом обзоре суммируются особенности технологии химерных деградеров, подробно анализируются общие принципы их разработки, а также обсуждаются типичные сферы применения PROTAC.

Abstract

The technology of proteolysis-targeted chimeras (PROTAC - PROteolysis TArgeting Chimera) has become a new therapeutic paradigm in recent years. PROTACs are heterobifunctional molecules that degrade target proteins by recruiting the ubiquitin-proteasome system. Unlike small molecules that modulate target activity by occupying the active site, chimeric degraders "inhibit" the entire biological function of the target protein, causing its proteasomal degradation. PROTACs are a tool that allows you to act against representatives of the "elusive" proteome, the activity is difficult to regulate by classical small molecular agents: transcription factors, nuclear and scaffold proteins. Currently, PROTACs successfully degrade various targets such as BTK, BRD4, ER, STAT3, IRAK4, Tau, etc. ARV-110 and ARV-471, AR degraders, have already shown excellent efficacy in phase II clinical trials as drugs to fight prostate cancer. However, many aspects regarding this concept remain to be explored: for example, how to rationally develop an effective PROTAC and optimize it so that it is effective when administered orally? This review summarizes the features of chimeric degrader technology, analyzes in detail the general principles of their development, and discusses typical applications of PROTAC.

Содержание

Введение.....	7
1 Литературный обзор	8
1.1 История открытия PROTAC	8
1.2 Преимущества PROTAC	18
1.2.1 Деградация «нелекарственных» белков	20
1.2.2 Улучшение избирательности и специфичности	21
1.2.3 Каталитический механизм действия (MOA).....	22
1.2.4 Устранение накопления лекарственных мишеней	22
1.3 Подходы к <i>in silico</i> дизайну PROTAC.....	23
1.3.1 Генерация библиотек PROTAC: конструирование линкеров	24
1.3.2 Предсказание физико-химических свойств PROTAC.....	26
1.3.3 Ранжирование библиотек PROTAC: предсказание структуры тройного комплекса	27
2 Обсуждение результатов	33
2.1 Protein Degradер Sampler.....	33
2.2 Валидация алгоритма.....	37
2.3 Дизайн линкеров	44
2.4 Индуцированная стыковка как способ повышения точности работы алгоритма	50
3 Экспериментальная часть.....	57
3.1 Компьютерное моделирование.....	57
3.1.1 Подготовка белков	57
3.1.2 Подготовка лигандов	57
3.1.3 Индуцированный докинг.....	57
3.1.4 Protein Degradер Sampler.....	58
Заключение:	59
Список используемой литературы и используемых источников.....	60

Определения, обозначения и сокращения

ALK	киназа анапластической лимфомы
AR	рецептор андрогенов
BCR	В-клеточный рецептор
BL	лимфома Беркитта
BRD4	бромодоменсодержащий белок 4
BTK	тирозинкиназа Брутона
CRBN	цереблон
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
ER	рецептор эстрогена
FAK	киназа фокальной адгезии
FKBP12	FK506-связывающий белок 12
HER2	рецептор эпидермального фактора роста человека 2
IDO1	индоламин 2,3-диоксигеназа 1
IKZF3	семейство белков, содержащим цинковый палец 3 Ikaros
IMiDs	иммуномодулирующие имидные препараты
IRAK4	киназа 4, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1
mCRPC	метастатический рак предстательной железы, устойчивый к кастрации
MDM2	гомолог мышинной двойной минуты 2
MetAP-2	метионинаминопептидаза-2
MOA	механизм действия
PEG	полиэтиленгликоль
PI3K	фосфоинозитид-3-киназа
POI	белок интереса
PROTAC	химеры, нацеленные на протеолиз
PSA	специфический антиген простаты

RAS	саркома крысы
RNAi	РНК-интерференция
SGK	сыворотка и глюкокортикоид-индуцированная протеинкиназа
STAT3	преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3
UPS	убиквитин-протеазная система
VHL	фон Хиппель-Линдау
β -TRCP	белок, содержащий повторы β -трансдуцина

Введение

Технология химер, направленных на протеолиз, в последние годы стала новой терапевтической надеждой. PROTAC представляют собой гетеробифункциональные молекулы, которые разрушают белки-мишени, рекрутируя для этого убиквитин-протеасомную систему. В отличие от небольших молекул, модулирующих активность мишени путем оккупации активного сайта, химерные деградеры «ингибируют» всю биологическую функцию целевого белка, вызывая его протеасомную деградацию. PROTAC представляют собой инструмент, позволяющий действовать против представителей «неуловимого» протеома, активность трудно регулировать классическими маломолекулярными агентами: факторов транскрипции, ядерных и каркасных белков. В настоящее время PROTAC успешно деградируют различные мишени, такие как BTK, BRD4, ER, STAT3, IRAK4, Tau и т. д. ARV-110 и ARV-471, деградеры AR, уже продемонстрировали превосходную эффективность в клинических испытаниях фазы II в качестве препаратов для борьбы с раком простаты. Тем не менее, многие аспекты, касающиеся данной концепции еще предстоит изучить: например, как рационально разработать эффективный PROTAC и оптимизировать его, чтобы он был эффективен при пероральном введении?

Несмотря на то, что еще предстоит преодолеть много препятствий и проблем, PROTAC обладают большим терапевтическим потенциалом и уникальными преимуществами. Считается, что с развитием технологий и углублением исследований, дизайн и синтез PROTAC будут постепенно оптимизироваться и совершенствоваться, что в конечном итоге откроет новый путь для лечения различных заболеваний. Одним словом, технология PROTAC не только предоставляет мощный инструмент для исследований в области медицинской и фармацевтической химии, но и дает большие надежды на разработку клинических лекарств в будущем.

1 Литературный обзор

1.1 История открытия PROTAC

Химеры, нацеленные на протеолиз (PROTAC), впервые были описаны Sakamoto, Crews и коллегами в 2001 году [1]. PROTAC представляют собой гетеробифункциональные молекулы, содержащие три компонента: мотив, связывающий интересующий белок (POI), линкер и фрагмент, связывающий убиквитинлигазу E3 (рисунок 1) [2, 3]. Молекула химерного деградера может связываться с вышеупомянутыми белками с образованием тройного комплекса POI-PROTAC-E3, что впоследствии вызывает полиубиквитинирование мишени интереса, за которым следует протеасомная деградация [4, 5].

В эукариотических клетках убиквитин-протеасомная система (UPS) является основным механизмом поддержания белкового гомеостаза, опосредуя удаление дефектных, неправильно собранных и поврежденных белков [6, 7]. UPS расщепляет белки путем субстрат-специфического присоединения убиквитина (Ub), необходимого для распознавания протеасомой 26S.

Убиквитинирование представляет собой непрерывный трехэтапный процесс, который регулируется тремя ферментами: убиквитин-активирующей лигазой (E1), убиквитин-конъюгирующей лигазой (E2) и субстрат-специфической лигазой (E3) [8-11]. E1 связывает свободный Ub путем АТФ-зависимого образования тиоэфирной связи между лизином Ubi собственным поверхностным цистеином, а затем осуществляет перенос убиквитина на E2 путем реакции трансстиоляции [12]. Ub-меченый E2 и белок-мишень рекрутируются лигазой E3 в сложный комплекс, в котором последняя катализирует процесс переноса метки деградации на субстрат [13, 14]. PROTAC, как было указано выше, изменяет нативную субстратную специфичность E3, одновременно рекрутируя ее и POI, за счет связывающих

мотивов, в результате чего белок интереса и убиквитинлигаза сближаются в пространстве. Таким образом, PROTAC имитирует специфическое распознавание субстрата лигазой E3 и использует механизм разрушения протеинов для деградации POI [15]. Механизм действия PROTAC показан на рисунке 1.

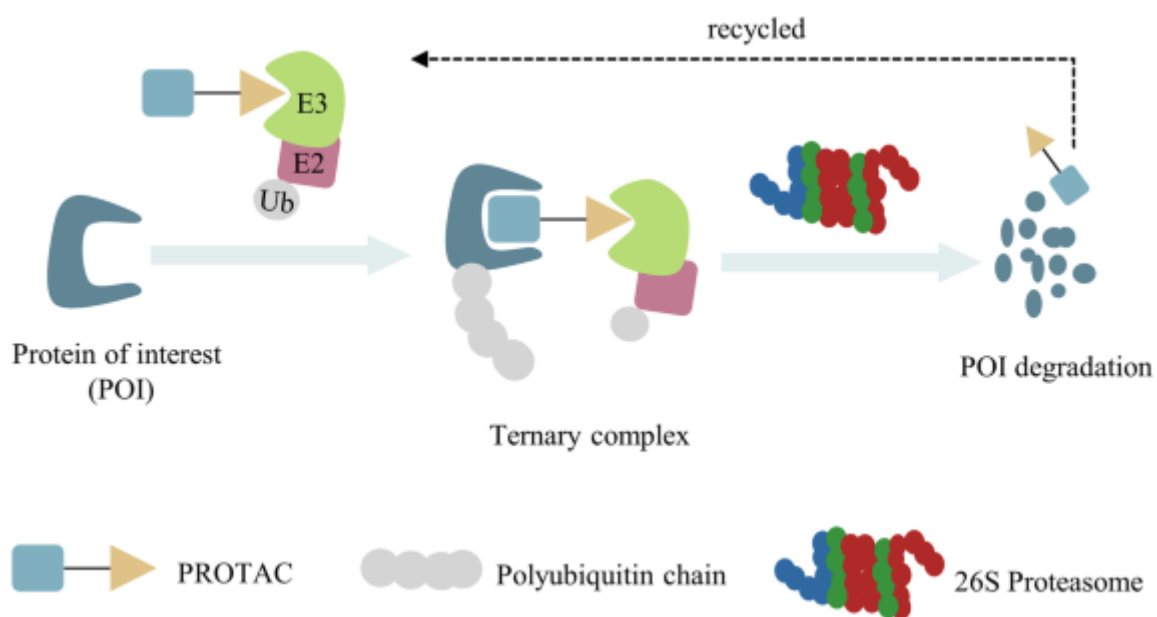


Рисунок 1 — Механизм действия PROTAC на базе убиквитин-протеазной системы.

Убиквитин-протеазная система состоит из специфических ферментов (E1, E2 и E3), модифицирующих белки с помощью убиквитина, и протеасомы, расщепляющей белки, меченные убиквитином. PROTAC содержит лиганд POI, лиганд E3 и линкер. Тройной комплекс E3-PROTAC-POI индуцирует полиубиквитинирование и опосредованную протеасомами деградацию POI

Современное открытие лекарств сосредоточено на поиске небольших молекул, обладающих высокой аффинностью связывания с белками-мишенями, которые модулируют их функцию, занимая активный сайт [16, 17]. Однако у некоторых белков отсутствуют сайты ферментативной активности (факторы транскрипции, белки семейства RAS [18], каркасные белки и регуляторные белки [19]). Такие мишени являются нечувствительными к

традиционным низкомолекулярным препаратам и относятся к так называемому «неуловимому» протеому (*англ.* Undruggbleproteome).

С появлением PROTAC стало возможным работать с такими целями, не принимая во внимание наличие активных сайтов. Химерные молекулы расширяют горизонты для разработки лекарств. Ряд препаратов PROTAC, использующихся для деградации рецепторов андрогенов (AR) [20] и рецепторов эстрогенов (ER) [21], уже вошел во II фазу клинических испытаний. На сегодняшний день химерные молекулы доказали свою эффективность в разрушении различных мишеней, таких как репрезентативные AR, ядерные рецепторы, различные киназы, факторы транскрипции и аномальные белковые агрегаты. В 2001 г. Craig Crews и его группа сообщили о первой гетеробифункциональной молекуле, состоящей из ингибитора ангиогенеза овалацина, связывающегося с метионинаминопептидазой-2 (MetAP-2), и фосфопептида IκBα, рекрутирующего убиквитинлигазу E3 β-TRCP [1]. Было показано, что белок F-бокса, содержащий повторы β-трансдукцина (β-TRCP), связывается с IκBα, негативным регулятором NF-κB.

Исследования показали, что этот PROTAC может эффективно снижать уровень MetAP-2 *in vitro*. В 2003 году химеры были применены для направленной деградации рецепторов ER и AR [22]. Фосфопептид IκBα был связан с эстрадиолом и дигидротестостероном, что делало PROTAC способными расщеплять ERα и AR. Первый клеточно проницаемый деградер был разработан Schneekloth и др. в 2004 г и содержал пептид ALAPYIP, связывающий другую лигазу E3 – белок опухолифон Хиппеля-Линдау (VHL), который мог индуцировать деградацию AR и FK506-связывающего белка 12 (FKBP12) [23, 24]. Кроме того, поли-D-аргининовая метка была включена в карбоксильный конец пептидной последовательности для улучшения мембранной проницаемости и сопротивления неспецифическому протеолизу [23].

Эти работы являются новаторскими примерами PROTAC с удовлетворительной валидностью в системах *in vitro* и *in vivo*. Хотя химеры на основе пептидов обладают преимуществами высокой биосовместимости и низкой токсичности, невозможно игнорировать ограниченную клеточную проницаемость и синтетические проблемы, вызванные большой молекулярной массой и сложностью структуры. Разработка непептидных лигандов для лигаз E3, таких как MDM2 [2], cIAP [25], VHL, CRBN [26], DCAF11 [27], DCAF15 [28], DCAF16 [29], KEAP1 [30] и RNF114 [31], быстро сдвинула PROTAC в относительно маломолекулярную область [32]. SARM-Nutlin деградер был первым полностью низкомолекулярным PROTAC, который состоял из трех частей: специфического субстрата AR, лиганда, связывающегося с E3 MDM2 и короткого растворимого полиэтиленгликолевого (PEG) линкера, соединяющего эти две боеголовки [2]. Результаты *in vitro* показали, что такой деградер способен индуцировать протеасомную деградацию рецептора андрогенов, и это является значительным улучшением по сравнению с прошлыми PROTAC.

Исследования комплекса цереблona привели к жизненно важным для концепции направленного протеолиза прорывам в 2010 году. CRBN, субъединица рецептора субстрата убиквитинлигазы CUL4-RBX1-DDB1-CRBN (CRL4^{CRBN}) E3 [33], была идентифицирована как прямая мишень для аналогов печально известного талидомида - иммуномодулирующих имидных препаратов. [34]. Эти IMiDs связываются Cereblon, обеспечивая модуляцию поверхностного интерфейса в области сайта их связывания, опосредуя узнавание и деградацию нескольких факторов транскрипции с доменами цинковых пальцев, таких как IKZF1 и IKZF3, обеспечивая анти-миеломную активность [35-38].

За последние несколько лет талидомид и его производные успешно применялись в конструировании PROTAC для направленной деградации различных классов белков [39]. ARV-8251 (рис. 2) был первой химерой, которая включала помалидомид и ингибитор BRD4 OTX0152 (рисунок 2) [26].

Этот химерный деградер может эффективно разрушать свою мишень в клетках лимфомы Беркитта (BL).

В 2012 году группа Crews и Ciulli идентифицировали первый низкомолекулярный лиганд для VHL с микромолярной активностью [40]. Чтобы улучшить аффинность и липофильность рекрутера первого поколения, Galdeano и коллеги, используя природный пептидный дегрон, узнаваемый данной лигазой, идентифицировали в нем ключевую аминокислоту, опосредующую связывание – гидроксипролин, и идентифицировали сконструированный на ее основе VH032 как наиболее мощный лиганд VHL с наномолярной аффинностью. Обнаружение новых рекрутеров данной лигазы стала важной вехой в развитии технологии PROTAC (рисунок 1). Эти лиганды открыли новые возможности для разработки PROTAC, связывающих VHL.

Кристаллическая структура VH032-VHL была решена Zengerle, предоставив структурные детали для создания новых химер, рекрутирующих VHL – например, MZ1, показанный на рисунке 2, который эффективно и избирательно деградировал BRD4. Gadd и др. на основе анализа комплекса BRD4-MZ1-VHL обнаружили, что PROTAC-индуцированная поверхность электростатических взаимодействий между белком-мишенью и E3 важна для стабилизации тройного комплекса [5]. На сегодняшний день химеры на основе VHL успешно применяются для деградации различных патогенных белков, таких как BCR-ABL [41], ALK [42] и FAK [43].

Технология PROTAC применяется для альтернативного лечения различных заболеваний. Было подтверждено, что все больше и больше целей могут быть деградированы и некоторые деградеры уже показали ряд клинических преимуществ.

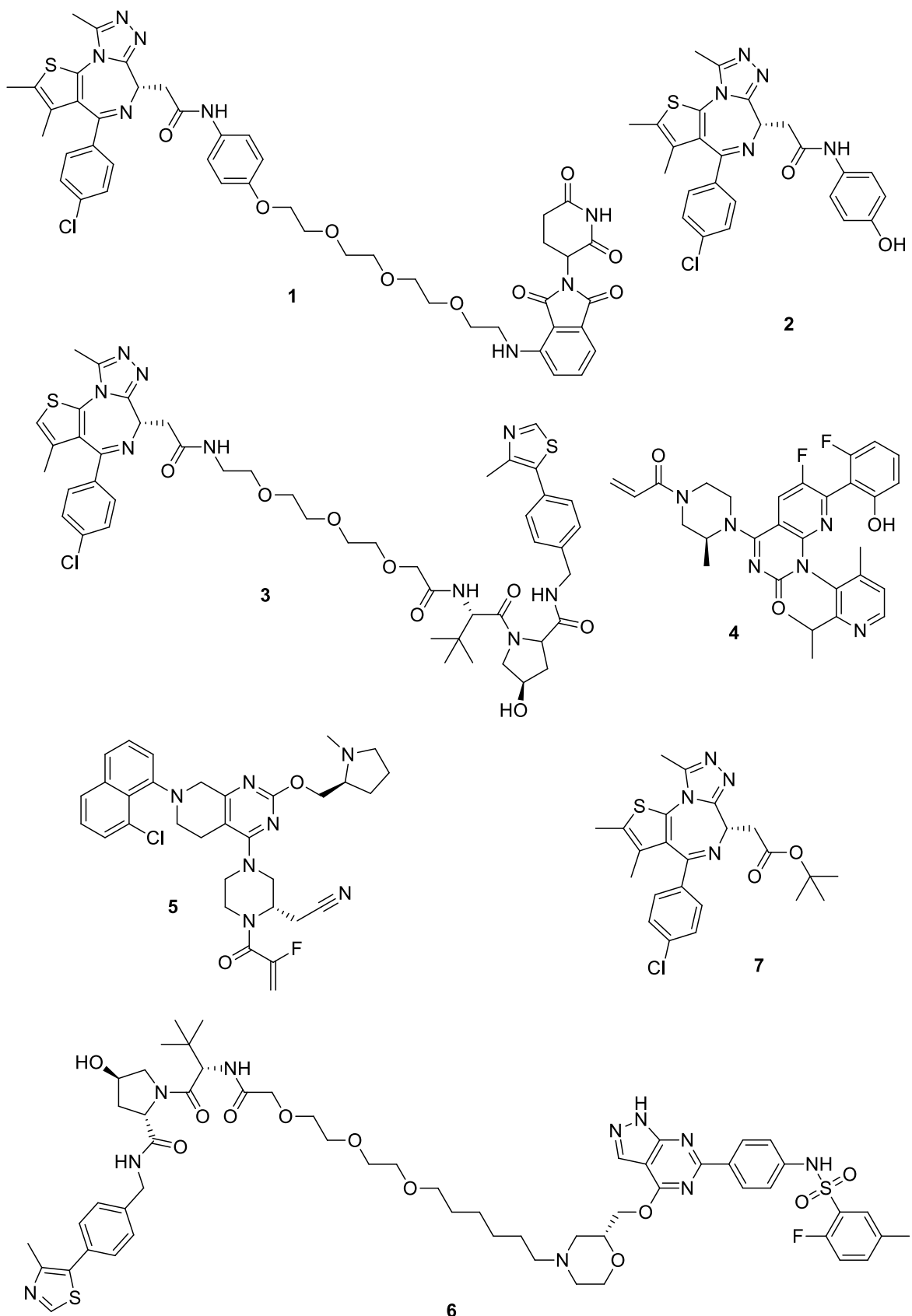


Рисунок 2 — Репрезентативные PROTAC, нацеленные на протеолиз различных белков

PROTAC, которые вошли в клинические испытания, направлены на деградацию таких мишеней как AR [44], ER [45], IRAK4, STAT3, BTK, BRD9, BCR-XL [46] и т. д. В клинике участвуют не менее 20 PROTAC (конец 2022 года (таблица 1)), и ожидается, что за ними последуют другие. Среди них ARV-110 и ARV-471 от Arvinas являются наиболее передовыми препаратами. Выше упомянутая Arvinas, C4 Therapeutics, Kymera Therapeutics и Captor Therapeutics являются первыми фармацевтическими компаниями в области разработки PROTAC. Ранние клинические данные ARV-110 и ARV-471 продемонстрировали идеальную безопасность и значимую клиническую эффективность для пациентов, доказывая терапевтическую валидность подхода.

Данные клиники показывают, что ARV-110 безопасен в качестве перорального биодоступного агента деградации. Испытания фазы I демонстрируют, что данная химера снижает уровень простатспецифического антигена (PSA) более чем на половину у 40% пациентов с mCRPC в популяции со специфической генной мутацией. Кроме того, в начальном клиническом исследовании данные биопсии одного пациента показали снижение уровней AR на 70-90%. Фаза I с участием пациентов, больных ER + и HER2-,раком молочной железы, получивших в среднем пять непрерывных курсов лечения, показало, что ARV-471 может значительно снизить уровень экспрессии ER в опухолевой ткани, снижая уровень рецептора эстрогенов в среднем на 62%, а максимально до 90%. Кроме того, данные первой фазы ARV-471 также показали, что высокий уровень деградации ER (89%) наблюдался при всех дозах 30-700 мг и хорошо переносился.

Данная химера показала деградацию как ER дикого типа, так и его мутантов. Сейчас ARV-471 проходит фазу II с увеличением дозы для оценки эффективности в лечении пациентов с местнораспространенным или метастатическим раком молочной железы. В таблице 1 приведена сводка выбранных деструкторов в клиническом состоянии.

Таблица 1 — Сводка выбранных деструкторов в клиническом состоянии и приближение к нему

Кандидат	Мишень	Клиника исследования	Заболевание	Клиническое исследование
ARV-110	AR	Arvinas	Метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы	I
ARV-766	AR	Arvinas	Метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы	I
CC-94676	AR	Celgene	Метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы	I
GT-20029	AR	Kintor	Рак простаты	I
HP518	AR	Hinova	Метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы	I
ARV-471	ER	Arvinas	ER + /HER2-местнораспространенный или метастатический рак молочной железы	II
AC682	ER	Accutar Biotech	Местно-распространенный или метастатический ER + рак молочной железы	I
DT-2216	BCR-xL	Dialectic	Твердая опухоль/гематологическое злокачественное новообразование	I
KT-474	IRAK4	Kymera	Атопический дерматит (АД) или гнойный гидраденит (ГС)	I
KT-413	IRAK4	Kymera	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома	I
KT-333	STAT3	Kymera	Твердая опухоль/гематологическое злокачественное новообразование	I
NX-2127	BTK	Nurix	В-клеточные злокачественные новообразования	I

Продолжение таблицы 1

Кандидат	Мишень	Клиника исследования	Заболевание	Клиническое исследование
NX-5948	BTK	Nurix	В-клеточные злокачественные новообразования/аутоиммунные заболевания	I
BGB-16673	BTK	BeiGene	В-клеточные злокачественные новообразования	I
HSK-29116	BTK	Haisco	Рецидивирующие/рефрактерные В-клеточные злокачественные новообразования	I
CFT8634	BRD9	C4 Therapeutics	Синовиальная саркома	I/II
FHD-609	BRD9	Foghorn Therapeutics	Расширенная синовиальная саркома	I
CFT8919	EGFR L858R	C4 Therapeutics	Немелкоклеточный рак легкого	В исследовании
LNK-01002	Ras GTPase	Lynk	Первичный (PMF) или вторичный миелофиброз (PV-MF, ET-MF) или острый миелоидный лейкоз	В исследовании
CG001419	TRK	Cullgen	Рак и другие признаки	В исследовании

Результаты клинических испытаний ARV-110 и ARV-471 рассматривались как вектор для дальнейшего развития области. Поскольку PROTAC обуславливает некий сдвиг парадигмы в сфере разработки и применения лекарственных средств, все еще остаются серьезные вопросы о клинической трансформации таких препаратов. Вопросы о том, как химеры обеспечивают терапевтический эффект без соблюдения правила пяти Липински, и как минимизировать возможные нецелевые эффекты, пока являются открытыми. Если результаты последующих испытаний фазы II и фазы III смогут демонстрировать достижение ожидаемых целей, PROTAC в ближайшем будущем начнут клиническое применение, что станет

историческим прорывом в исследованиях и разработке препаратов для направленной деградации белка.

Ниже перечислены мишени, для деградации которых были PROTAC применены за последние 5 лет. Мишени перечислены в таблице 2.

В следующем разделе кратко перечислены преимущества технологии направленного протеолиза по сравнению с другими технологиями. Описан недавний прогресс PROTAC в нацеливании на различные родственные белки, особенно в клинических испытаниях. Также обсуждены и рекомендованы основные соображения по разработке новых молекул PROTAC *in silico*.

Таблица 2 — PROTAC, впервые зарегистрированные за последние 5 лет (2017–2022 гг.)

Мишень	Год	Ссылка
AKT	2020	[47]
Alpha-syn, SNCA, NACP	2020	[48]
Alpha-tubulin, TUBA	2020	[49]
AXL, UFO	2020	[50]
BCL2	2019	[51]
BCL-xL	2019	[52]
Beta-tubulin, TUBB	2020	[49]
BLK	2020	[53]
BRD2 BD2	2018	[54]
BTK	2018	[55]
Cdc20, p55CDC	2019	[56]
CDK2, CDKN2	2020	[57]
CDK4, PSK-J3	2019	[58]
CRBN	2018	[59]
CYP1B1	2020	[60]

Продолжение таблицы 2

Мишень	Год	Ссылка
EED	2020	[61]
EGFR, ERBB, HER1	2018	[62]
EZH2, KMT6, ENX-1	2020	[61]
FAK, PTK2, FAK1	2018	[63]
HDAC3	2020	[64]
IDO1	2020	[65]
MDM2	2019	[66]
Tau	2019	[67]
VHL, pVHL	2017	[68]
Wee1, WEE1hu	2020	[69]
HER2	2022	[70]

1.2 Преимущества PROTAC

Разнообразные стратегии (например, использование низкомолекулярных ингибиторов, моноклональных антител и РНК-интерференция (RNAi)) стали хорошо зарекомендовавшими инструментами для терапевтического действия. Активность маломолекулярных ингибиторов обычно зависит от того, насколько продуктивно они могут конкурировать в оккупации активного сайта мишени с эндогенными лигандами. Долгосрочное клиническое применение низкомолекулярных ингибиторов обычно ограничивается проблемами лекарственной устойчивости и побочных эффектов [71]. Препараты на основе моноклональных антител регулируют клеточные процессы, модулируя внеклеточные белок-белковые или белок-лигандные взаимодействия. Основные преимущества таких лекарств связаны с их высокой аффинностью к мишеням, тогда как недостатки обусловлены с плохой клеточной проницаемостью, недоступностью при пероральном приеме

и высокой стоимостью. РНК-интерференция используется для индуцирования «замалчивания» генов путем нокдауна мРНК. Однако нецелевые эффекты, плохая биодоступность и неудовлетворительная проницаемость затрудняют их изучение и использование [72].

В качестве многообещающей терапевтической стратегии PROTAC демонстрируют уникальные преимущества по сравнению с описанными выше подходами. Сравнение PROTAC с другими терапевтическими стратегиями показано в таблице 3 [73]. Когда целевой белок деградируется 26S протеасомой, химера диссоциирует из комплекса и продолжает вновь оказывать эффект (подобно механизмам регенерации в теории катализа), что обеспечивает крайне низкие эффективные дозы. Кроме того, химеры полностью устраняют функциональные возможности мишени, а из-за отсутствия необходимости конститутивно аффинно связываться в сайте, даже лиганды с плохим сродством к POI/E3 могут использоваться для деградации.

Таблица 3 — Сравнение PROTAC с другими терапевтическими стратегиями

	Ингибиторы малых молекул	Моноклональные антитела	PROTAC	РНК Интерференция
Действие на внутриклеточные мишени	+	-	+	+
Проницаемость	+	+/-	+	+/-
Аффинное связывание в активном сайте	+	+	-	-
Действие на «неуловимый» протеом	-	+	+	+
Каталитический механизм действия	-	-	+	+

Продолжение таблицы 3

	Ингибиторы малых молекул	Моноклональные антитела	PROTAC	РНК Интерференция
Деградация патогенных белков	-	-	+	+
Пероральная биодоступность	+	-	+	-
Селективность	+/-	+	+	+

1.2.1 Деградация «нелекарственных» белков

Хотя FDA одобрило почти 400 препаратов, нацеленных на белки человека, существует около 3000 патогенных мишеней, действовать на которые мы пока не можем [74]. Все эти цели являются представителями т. н. «неуловимого» протеома из-за отсутствия подходящих активных карманов, которые могут быть заняты малыми молекулами (факторы транскрипции) [75]. Кроме прочего такие мишени выполнять каркасные функции, не поддающиеся модуляции [76]. Следовательно, трудно регулировать эти не поддающиеся лекарственному воздействию белки с помощью непрерывной занятости связывающего кармана [77-79]. К счастью, PROTAC-опосредованная деградация белка может решить эти проблемы. В отличие от традиционных низкомолекулярных ингибиторов, PROTAC не требуют высокого сродства и длительного присутствия в сайт мишени, и, как упоминалось выше, даже лиганды с низкой аффинностью могут вызывать эффективную деградацию [80, 81].

В качестве примера обратимся к белкам семейства RAS, которые являются наиболее часто мутирующими онкобелками при раке легкого, колоректальном раке и раке поджелудочной железы [82]. RAS включают три изоформы: KRAS, NRAS и HRAS [83]. Среди них мутации KRAS является причиной развития рака с самой высокой смертности. Из-за отсутствия четко

определенного связывающего кармана в течение многих лет KRAS рассматривался как белок «неуловимого» протеома. Однако FDA ускорило одобрение двух ковалентных лигандов: Соторасиба AMGEN (AMG 510)⁴ и Адаграсиба Mirati Therapeutics (MRTX849)⁵ (Рисунок 2), которые продемонстрировали сильное ингибирование KRASG12C в клинических испытаниях. К сожалению, длительное и продолжительное использование неизбежно приводило к серьезному эффекту из-за приобретенной лекарственной устойчивости [84]. В 2020 году Crews и коллеги разработали и синтезировали серию KRASG12C PROTAC путем связывания MRTX849 с лигандами VHL. После скрининга активности деградации они идентифицировали один из наиболее мощных деградеров, который быстро индуцировал истощение белка KRASG12C ($DC_{50} = 0,59$ мкМ, клетки NCI-H2030) [85].

1.2.2 Улучшение избирательности и специфичности

Основная цель исследователей в области медицинской химии - открытие молекул с высокой селективностью для минимизации побочных эффектов и токсичности, что трудно достижимо из-за высокой гомологии между белками одного семейства. Тонких различий в аминокислотных последовательностях сайтов между белками недостаточно, чтобы обеспечить адекватную избирательность для низкомолекулярных ингибиторов. Уникальный механизм PROTAC наделяет его свойствами двойного селективного распознавания субстрата: в дополнение к субстратной специфичности лигандов целевого белка, сборка стабильных тройных комплексов POI-PROTAC-E3 перед деградацией требует образования белок-белковых взаимодействий между лигазой и POI за счет комплиментарности поверхностей.

Типичным примером обеспечения изоформной селективности киназ является нацеливание на сывороточную и глюкокортикоид-индуцированную протеинкиназу (SGK); семейство SGK включает три изоформы: SGK-1, SGK-2 и SGK-3. Сообщалось, что мутантная PI3K может индуцировать онкогенез

через SGK3-зависимый механизм [86]. Некоторые данные свидетельствуют о том, что текущим АТФ-конкурентным ингибиторам не хватает селективности из-за высокой степени гомологии сайтов SGK[87-89]. Для решения этой проблемы был разработан высокоспецифичный SGK3-PROTAC16 (рисунок 2). Эта химера была сконструирована группой Товелла на основе неселективного ингибитора 308-R специально для деградации SGK3 [90]. При микромолярной концентрации PROTAC внутриклеточные уровни SGK3 могут быть значительно снижены без влияния на количество на SGK1 и SGK2.

1.2.3 Каталитический механизм действия (МОА)

Традиционные низкомолекулярные ингибиторы действуют дозозависимым образом для достижения терапевтического эффекта за счет максимально возможной оккупации рецептора. Чрезмерные концентрации лекарств приводят к нежелательным побочным эффектам [91]. PROTAC могут инициировать каталитический механизм деградации белков-мишеней [92]. Теоретически химеры могут действовать в более низких диапазонах концентраций и меньшей токсичностью. Кроме того, низкие дозы PROTAC могут снизить вероятность возникновения нецелевых эффектов [77].

1.2.4 Устранение накопления лекарственных мишеней

Действие низкомолекулярных ингибиторов может привести к накоплению белка даже за относительно короткое время [93]. Это можно объяснить двумя причинами: связывание лекарств с мишенями может стабилизировать структуру белков, тем самым продлевая их период полураспада, а длительное торможение сигналинга может вызвать активацию компенсационной экспрессии цели. Деградация мишени может устранить данный недостаток. Например, нацеливание на BRD4 является эффективным средством лечения рака, вызванного MYC [94, 95]. Однако низкомолекулярный ингибитор BRD4, JQ1 7(рисунок 2) и OTX015 приводил к устойчивому накоплению мишени, и для подавления нижестоящего c-MYC требовалась высокая концентрация лекарства. В 2015 году Lu и другие разработали мощный BRD4 PROTAC (ARV-825) путем рекрутирования

лигазы CRBN E3, которая индуцировала быструю и устойчивую деградацию белка во всех клеточных линиях BL [26]. Это подчеркивает преимущества PROTAC перед низкомолекулярными ингибиторами.

1.3 Подходы к *in silico* дизайну PROTAC

Одной из основных проблем концепции PROTAC, стоящей перед исследователями, является отсутствие какой-либо унифицированной стратегии рационального конструирования химерной молекулы для любой заданной пары E3/POI[1]. Особую сложность здесь представляет дизайн линкера – показано, что длина и состав компоновщика в значительной степени влияют на стабильность образующегося тройного комплекса, а значит и на эффективность деградации мишени [2]. На сегодняшний день, классический маршрут оптимизации активности и свойств деградера представляет собой долгий и ресурсозатратный итеративный процесс синтеза объёмных библиотек химерных молекул, отличающихся компоновщиком, и их последующее биологическое тестирование [3]. Безусловно, существуют некоторые устоявшиеся подходы, несколько упрощающие и рационализирующее путь оптимизации: например, оптимальные точки крепления соединительного фрагмента определяют с использованием кристаллических структур комплексов лиганд-POI или с помощью молекулярного докинга (в случае отсутствия данных PCA). Оптимальный диапазон длины линкера, в свою очередь, можно установить, используя простые алкильные цепи, а последующее улучшение свойств добиваться постепенным вводом PEG/гетероциклических или других звеньев [2].

В данном разделе в основном будет затронута проблематика, текущие подходы и методы генерации и скринга тройных комплексов, однако косвенно мы обязаны упомянуть также еще несколько приложений *in silico* моделирования, нашедших свое применение в дизайне химерных деградеров.

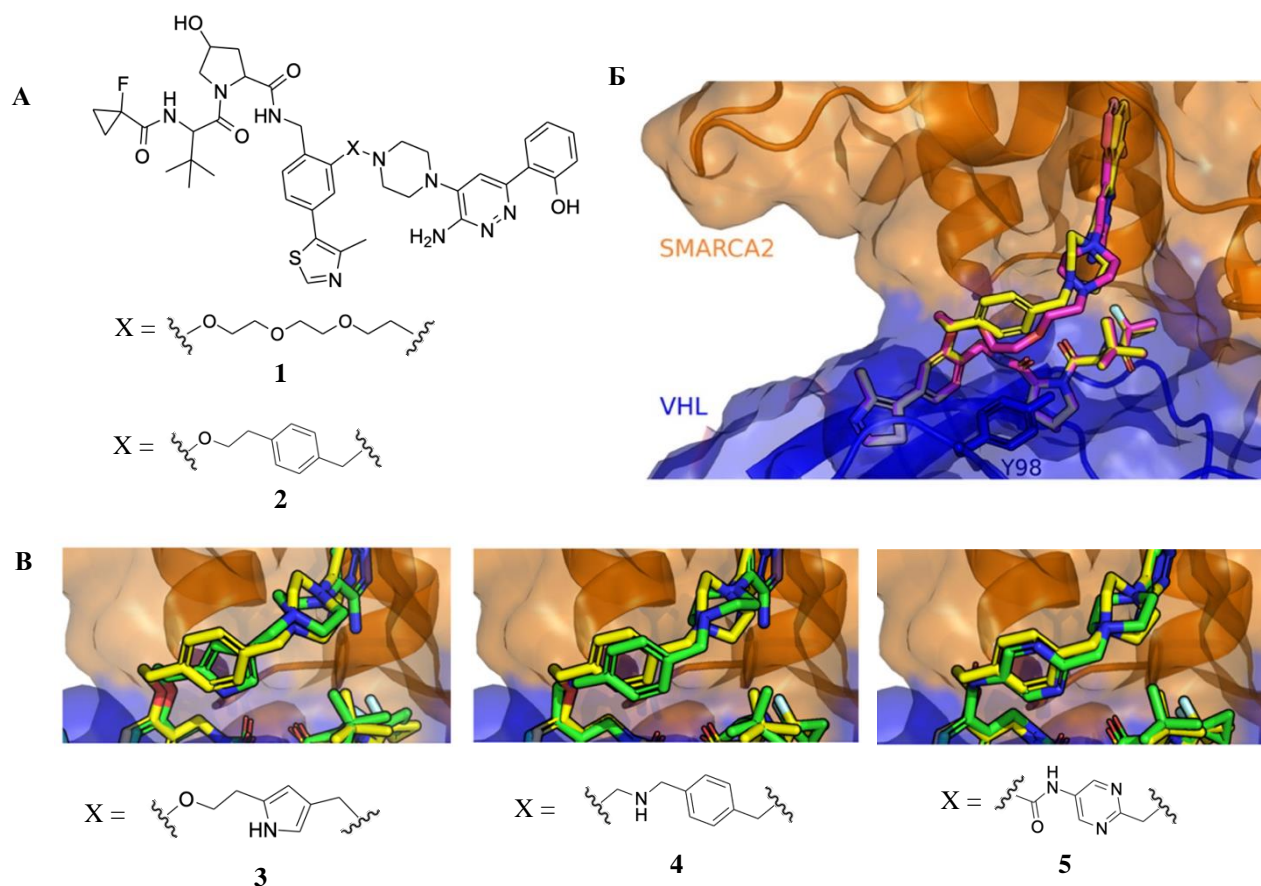
1.3.1 Генерация библиотек PROTAC: конструирование линкеров

Немаловажным на начальных этапах разработки PROTAC являются методы конструирования библиотек химер, а точнее (в случае, если лиганды POI и E3 определены) – конструирования различных линкеров.

Одним из инструментов для конструирования таких библиотек является опубликованный в 2020 году DeLinker – алгоритм, основанный на генеративной модели машинного обучения и первоначально задумывающийся как элемент FBDD[99]. Стоит отметить, что данный метод учитывает трехмерные данные для моделирования. Алгоритм принимает в качестве входных данных координаты двух молекулярных фрагментов и разрабатывает молекулу, включающую обе подструктуры, либо генерируя, либо заменяя компоновщик между ними, допуская возможность настройки длины линкера. Путь к конечной точке включает создание новых молекул итеративным способом "связь за связью" из пула атомов.

Авторы исследовали возможности модели генерировать новые уникальные линкеры для PROTACs VHL-SMARCA2 [100], основываясь на кристаллических структурах (PDBID: 6HAY, 6HAX [100]). Коллеги идентифицировали 1 в качестве отправной точки в дизайне: линкер содержал PEG-звенья и имел оптимальную длину; дальнейшая оптимизация привела к соединению 2, содержащему фенильный мотив в компоновщике, удачно взаимодействующий с липофильным остатком Tyr98 на поверхности VHL.

Первоначально DeLinker сгенерировал 2150 уникальных конформаций, из которых 3 удачно воспроизводят геометрию нативного компоновщика в областях критических взаимодействий, показанных на рисунке 3 [5]. Очевидным недостатком метода является невозможность учета ряда специфических электростатических взаимодействий.



А – структуры PROTAC 1 и 2; Б – их режим связывания в тройном комплексе: желтый – 2, лиловый – 1; В – Наложение структур PROTAC 3, 4 и 5, сгенерированных DeLinker (зеленые) на нативный деградер 2 (желтый)

Рисунок 3 – Моделирование связывания PROTACVHL-SMARCA (PDBID: 6HAY).

Похожий подход реализуется также алгоритмом SyntaLinker[101], однако, как и предыдущий метод, учет и одновременная оптимизация физико-химических параметров генерируемых библиотек ограничены [102].

Интересным является подход, о котором было сообщено в работе [103], в которой авторы используют архитектуру графовой нейросети GraphINVENT [104], обучая генеративную модель на уникальном наборе данных о DC₅₀ различных деградеров. Сами же коллеги указывают на небольшое число точек входных данных в качестве недостатка своего метода. Более того, как и авторы

всех вышеупомянутых публикаций, генерация «активных» PROTAC не подкрепляется синтезом и экспериментальным подтверждением.

1.3.2 Предсказание физико-химических свойств PROTAC

Прогнозирование пероральной биодоступности, клеточной проницаемости и растворимости, без сомнения, важно при разработке молекул химер. PROTACs обычно находятся за пределами химического пространства лекарств, охватываемого правилом пяти Липински [105], а оптимизация этих параметров играет ключевую роль для конструирования эффективной химеры [106].

С точки зрения подходов к прогнозированию различных физико-химических свойств PROTAC, стоит отметить несколько важных аспектов. Из-за того, что химеры формируют новое пространство свойств в силу отличий концепции от традиционных маломолекулярных препаратов, существующие вычислительные инструменты могут не верно предсказывать интересующие свойства: на этапе выполнения параметризации нативных алгоритмов соответствующие представители не были включены в обучающие и контрольные выборки – о чем и сообщают авторы работы [107]: ПО, используемое ими для предсказания ADMET параметров набора PROTAC (ADMETPredictor), предупреждало о том, что структуры не были охвачены набором данных, используемым для настройки модели [107].

Коллеги в публикации [108] указывают на необходимость ухода от классических 2D-дескрипторов свойств молекулы: cLogD, TPSA, SASA и т. д. в пользу терминов, вычисляемых на основе трехмерных данных. Авторы успешно использовали набор таких дескрипторов для прогнозирования различных параметров ряда соединений, лежащих за пределами пространства правила пяти, и получили более высокие значения корреляции с экспериментами. Однако, не совсем понятно, как данный подход может быть реализован в контексте PROTAC из-за сложности и неоднозначности процедур конформационного поиска химер.

1.3.3 Ранжирование библиотек PROTAC: предсказание структуры тройного комплекса

Предсказание структуры стабильного тройного комплекса E3-PROTAC-POI является ключевым элементом всего дизайна химер *in silico*. Имея валидный и точный метод создания таких моделей, можно рационально и относительно быстро производить начальный дизайн линкера или же осуществлять выборку различных линкеров для конструирования библиотек.

Для данных целей активно применяются подходы белок-белкового докинга в качестве генератора структур возможных комплексов [109-111], всевозможные методы конформационного анализа для исчерпывающей выборки конформационного пространства PROTAC, подходы молекулярной динамики и нейронных сетей, рассмотренные в этом разделе [112-113].

Масштабная работа в области моделирования структур была опубликована Дрэммондом и Уильямсом в 2019 году. Авторы предложили несколько вычислительных методов, основанных как на белок-белковом докинге и симуляции молекулярной динамики, так и на простой выборке конформаций PROTAC. Схематично каждый из описанных методов изображен на рисунке 4 [114].

Первый метод требует в качестве входных данных координаты двух белково-лигандных комплексов (поз связывания рекрутеров POI и E3 в соответствующих мишенях), а также предоставленную пользователем структуру полноценного PROTAC. Начальная конформация деградера конструируется путем поочередного присоединения каждого рекрутера к молекуле (в зафиксированной белок-связывающей конформации). После чего происходит достройка структур E3 и POI вокруг соответствующих лигандов, а возникающие стерические конфликты разрешаются поэтапной минимизацией путем отбора торсионных углов в области линкера.

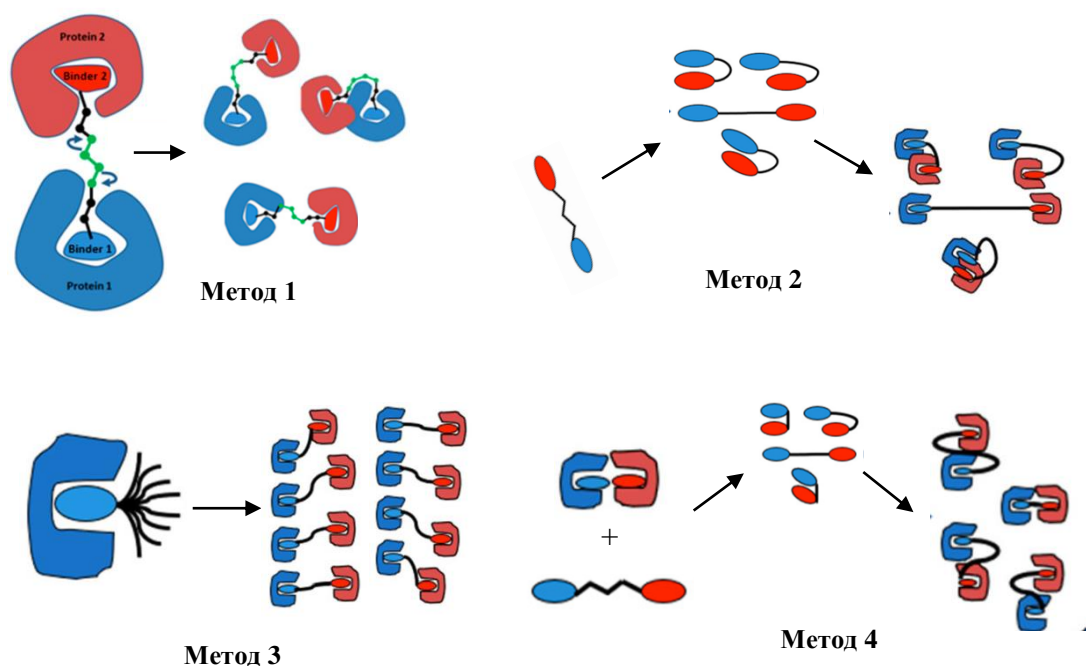


Рисунок 4 – Схематичное представление маршрутов моделирования тройных комплексов PROTAC

Каждая уникальная конформация сохраняется, а затем дополнительно оценивается. (2) Второй метод похож на предыдущий, однако его первый этап включает генерацию конформационного ансамбля PROTAC без учета белков, которые затем восстанавливаются для каждого конформера; отбор конформаций происходит на основе столкновений. (3) В третьем метода генерация конформации происходит на основе одного комплекса (как правило, меньшего) при фиксации его лиганда и отборе остальной молекулы методом LowMode симуляции молекулярной динамики [115]. После наложения второго белка свободные от перекрытий конформации тройного комплекса сохраняются. (4) Четвертый метод подразумевает белок-белковый докинг на первом этапе, параллельный независимый отбор стабильных конформаций свободной химеры, а затем их совмещение с целью найти

совпадение ненапряженной геометрии PROTAC, удачно «вписывающейся» в состыкованную позу [119].

Коллеги провели валидацию алгоритма на нескольких доступных кристаллических структурах деградеров, однако, как они сами отмечают, все еще трудно определить, какие из отобранных поз являются кристаллоподобными.

Ярким примером подхода, основанном на белок-белковой стыковке можно считать инструмент PRosettaC, детали работы которого были опубликованы в сентябре 2020 [110]. Входные данные, аналогичные вышеописанным Дрэммондом и Уильямсоном, должны содержать координаты *анкерных* атомов рекрутеров (чаще всего определяемых как точки прикрепления линкера). Первой операцией данного протокола является грубая выборка возможных расстояний между анкерными точками: с шагом в 1 Å генерируется 200 случайных позиций пар рекрутеров, для каждой из которых создается случайная конформация. После отбрасывания неправдоподобных и стерически конфликтных случаев, конформеры суммируются. Нижние и верхние пороги на диаграмме распределения удачных конформаций являются ограничениями дистанции между анкерными атомами на втором этапе – белок-белковом докинге. Диаграмма распределения, рассчитанная авторами для моделирования комплекса PROTACBRD4-CRBNdBET6 (PDBID: 6BOY[116]) представлена на рисунке 5.

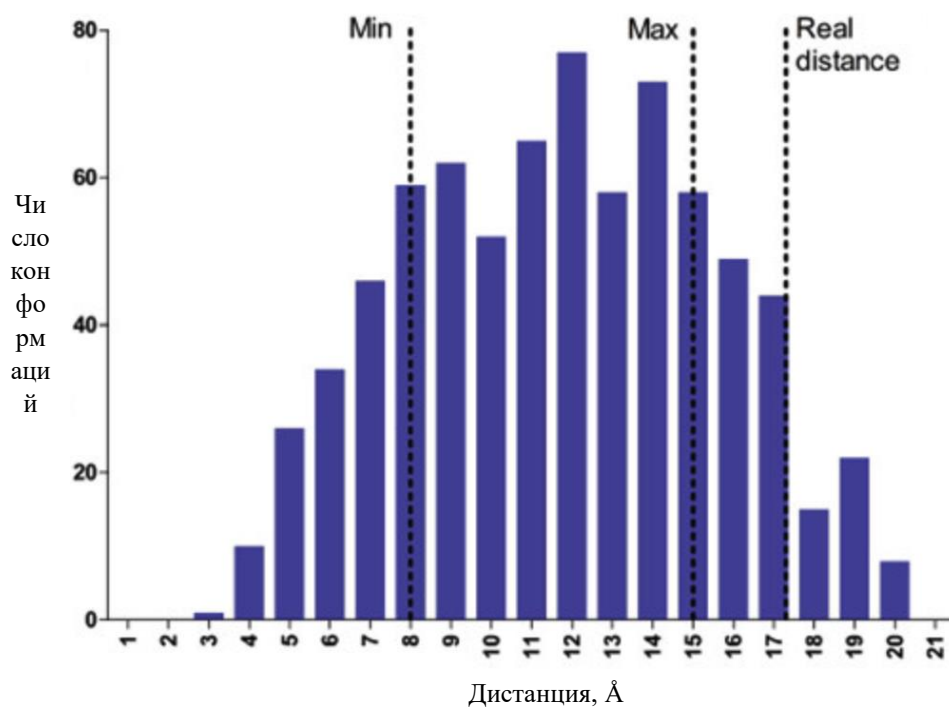


Рисунок 5 – Диаграмма распределения числа конформеров для каждого кластера расстояния между анкерными атомами

Грубая стыковка с помощью алгоритма взаимодополняемости формы PatchDocking[117], последующее уточнение вычислениями на сервере RosettaDock[118] позволяет получить 50 моделей-гипотез тройного комплекса высокого разрешения, в которых производится моделирование линкера с финальной кластеризацией результатов [119]. После параметризации алгоритма с использованием шести экспериментальных структур авторы протестировали свою модель прогнозирования для шести дополнительных тройных комплексов. Для одного из шести комплексов родная структура не напоминала ни один из предсказанных кластеров, для трех других почти нативная геометрия ранжировалась ниже прогнозов. Схематично рабочий процесс PRosettaC представлен на рисунке 6.

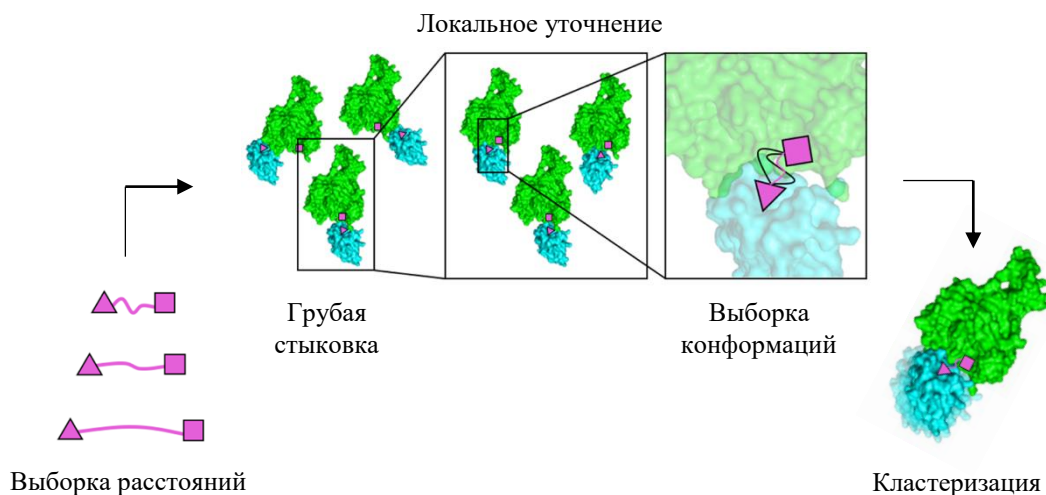


Рисунок 6 – Рабочий процесс PROSETTA

В некоторой степени модификацией процесса на основе Rosetta стал алгоритм, опубликованный в работе [109]. В этой работе протокол грубой белок-белковой стыковки на основе быстрого преобразования Фурье FRDOCK[111] итеративно совмещен с RosettaDock оптимизацией в сложный каскад, включающий фильтрацию и кластеризацию результатов. Согласно данным авторов, их алгоритм позволяет работать с т. н. несвязанными структурами белков, в отличие от всех вышеописанных случаев, когда начальные комплексы получались путем экстракции их из депонированных тройных комплексов. В ходе валидации моделей коллегам удалось получить модели, удовлетворяющие критериям среднего или высокого качества CARPI (*англ. A Critical Assessment of Information-guided Protein Docking Predictions*, Критическая оценка прогнозов белок-белковой стыковки на основе известных данных [119]). Кластер, содержащий как минимум одну позу, близкую к нативной, занимал первое место в 5 из 14 случаев, однако только один удовлетворял высокому качеству модели согласно CARPI [115].

В работе [112] Ляо и коллеги использовали подходы молекулярной динамики для релаксации поз PROTAS. Авторы создали рабочий процесс,

включающий белок-белковую стыковку на первом этапе, короткие симуляции MD с явным растворителем, кластеризацию и предварительное ранжирование на основе MMGBSA. Для всех четырех тестовых случаев, которые они рассматривают, лучшая поза оказывается почти кристаллической. Такой результат выглядит довольно интересным, но количество комплексов в тестовой выборке было довольно небольшим, а некоторые детали протокла различаются для каждой из структур. Таким образом, метод интересен, но, безусловно, требует более обширного тестирования.

2 Обсуждение результатов

Как уже отмечалось выше, концепция химер, направленных на протеолиз, представляет собой крайне перспективную терапевтическую стратегию. PROTACs являются одним из немногих инструментов для работы с неуловимым протеомом, позволяют преодолеть ограничения, свойственные «классическим» малым молекулам, в частности, резистентность, вызванную мутациями активного сайта [10.1038/s41573-021-00371-6]. Из-за отсутствия унифицированной стратегии рационального дизайна химерной молекулы для любой пары E3-POI, разработка и оптимизация эффективного PROTAC представляет собой крайне время- и ресурсозатратный процесс [10.37349/etat.2020.00018]. По этой причине методы молекулярного моделирования, особенно в контексте дизайна линкеров, являются инструментами, способными облегчить и упростить конструирование новых химерных деградеров.

Целью данной работы стала валидация оригинального алгоритма Schrodinger с точки зрения возможности его использования для рационального дизайна линкеров PROTAC.

Для чего первоначально нам было необходимо протестировать работу программы в различных режимах с целью выявления оптимального (согласно числу генерируемых комплексов, обогащению результатов истинными решениями); проанализировать доступные по итогу расчета физико-химические величины, с помощью которых можно было бы однозначно идентифицировать наиболее вероятные структуры, в случае необходимости продумать возможные варианты оптимизации точности работы алгоритма.

2.1 Protein Degradер Sampler

В 2022 году коллеги из Schrodinger представили программное решение, позволяющее генерировать и оценивать структуры возможных тройных

комплексов POI-PROTAC-E3; Оригинальный алгоритм требует в качестве входных данных оптимизированную трехмерную структуру PROTAC, а также структуры лигазы и мишени интереса с соответствующими боеголовками в сайтах связывания; последние могут быть получены путем подготовки кристаллических комплексов или посредством докинга. На первом этапе происходит исчерпывающее исследование фазового пространства свободного деградера одним из следующих методов конформационного поиска:

– MCMM – молекулярное моделирование методом Монте-Карло (*англ.* Monte-Carlo Molecular Modeling). Представляет собой классический стохастический метод конформационного поиска, в ходе которого на каждом шаге величины торсионных углов изменяются случайным образом [ссылка];

– LMCS – конформационный поиск методом низкочастотных нормальных колебаний (*англ.* Low Mode Conformational Search). Данный подход позволяет обнаруживать седловые точки и минимумы на гиперповерхности потенциальной энергии путем градиентного слежения за значениями собственного вектора молекулярной системы (следованием за модой, *англ.* mode-following), полученными с помощью анализа нормальных колебаний [10.1021/ja952478m];

– ConfGen – поиск с помощью оригинального алгоритма Schrodinger, в ходе которого происходит разрыв молекулы по свободно вращающимся экзоциклическим связям, генерация конформаций для полученных фрагментов и последующее обратное соединение их в единую структуру различными способами [10.1021/ci100015j] [https://www.schrodinger.com/sites/default/files/schrodinger_confgen_whitepaper_final.pdf];

– RDKit – подход, использующий принципы метрической геометрии и включающий создание для искомой молекулы матрицы межатомных расстояний и последующее случайное изменение значений ее элементов (в определенных пределах) [<https://www.rdkit.org>];

– Desmond – еще один оригинальный алгоритм Schridnger, представляющий собой метод исследования конформационного пространства методом молекулярной динамики [https://dl.acm.org/doi/proceedings/10.1145/1188455].

После получения первичного пула конформаций происходит наложение структур мишени интереса и E3-лигазы в соответствии с координатами боеголовок; конформеры, приводящие к межатомным столкновениям отсеиваются; гибкие настройки алгоритма позволяют выбрать, какая дистанция и между какими (C α , только тяжелыми или всеми) атомами будет идентифицирована как столкновение.

Заключительный этап представляет собой уточнение и оценку структур получившихся тройных комплексов с помощью алгоритма белок-белкового докинга PIPER, который реализует классический для макромолекулярной стыковки корреляционный подход с обратным Фурье преобразованием, дополненный статистическими потенциалами парного взаимодействия DARS (Приманки как эталонные состояния, *англ.* Decoys As the Reference State) [PIPER: An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials]. Рабочий процесс PIPER вне алгоритма Protein Degradar Sampler включает исчерпывающий жесткий поиск вращений одного из партнеров по связыванию относительно другого, жестко закрепленного на сетке, в узлах которых рассчитываются потенциалы взаимодействий, и являющиеся терминами скоринговой функции (формула 1).

$$E = \omega_0 + \omega_1 E_{shape} + \omega_2 E_{elec} + \omega_3 \sum_{i=1}^{N_R} \sum_{j=1}^{N_L} -RT \ln \left(\frac{v_{ij}^{obs}}{v_{ij}^{ref}} \right), \quad (1)$$

где E – суммарное значение скоринговой функции,

E_{shape} – термин взаимной комплементарности форм партнеров по связыванию,

E_{elec} – термин электростатических взаимодействий между партнерами по связыванию,

$$\sum_{i=1}^{N_R} \sum_{j=1}^{N_L} -RT \ln \left(\frac{v_{ij}^{obs}}{v_{ij}^{ref}} \right) - \text{упоминаемый выше потенциал DARS:}$$

i, j – пары атомов, N_R, N_L – все атомы партнеров по связыванию,

v_{ij}^{obs} – наблюдаемое число взаимодействий между атомами типа i и j ,

v_{ij}^{ref} -- ожидаемое число взаимодействий между атомами типа i и j ,

ω_n – коэффициенты регрессии.

С помощью серии Фурье преобразований для всех вращений вычисляются значения соответствующих корреляционных функций, представляющих собой гиперповерхность, где точки максимума будут соответствовать самой выгодной ориентации. В последствии результаты кластеризуются, а в качестве выходных поз выступают центры соответствующих кластеров. Сами разработчики указывают, что для интерпретации результатов скоринга следует учитывать такие параметры, как размер кластера и PIPER Pose Energy – величину, характеризующую значение оценочной функции для центра кластера. В публикации [PIPER: An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials] авторы отмечают, что кластеры, отличающиеся наибольшим размером, гораздо чаще включают позы, близкие к кристаллическим.

Весь же рабочий процесс Protein Degradar Sampler представлен на рисунке 7.

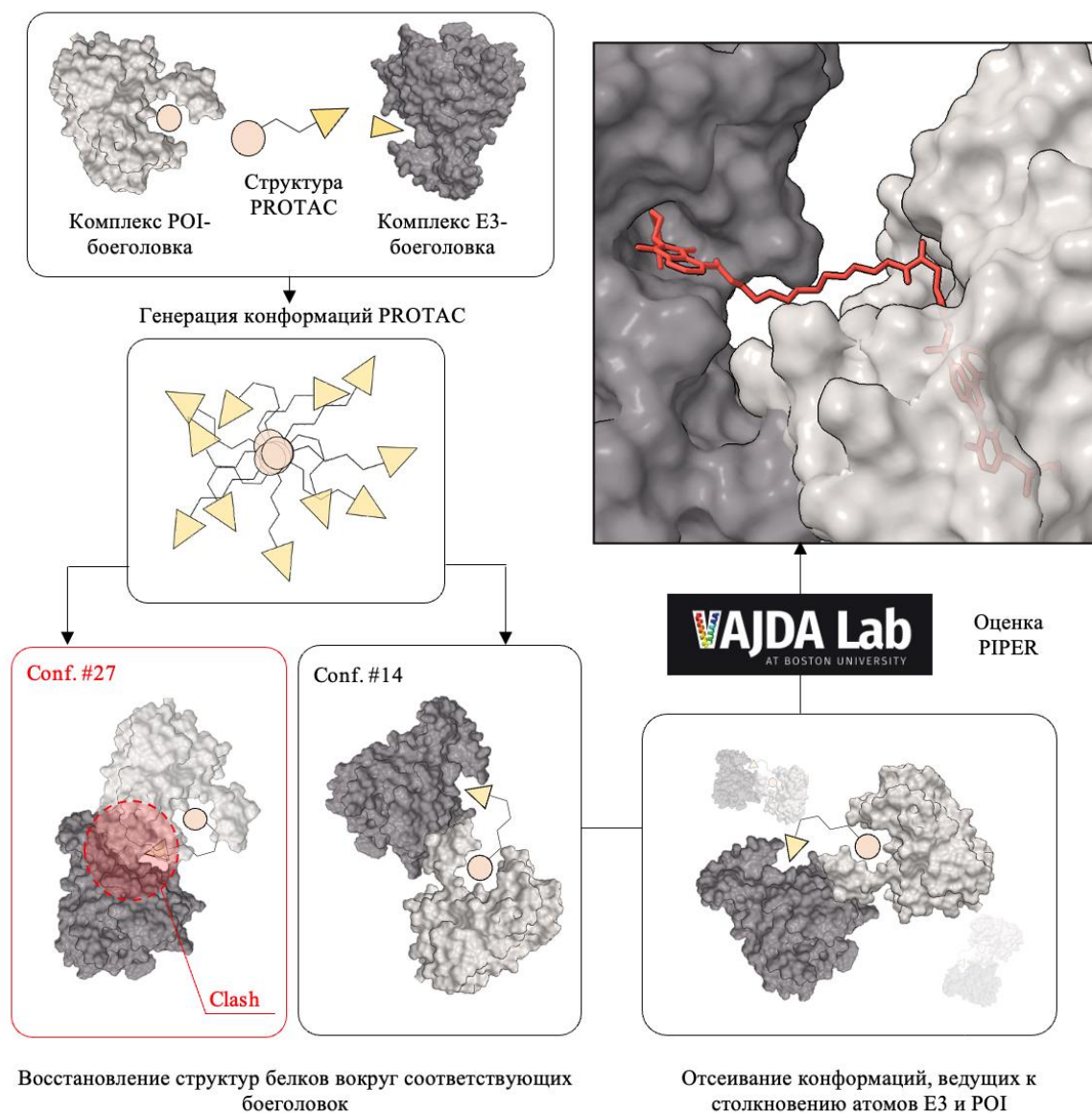
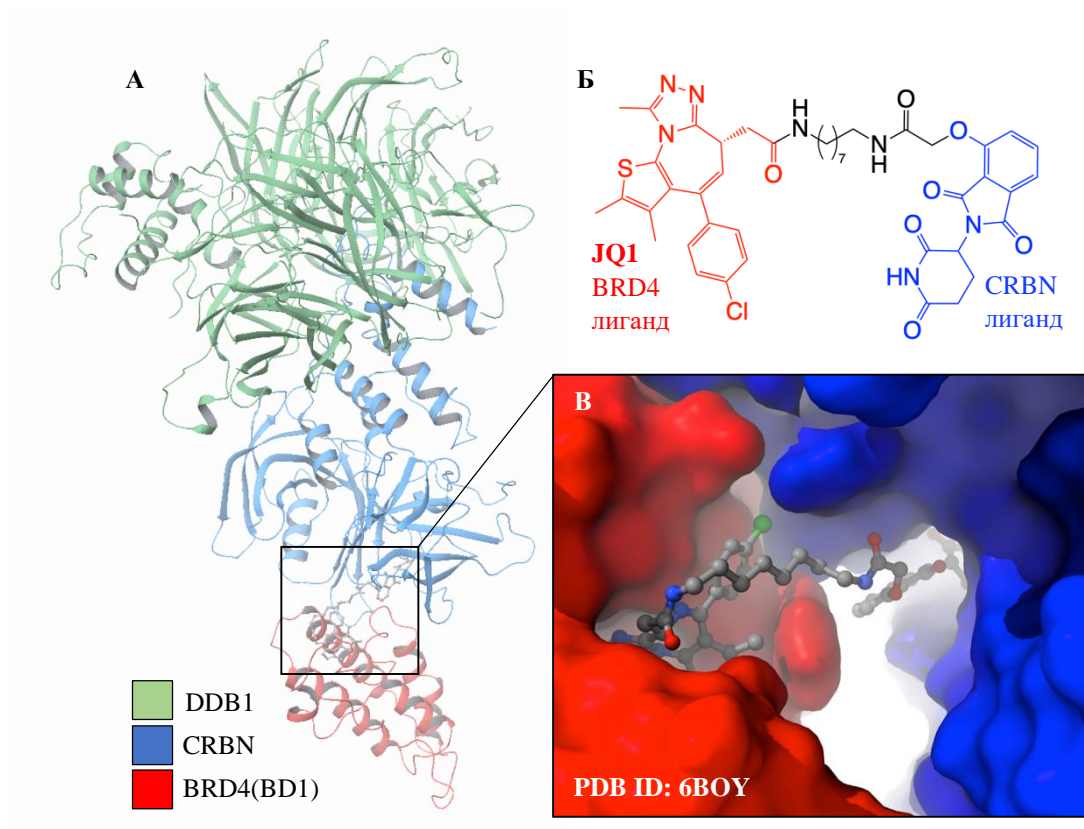


Рисунок 7 – Рабочий процесс алгоритма Schrodinger, позволяющего генерировать возможные структуры тройных комплексов POI-PROTAC-E3

2.2 Валидация алгоритма

Первоначально нам было интересно самостоятельно провести валидацию работы алгоритма, протестировав различные варианты методов генерации конформеров и настроек столкновений. В качестве модельной нами была выбрана структура деградера BRD4-CRBN dBET6 Num (PDB ID: 6BOY, разрешение 3.33 Å), включающая ингибитор BRD4 JQ1 [10.1038/nature09504]

и гидрокси-талидомид в качестве боеголовки к мишени интереса и E3-лигазе CRBN, соответственно, которые показаны на рисунке 8.



А – Структура комплекса DDB1-CRBN-BRD4(BD1) (PDB ID: 6BOY); Б – структура BRD4-CRBN PROTAC **dBET6 Num**; В – Режим связывания BRD4-CRBN PROTAC **dBET6 Num**;

Рисунок 8 – Комплекса BRD4-CRBN-DDB1, структура деградера **dBET6 Num** и режим его связывания в полости, образованной BD1 BRD4 и CRBN

Комплекс BRD4-CRBN-DDB1 (PDB ID: 6BOY), содержащий **dBET6 Num**, был загружен и подготовлен с помощью модуля Protein Preparation Wizard [10.1007/s10822-013-9644-8], интегрированного в программный пакет Schrodinger Maestro: добавлены атомы водорода и отсутствующие боковые цепи, уточнены порядки связей и состояния протонирования [10.1007/s10822-007-9133-z]; атомы Zn из структуры CRBN, а также цепь, включающая DDB1 были удалены.

Структура PROTAC была извлечена из структуры 6BOY и сохранена в формате .sdf; отдельные комплексы CRBN-гидрокси-талидомид и BRD4-JQ1

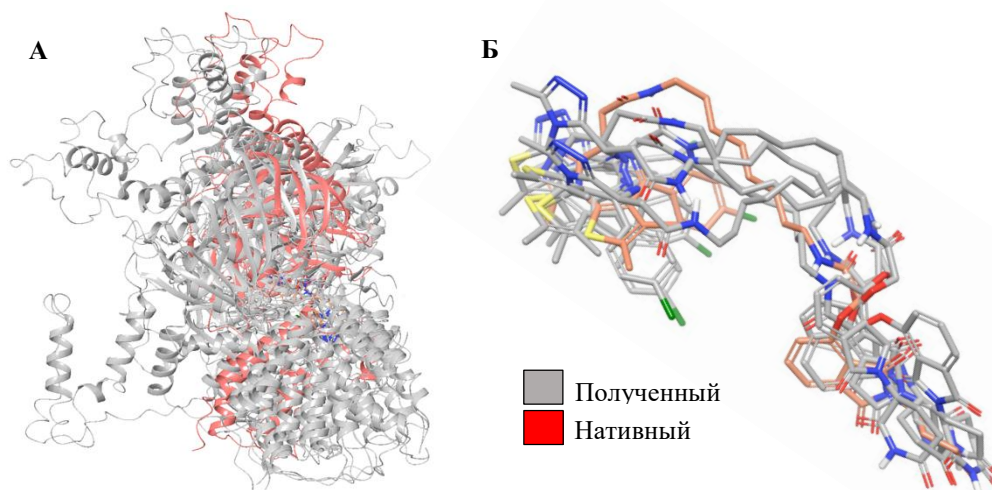
получались путем удаления лишних цепей, обрезки линкера и модификации выходных векторов с помощью модуля 3D Builder, и также импортировались в виде .sdf файлов без предварительной оптимизации.

Всего нами было совершено 30 запусков алгоритма, в ходе которых реализовывались такие методы генерации конформаций, как MCMM, LMCS, Macromodel mixed (MCMM/LMCS), ConfGen и RDKit. В качестве учитываемых при идентификации столкновений выбирались либо все атомы накладываемых структур, либо только C α атомы основных цепей. 0.7 (мягкое ограничение), 1.0 или 1.4 (жесткое ограничение) Å были установлены в качестве пороговых значений межатомных расстояний.

Первоначально мы стремились ранжировать результаты согласно выходным данным скоринга PIPER, но в ходе работы алгоритма модуль белок-белковой стыковки не выполняет исчерпывающий поиск вращений по сетке, соответственно, единственным средством оценки является PIPER Pose Energy. К нашему сожалению, комплексы, находящиеся в верхних строчках рейтинга при таком типе сортировки, не всегда напоминают кристаллический. В таблице 4 и на рисунке 9 представлены результаты наложения структур с рассчитанным RMSD с помощью алгоритма Superposition.

Таблица 4 – Результаты выравнивания топ-пять (PIPER Pose Energy) комплексов и бВОУ (MCMM, 0.7 Å, C α)

Номер комплекса (Ранжирование по PIPER Pose Energy)	PIPER Pose Energy, ккал/моль	RMSD лигандов, Å
Нативный	-	-
1	-283.044	2.150
2	-230.810	3.640
3	-224.293	4.509
4	-220.846	4.261
5	-216.668	2.943



А – Наложение топ-5 комплексов (PIPER Pose Energy), найденных алгоритмом и нативного бВОУ; Б – наложение лигандов топ-5 комплексов (PIPER Pose Energy), найденных алгоритмом и нативного dBET6 Num.

Рисунок 9 - Наложение топ-5 комплексов и содержащихся в них лигандах (PIPER Pose Energy), найденных алгоритмом и нативного бВОУ dBET6 Num (МСММ, 0.7 Å, Cα).

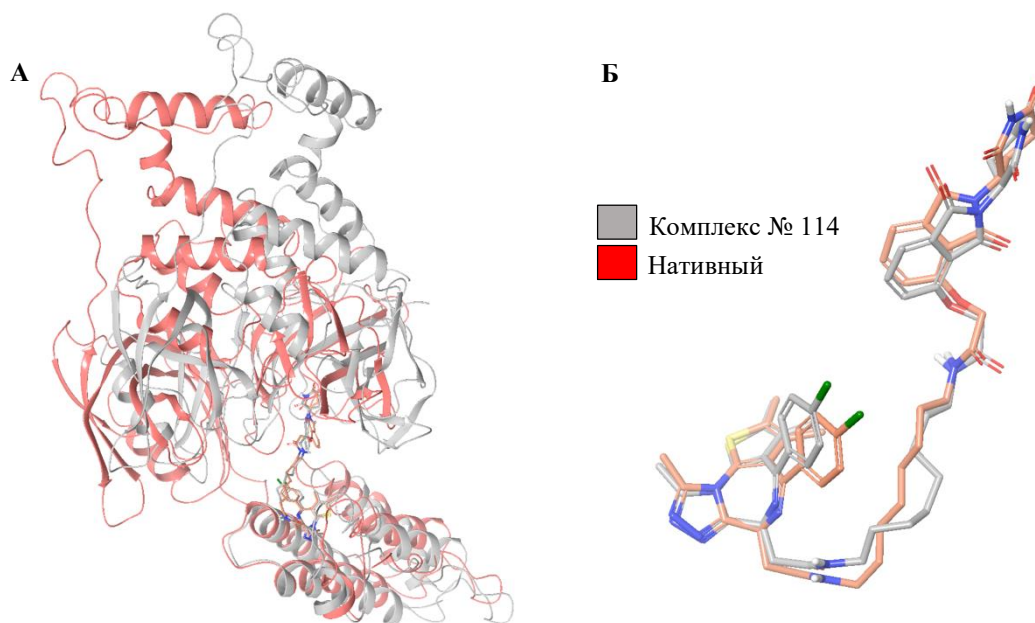
Однако, некоторым лигандам все же удается воспроизвести геометрию линкера и деградера в целом, приближающуюся к нативной, однако комплекс, обладающий RMSD по PROTAC меньше 2.0 Å, характеризуется далеко не самым лучшим PIPER Pose Energy. Данные указаны в таблице 5.

Таблица 5 – Комплексы, обладающие RMSD по лиганду менее 2.0 Å (МСММ, 0.7 Å, Cα)

Номер комплекса (Ранжирование по PIPER Pose Energy)	PIPER Pose Energy, ккал/моль	RMSD лигандов, Å
32	-87.698	1.734
92	-24.839	1.860
99	-22.277	1.659
114	-16.321	1.288
173	4.107	1.877

На рисунке 10 представлено наложение комплекса, ранжируемого на 114 строчке и обладающего наилучшем RMSD. Обратите внимание на практически полное совпадение конформаций лигандов на рисунке 10.

Очевидно, что энергия, рассчитанная алгоритмом PIPER, не является истинной величиной, по которой стоило бы проводить идентификацию активных деградеров. Возможными путем для обхода данного ограничения мог бы стать полноценный расчет белок-белковой стыковки для каждого комплекса, полученного Protein Degradер Sampler, с жесткими ограничениями на вклады притяжения и отталкивания [PIPER: An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials], в результате чего мы могли бы оперировать размером кластера как еще одним значением для ранжирования. Однако данный подход является чрезвычайно операционно, вычислительно и ресурсозатратным.



А – Наложение 114 комплекса (PIPER Pose Energy), найденного алгоритмом и нативного бВОУ; Б – наложение лиганда 114 комплекса (PIPER Pose Energy), найденного алгоритмом и нативного dBET6 Num.

Рисунок 10 – Наложение 114 комплекса и (PIPER Pose Energy), найденного алгоритмом и нативного бВОУ dBET6 Num (МСММ, 0.7 Å, C α).

Очевидно, что энергия, рассчитанная алгоритмом PIPER, не является истинной величиной, по которой стоило бы проводить идентификацию активных деградеров. Возможными путем для обхода данного ограничения мог бы стать полноценный расчет белок-белковой стыковки для каждого комплекса, полученного Protein Degradar Sampler, с жесткими ограничениями на вклады притяжения и отталкивания [PIPER: An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials], в результате чего мы могли бы оперировать размером кластера как еще одним значением для ранжирования. Однако данный подход является чрезвычайно операционно, вычислительно и ресурсозатратным.

Мы решили обратить свое внимание на долю обогащения результатов работы алгоритма комплексами, обладающими различным RMSD в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты запуска алгоритма в различных режимах

Метод	Столкновения		Количество поз	RMSD, Å		
	Дистанция	Типы атомов		<1.5	<2.0	>2.0<3.0
MCMM	0.7	C α	231	1	5	23
MCMM	0.7	все	33	0	0	2
MCMM	1.0	C α	178	1	5	18
MCMM	1.0	все	17	0	0	0
MCMM	1.4	C α	111	1	4	8
MCMM	1.4	все	0	0	0	0
LMCS	0.7	C α	125	0	4	10
LMCS	0.7	все	12	0	0	0
LMCS	1.0	C α	93	0	4	9
LMCS	1.0	все	5	0	0	0
LMCS	1.4	C α	51	0	3	3
LMCS	1.4	все	0	0	0	0

Алгоритм не обнаружил ни одной позы для режимов Macromodel Mixed, ConfGen и RDKit.

Уже сейчас можно отметить, что в любом случае алгоритм позволяет получить некоторый пул комплексов, обогащённых решениями, близкими к истинным.

Более точный низко-модовый метод генерации конформаций приводит к несколько меньшему числу сгенерированных комплексов, по-видимому, снижая число ложноположительных результатов, однако демонстрирует уровни обогащения RMSD близкие к стохастическому подходу. Вместе с тем, отметим, что в случае LMCS лучшая поза имеет то же отклонение и значение PIPER Pose Energy, что и соответствующая поза для MCMM, как показано на рисунке 11.

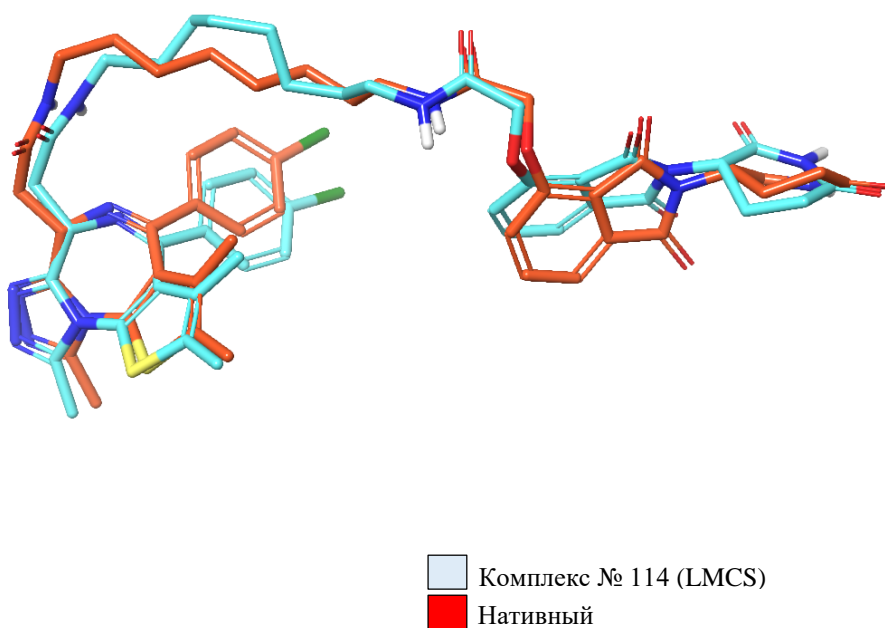


Рисунок 11 - Наложение 114 комплекса и (PIPER Pose Energy), найденного алгоритмом и нативного бВОУ dBET6 Num (LMCS, 0.7 Å, Cα)

Закономерно, гораздо большее значение имеет степень жесткости ограничений на столкновения. Метод MCMM был выбран нами как подход, позволяющий обеспечить большее число тройных комплексов с $RMSD < 3.0$ Å.

2.3 Дизайн линкеров

Далее нами была предпринята попытка оценить пригодность данного алгоритма в области рационального дизайна линкеров, для чего было необходимо подготовить начальную библиотеку деградеров с соединителями различной длины и состава.

Чтобы частично обойти т. н. проблему «связанных структур» при моделировании комплекса, нами было решено использовать комплекс 4WIV (Разрешение 1.56 Å), содержащий изооксазольный ингибитор BRD4 Num [10.1021/jm501120z].

Данный комплекс был подготовлен так, как было описано ранее и сохранен в формате .sdf для использования в расчете. При наложении структур бВОУ и 4WIV можно обратить внимание, что и JQ1 в составе dBET6, и изооксазольный лиганд демонстрируют схожую укладку в сайте BD1 BRD4, однако имеют различные векторы выхода (и конъюгации) линкера. Наложение структур показано на рисунке 12.

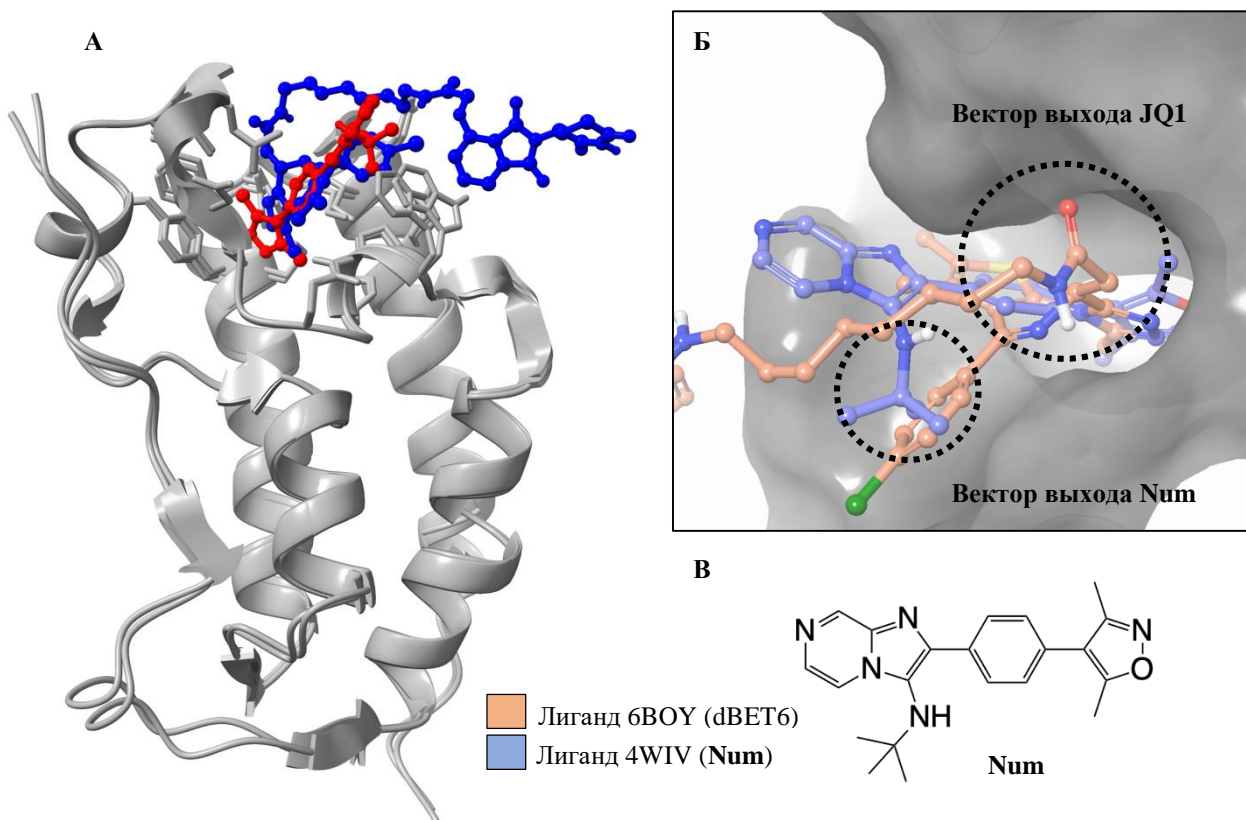


Рисунок 12 – Наложение структур лиганда BRD4 Num (4WIV) и dBET6 (6BOY) в активном сайте BRD4

3-Аминогруппа имидазопиразинового ядра лиганда 4WIV была выбрана в качестве точки крепления линкера. Нами была сконструирована и подготовлена виртуальная библиотека PROTAC BRD4-CRBN: линкеры длиной от 3 до 10 метиленовых звеньев присоединялись к рекрутеру бромодомена через аминный или амидный, а к рекрутеру CRBN через амидный или карбонатный мотивы. Соединения тестируемого набора были подготовлены с помощью модуля LigPrep, хиральность определялась так, как было указано в двухмерной структуре; дополнительно алгоритм QikProp [Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings] использовался для расчета значений LogP. Структуры представлены на рисунке 13.

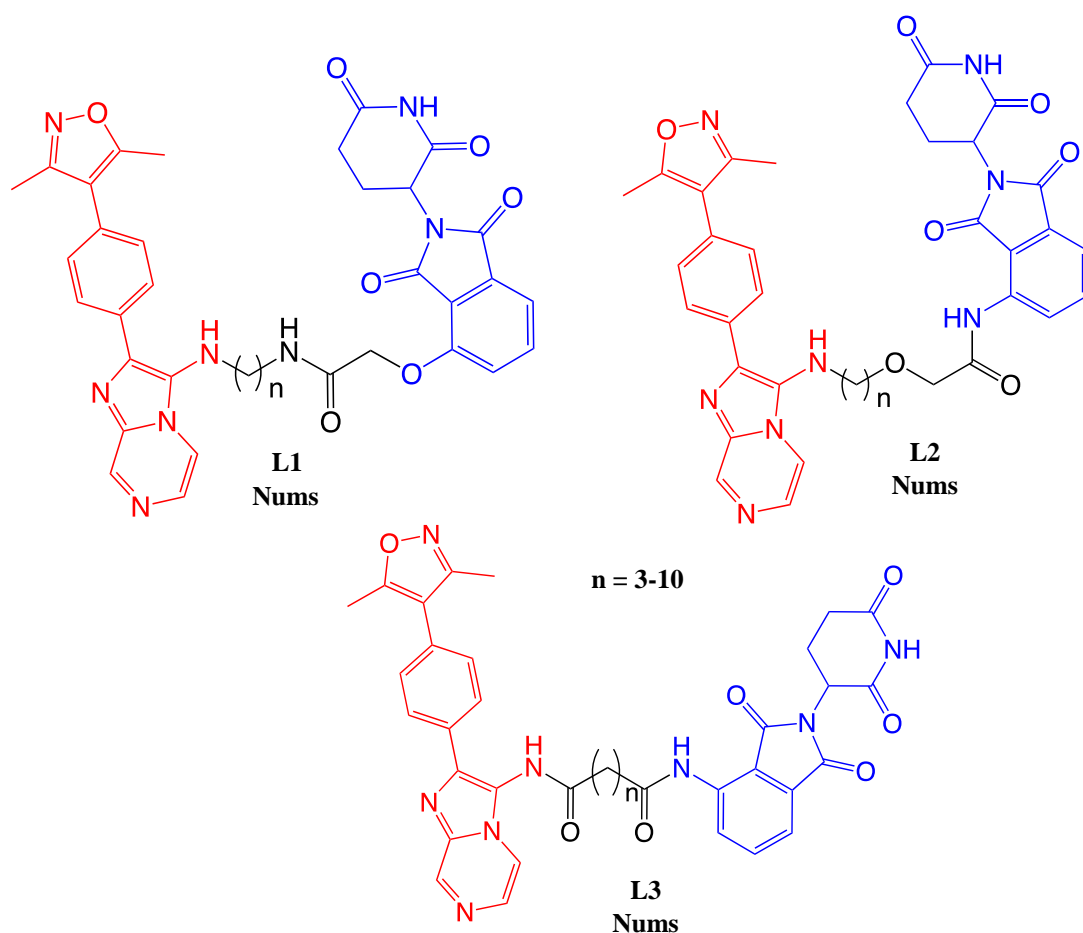
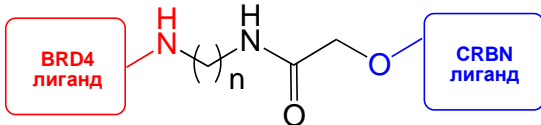
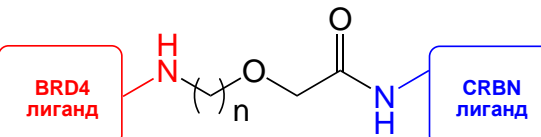
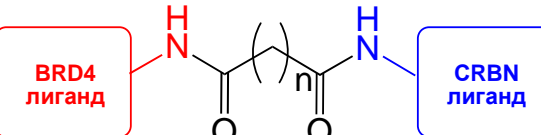


Рисунок 13 – Структуры соединений виртуальной библиотеки

Для каждого из трех сетов соединений были совершены запуски алгоритма в режиме конформационного поиска методом Монте-Карло, а также с учетом жестких – 1.4 Å или мягких – 0.7 Å ограничениях на соударения C α атомов.

Мы предположили, что число комплексов, генерируемых алгоритмом при различных (жестких – 1.4 Å или мягких – 0.7 Å) ограничениях.

Таблица 7 – Результаты генерации алгоритма для виртуальной библиотеки тестируемых соединений

Библиотека	n	Число поз		
		Мягкое ограничение 0.7 Å	Жесткое ограничение 1.4 Å	CLogP
	10	76	9	4.950
	9	175	24	4.609
	8	98	7	4.817
	7	74	7	4.382
	6	48	3	4.014
	5	64	1	3.538
	4	46	2	3.018
	3	40	1	2.888
	10	81	8	6.438
	9	74	10	5.883
	8	65	2	5.462
	7	57	7	4.078
	6	57	4	4.462
	5	24	0	4.176
	4	14	0	4.092
	3	18	0	3.283
	10	70	4	5.967
	9	33	1	5.512
	8	43	1	4.936
	7	40	2	4.629
	6	22	4	4.365
	5	25	4	3.983
	4	21	0	3.438
	3	11	0	3.252

Зеленый – длина линкера, соответствующая dВЕТ6;

CLogP – значение логарифма распределения *n*-октанол/вода, определенное с помощью модуля QikProp.

Обращаясь к результатам генерации комплексов для набора L1 МСММ, 0.7 Å, Ca, хотелось бы обратить внимание на линкер с восемью метиленовыми звеньями, длина которого примерно соответствует длине нативного линкера

для dBET6. Наложение структур C8 PROTAC и лиганда 6BOY показывает, что алгоритму удается получить как минимум один комплекс, геометрия деградера в котором соответствует dBET6. Наложение структур показано на рисунке 14.

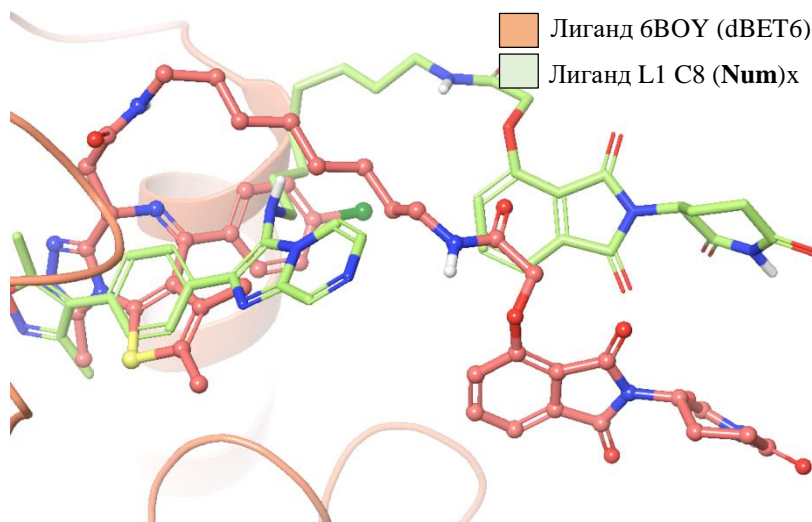


Рисунок 14 – Наложение структур соединения Num (L1, C8) и dBET6 (МСММ, 0.7 Å, C α)

Практически также хорошо себя показывают деградеры, имеющие 7, 9 и 10 метиленовых звеньев в линкере. 10С соединитель обеспечивает практически полное совпадение положений рекрутера CRBN в комплексе, как показано на рисунке 15. Однако стоит отметить, что взаимная ориентация CRBN и BRD4 все также остается далеко от кристаллической независимо от длины линкера или параметров запуска алгоритма.

Возможная причина этого кроется в различных векторах выхода линкера из рекрутера BRD4, как было показано выше, 3-аминогруппа изооксазольного лиганда ориентирует соединитель практически ортогонально относительно ориентации, обеспечиваемой нативным JQ1.

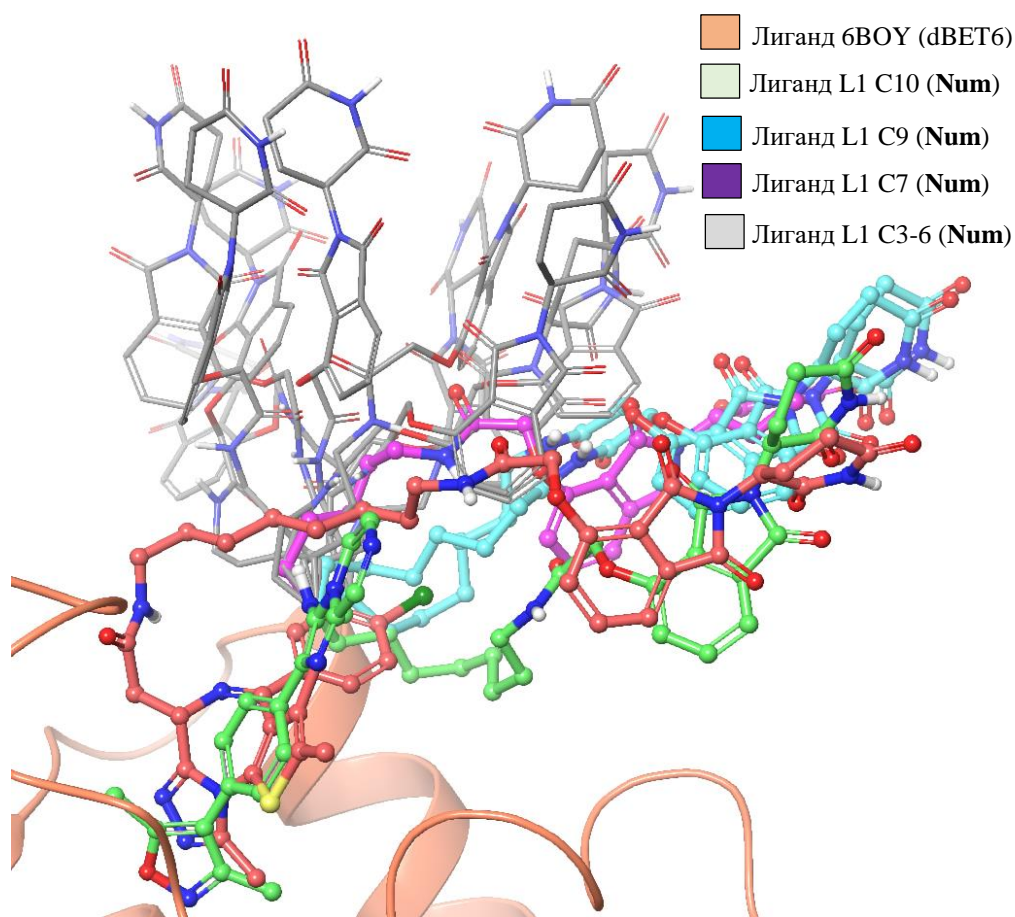


Рисунок 15 – Наложение структур соединений Num (L1, C7), Num (L1, C9), Num (L1, C10), Num-Num (L1, C3-C6) и dBET6 (МСММ, 0.7 Å, C α)

Можно также обратить внимание, что наибольшее сходство в режимах ориентации деградеров наблюдается в случаях, характеризующихся наибольшими значениями полученных комплексах при жестких и мягких ограничениях на столкновения. Безусловно, данные величины не предоставляют возможности для рационального ранжирования структур PROTAC и описания энергетики процесса образования тройного комплекса, но судя по всему, могут быть достаточно релевантным мерилем принципиальной возможности его образования: для явно коротких линкеров C3-C6 было получено кратно меньше тройных структур (L1) или вообще не получено (L2, L3 – жесткие ограничения).

2.4 Индуцированная стыковка как способ повышения точности работы алгоритма

Мы предположили, что модификация точек крепления линкера закономерно должна изменять конформацию близлежащих цепей активных сайтов партнеров по связыванию. Следовательно, запуск алгоритма с учетом индуцированных лигандом структур потенциально может привести к дополнительному обогащению решениями, близкими к истинным.

Нами была проведена индуцированная стыковка модифицированных добавлением фрагментов линкера рекрутеров BRD4 в соответствующий активный сайт с помощью модуля Inducted Fit Docking. Обобщенно рабочий процесс IFD представлен следующими шагами. Сначала боковые цепи аминокислот на расстоянии до 5 Å от центра сайта удаляются (*англ.* Trimming), после чего выполняется первичный докинг лиганда с использованием смягченных параметров масштабирования Ван-дер-Ваальсовых радиусов; алгоритм предсказания геометрии боковых цепей Prime [S0022-2836(02)00470-9] регенерирует и уточняет структуру рецептора с учетом пристыкованного лиганда, после чего позы сортируются согласно энергиям Prime и отбираются лучшие, для которых выполняется повторный докинг с расчетом значения IFD Score (сумма скоринга повторно докинга и 5% энергии Prime, определенной на этапе уточнения) [Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects].

Добавление бутильной группы к 3-амину лиганда 4WIV было призвано имитировать конъюгацию с линкерами серии L1 и L2 (рисунок 16).

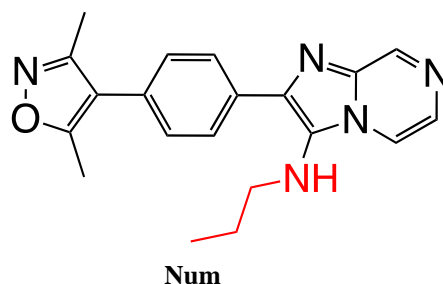


Рисунок 16 – Модифицированный аналог Num изооксазольного лиганда Num

В ходе выполнения IF-стыковки алгоритмом было сгенерировано 18 поз, среди которых были отобраны первая (IF1) и третья (IF3) (при ранжировании по IFD Score); вторая поза характеризовалась инверсией ориентации лиганда и потерей ключевых взаимодействий в сайте BRD4, потому была отброшена. Режимы связывания выбранных структур представлены на рисунке 17.

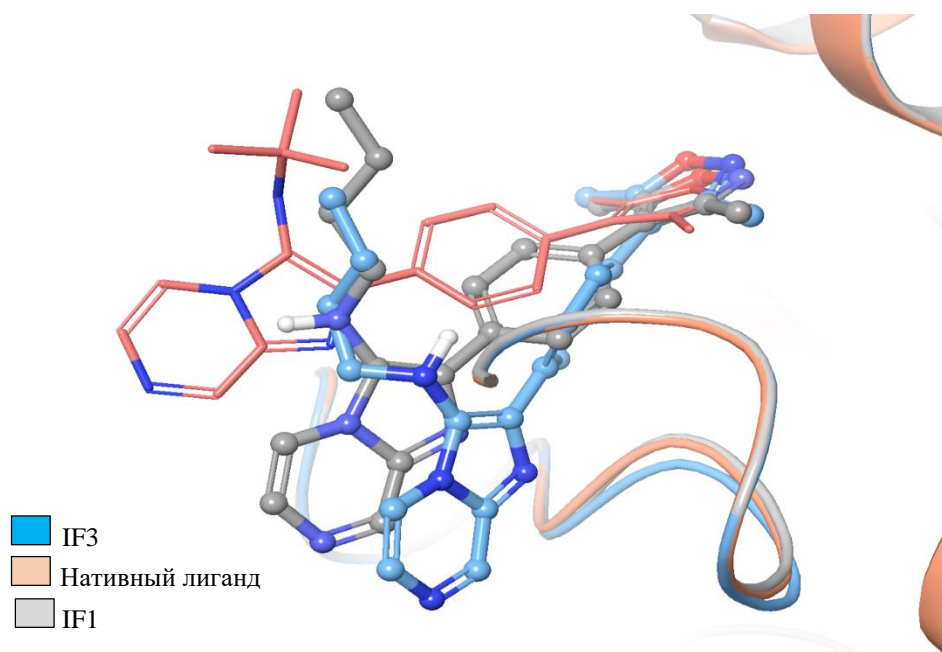
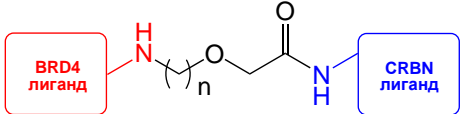


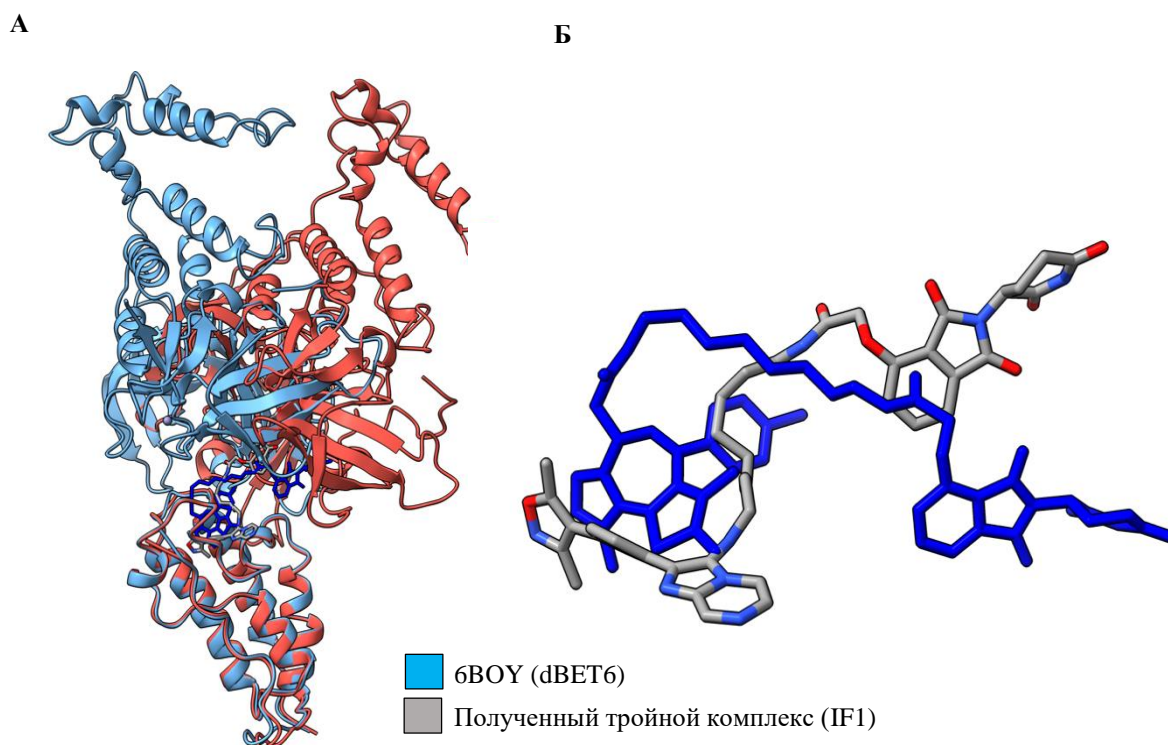
Рисунок 17 – Наложение первой (IF1) и третьей (IF3) поз, полученных в ходе IFD и нативного лиганда в связывающих конформациях

Результаты повторного запуска алгоритма Protein Degradер Sampler для серии L2 с использованием индуцированных структур BRD4 представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты генерации алгоритма для виртуальной библиотеки тестируемых соединений

Библиотека	n	Число поз					
		Мягкое ограничение 0.7 Å			Жесткое ограничение 1.4 Å		
		IF1	IF3	Нативный	IF1	IF3	Нативный
	10	104	80	81	14	0	8
	9	86	74	74	8	2	10
	8	60	25	65	13	0	2
	7	48	33	57	3	1	7
	6	48	35	57	2	0	4
	5	37	13	24	0	2	0
	4	23	49	14	0	4	0
	3	7	0	18	0	0	0

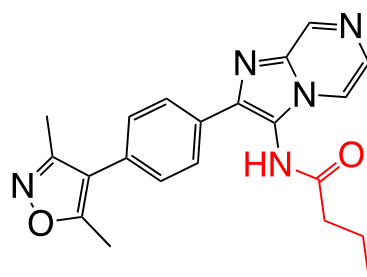
Как можно увидеть на рисунке 18, в некоторых случаях использование индуцированной структуры приводит к увеличению числа найденных комплексов (особенно для C9 и C10 линкеров), однако визуальный осмотр полученных комплексов показывает, что рекрутер CRBN меняет мотив связывания, приводя к инверсии ориентации всей структуры лигазы; стоит отметить, что реалистичность (в контексте дистанции между нативным и полученным положениями боеголовок, а также конформации линкера) несмотря ни на что сохраняется.



А – Наложение структур кристаллического комплекса CRBN-BRD4 (6BOY) и комплекса, полученного алгоритмом на основе индуцированного лигандом BRD4; Б – наложение структур лигандов из упомянутых выше комплексов.

Рисунок 18 – Наложение структур комплексов 6BOY и полученного в результате работы алгоритма на основе индуцированного BRD4, а также содержащихся в них лигандах (IF1, МСММ, 0.7 Å, C α)

Гораздо более интересные результаты показала индуцированная стыковка изооксального лиганда 4WIV, модифицированная добавлением амидной группировки в точку конъюгации линкера, как показано на рисунке 19.



Num

Рисунок 19 – Модифицированный аналог Num изооксазольного лиганда Num

Среди 16 полученных в ходе индуцированной стыковки поз для соединения Num, одна из высокоранжируемых структур на рисунке 20 показывает альтернативный вектор выхода.

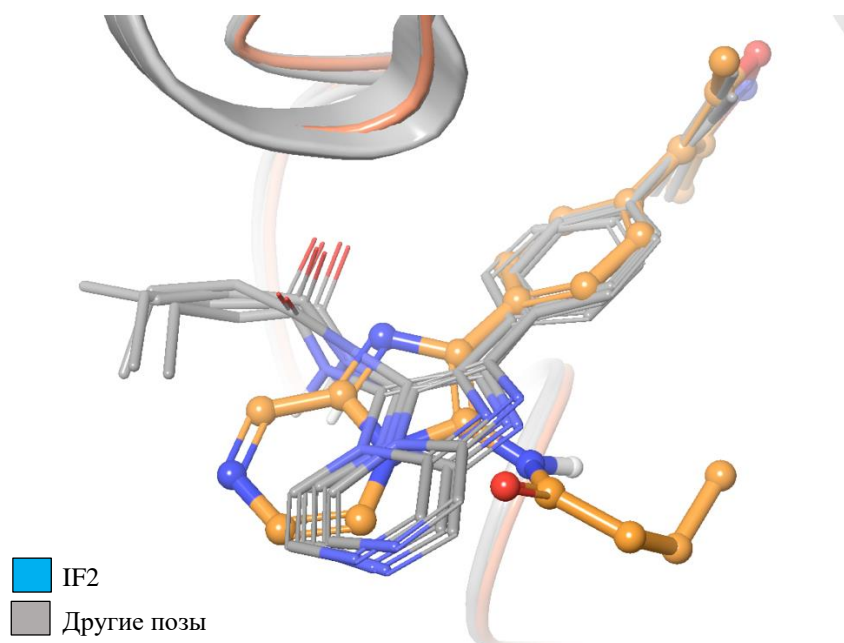
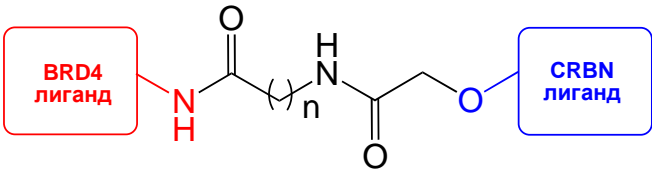


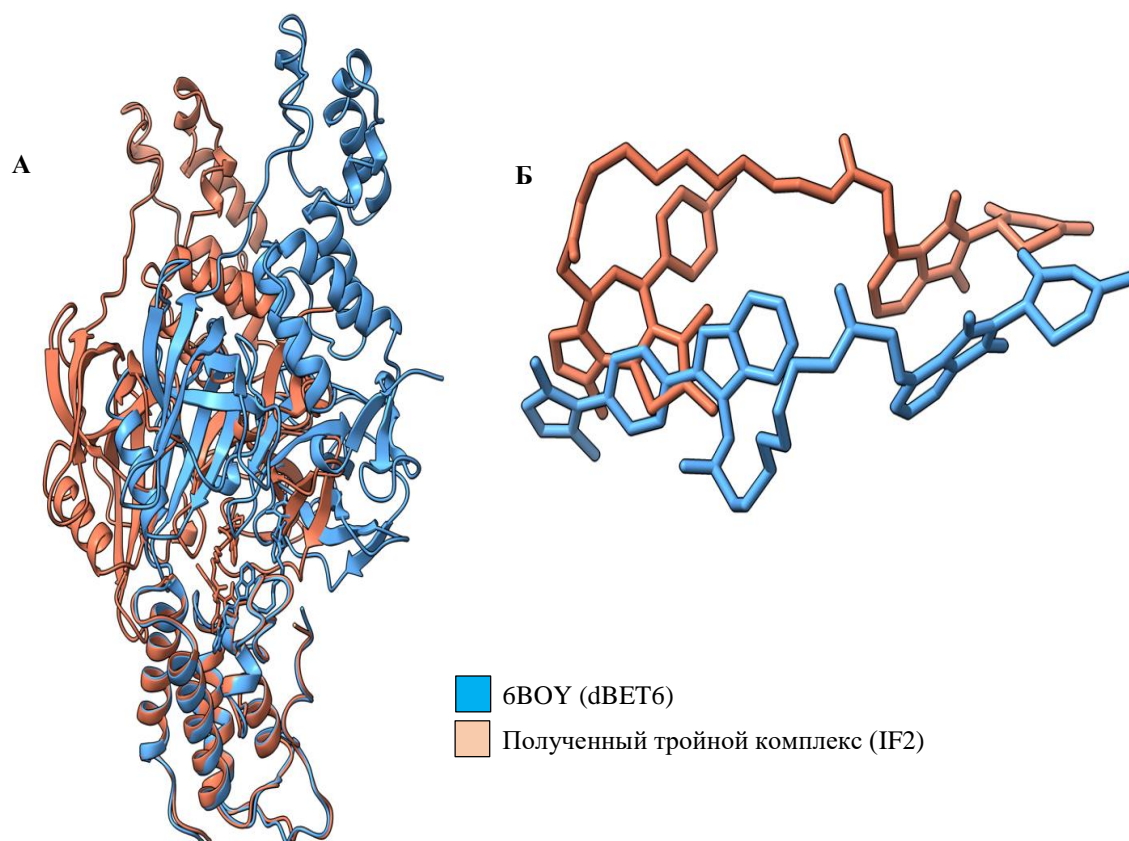
Рисунок 20 – Наложение первых пяти (ранжирование по IFD Score) поз, полученных в ходе IF-стыковки

Дополнительный набор L4, содержащий амидный мотив конъюгации с рекрутером BRD4 и карбаматный с рекрутером цереблona был подготовлен так, как описывалось ранее и подвергнут сэмплированию алгоритмом. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты генерации алгоритма для виртуальной библиотеки тестируемых соединений

Библиотека	n	Число поз			
		Мягкое ограничение 0.7 Å		Жесткое ограничение 1.4 Å	
		IF2	IF1 и IF3	IF2	IF1 и IF3
	10	11	241	0	100
	9	25	218	0	101
	8	11	140	0	47
	7	1	129	0	33
	6	1	156	0	66
	5	0	141	0	52
	4	0	62	0	3
	3	0	93	0	0

Безусловно, уровень обогащения результатов найденными тройными комплексами упал, однако в данном случае удалось добиться довольно высокой степени гомологии конформаций деградера с нативным dVET6, при том, что инверсии режима связывания IMiD и ориентации CRBN удалось избежать. Данные показаны на рисунке 21.



А – Наложение структур кристаллического комплекса CRBN-BRD4 (6BOY) и комплекса, полученного алгоритмом на основе индуцированного лигандом BRD4; Б – наложение структур лигандов из упомянутых выше комплексов.

Рисунок 21 – Наложение структур комплексов 6BOY и полученного в результате работы алгоритма на основе индуцированного BRD4, а также содержащихся в них лигандах (IF2, MCMM, 0.7 Å, C α)

3 Экспериментальная часть

3.1 Компьютерное моделирование

Все расчеты в рамках выполненной выпускной квалификационной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2023-1 на рабочей станции Mac Pro 2013, снабженной процессором Intel Xenon E5 (6 ядер, тактовая частота 3.5 ГГц) под управлением ОС Ubuntu 22.04.

3.1.1 Подготовка белков

Кристаллические структуры CRBN-dBET6-BRD(BD1) (PDB ID: 6BOY) и комплекс BRD4 (BD1), содержащий изооксазольный лиганд (PDB ID: 4WIV), были загружены из Protein Data Bank. Подготовка осуществлялась с помощью модуля Protein Preparation Wizard. Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, уточнены порядки связей, состояние протонирования спрогнозировано с использованием алгоритма Epik в диапазоне $\text{pH} = 7 \pm 2$. Цепь, содержащая DDB1 в 6BOY, молекулы воды и гетероатомы кроме лигандов удалены из структур. Комплексы импортированы в формате .maegz.

3.1.2 Подготовка лигандов

Структуры всех исследуемых соединений были созданы с помощью панели сборки Maestro и подготовлены алгоритмом LigPrep: хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования предсказано с использованием Epik в диапазоне $\text{pH} = 7 \pm 2$. Структуры импортированы в формате .maegz.

3.1.3 Индуцированный докинг

Модуль Inducted Fit Docking использовался для проведения индуцированной стыковки. Область стыковки определялась как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с центром масс лиганда в сайте. Выбран режим автоматического удаления остатков для первичной стыковки Glide, параметры смягчения потенциалов, а также уточнения и оптимизации Prime установлены

по умолчанию. Повторный докинг в режиме точности Glide XP выполнялся для всех поз, находящихся в диапазоне ± 30 ккал/моль относительно лучшей по результатам первичной стыковки.

3.1.4 Protein Degradation Sampler

Запуск рабочего процесса осуществлялся с помощью платформы автоматизации, включающей оболочку командной строки Schrodinger PowerShell. Входные комплексы боеголовок и структуры PROTAC представляли собой файлы с расширением .maegz. Выбирался один из режимов конформационного поиска: MCMM, LMCS, Mixed, ConfGen или RDKit. Устанавливались дистанционные ограничения (0.7, 1.0 или 1.4 Å) на позиционирование всех или только Ca атомов структур; каждый раз генерировалось до 1000 поз. Команда для запуска имела следующее содержание:

```
run -FROM psp protein_degrader_sampler.py POI-warhead 1.maegz  
"res.num warhead 1" E3-warhead.maegz "res.num warhead 2" PROTAC.maegz -  
sampling_protocol (MCMM, LMCS, Mixed, ConfGen, RDKit) -poses 1000 -piper  
1000 -clash_fraction 0.7 (1.0 or 1.4) -clash_atoms (backbone_all or all) -  
sampling_steps 10000 -jobname -HOST
```

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

– проведено тестирование Protein Degradar Sampler -- оригинального алгоритма Schrodinger, разработанного для получения возможных тройных комплексов POI-PROTAC-E3. Исследована способность генерировать структуры, близкие к референтной (dBET6, PDB ID:6BOY) при всех доступных параметрах конформационного поиска (Монте-Карло, низкомодовый поиск, фрагментное построение ConfGen и геометрия расстояний RDKit), а также различных ограничениях на столкновения; стохастический поиск методом Монте-Карло при дистанции соударений 0.7 Å (мягкие) и 1.4 Å (жесткие) между C α атомами основной цепи является оптимальным выбором;

– ранжирование по значениям энергий полученных комплексов (PIPER Pose Energy) не позволяет однозначно идентифицировать позы, близкие к кристаллической, однако тем не менее, алгоритм генерирует пул структур, обогащенных истинными решениями;

– в случае использования библиотеки деградеров с различными линкерами, анализ числа структур, идентифицируемых рабочим процессом при мягких и жестких ограничениях, однозначно позволяет ответить на вопрос о возможности образования тройного комплекса, а также косвенно судить об эффективной длине линкера;

– использование полученных в ходе IF-стыковки структур, индуцированных связыванием рекрутера, модифицированного добавлением фрагмента линкера в соответствующей точке крепления, позволяет увеличить точность работы алгоритма.

Список используемой литературы и используемых источников

1. Sakamoto K. M. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation / K. M. Sakamoto, K. B. Kim, A. Kumagai et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – №. 15. – P. 8554-8559.
2. Schneekloth A. R. Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics / A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae et al. // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2008. – Vol. 18. – №. 22. – P. 5904-5908.
3. Yao T. Recent advances in PROTACs for drug targeted protein research / T. Yao, H. Xiao, H. Wang et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – №. 18. – P. 10328.
4. Buckley D. L. Small-Molecule Control of Intracellular Protein Levels through Modulation of the Ubiquitin Proteasome System / D. L. Buckley, C. M. Crews // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2014. – Vol. 53. – №. 9. – P. 2312-2330.
5. Gadd M. S. Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation / M. S. Gadd, A. Testa, X. Lucas et al. // *Nature chemical biology*. – 2017. – Vol. 13. – №. 5. – P. 514-521.
6. Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome / D. Finley // *Annual review of biochemistry*. – 2009. – Vol. 78. – P. 477-513.
7. Hipp M. S. The proteostasis network and its decline in ageing / M. S. Hipp, P. Kasturi, F. U. Hartl // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2019. – Vol. 20. – №. 7. – P. 421-435.
8. Kliza K. Resolving the complexity of ubiquitin networks / K. Kliza, K. Husnjak // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2020. – Vol. 7. – P. 21.

9. Konstantinidou M. PROTACs—a game-changing technology / M. Konstantinidou, J. Li, B. Zhang et al. // *Expert opinion on drug discovery*. – 2019. – Vol. 14. – №. 12. – P. 1255-1268.
10. Cromm P. M. Targeted protein degradation: from chemical biology to drug discovery / P. M. Cromm, C. M. Crews // *Cell chemical biology*. – 2017. – Vol. 24. – №. 9. – P. 1181-1190.
11. Hu Z. Recent developments in PROTAC-mediated protein degradation: from bench to clinic / Z. Hu, C. M. Crews // *ChemBioChem*. – 2022. – Vol. 23. – №. 2. – P. e202100270.
12. Komander D. The ubiquitin code / D. Komander, M. Rape // *Annual review of biochemistry*. – 2012. – Vol. 81. – P. 203-229.
13. Chen Y. The application of ubiquitin ligases in the PROTAC drug design / Y. Chen, J. Jin // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2020. – Vol. 52. – №. 7. – P. 776-790.
14. Burslem G. M. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery / G. M. Burslem, C. M. Crews // *Cell*. – 2020. – Vol. 181. – №. 1. – P. 102-114.
15. Salami J. Waste disposal—An attractive strategy for cancer therapy / J. Salami, C. M. Crews // *Science*. – 2017. – Vol. 355. – №. 6330. – P. 1163-1167.
16. Eder J. Trends in modern drug discovery. New approaches to drug discovery / J. Eder, P. L. Herrling // – 2016. – P. 3-22.
17. Valeur E. New modalities, technologies, and partnerships in probe and lead generation: enabling a mode-of-action centric paradigm / E. Valeur, P. Jimonet // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – №. 20. – P. 9004-9029.
18. Kargbo R. B. PROTAC-mediated degradation of KRAS protein for anticancer therapeutics / R. B. Kargbo // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2019. – Vol. 11. – №. 1. – P. 5-6.
19. Hopkins A. L. The druggable genome / A. L. Hopkins, C. R. Groom // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2002. – Vol. 1. – №. 9. – P. 727-730.

20. Neklesa T. ARV-110: An oral androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer / T. Neklesa, L. B. Snyder, R. R. Willard et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 37. – №. 259.10. – P. 1200.

21. Flanagan J. J. Targeting nuclear receptors with PROTAC degraders / J. J. Flanagan, T. K. Neklesa // *Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2019. – Vol. 493. – P. 110452.

22. Sakamoto K. M. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation / K. M. Sakamoto, K. B. Kim, R. Verma et al. // *Molecular & Cellular Proteomics.* – 2003. – Vol. 2. – №. 12. – P. 1350-1358.

23. Schneekloth Jr J. S. Chemical genetic control of protein levels: selective in vivo targeted degradation / J. S. Schneekloth Jr, F. N. Fonseca, M. Koldobskiy et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2004. – Vol. 126. – №. 12. – P. 3748-3754.

24. Schneekloth Jr J. S. Chemical genetic control of protein levels: selective in vivo targeted degradation / J. S. Schneekloth Jr, F. N. Fonseca, M. Koldobskiy et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2004. – Vol. 126. – №. 12. – P. 3748-3754.

25. Itoh Y. Protein knockdown using methyl bestatin– ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid-binding proteins / Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2010. – Vol. 132. – №. 16. – P. 5820-5826.

26. Lu J. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 / J. Lu, Y. Qian, M. Altieri et al. // *Chemistry & biology.* – 2015. – Vol. 22. – №. 6. – P. 755-763.

27. Zhang X. DCAF11 supports targeted protein degradation by electrophilic proteolysis-targeting chimeras / X. Zhang, L. M. Luukkonen, C. L. Eissler et al. // *Journal of the American Chemical Society.* – 2021. – Vol. 143. – №. 13. – P. 5141-5149.

28. Li L. In vivo target protein degradation induced by PROTACs based on E3 ligase DCAF15 / L. Li, D. Mi, H. Pei et al. // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2020. – Vol. 5. – №. 1. – P. 129.
29. Zhang X. Electrophilic PROTACs that degrade nuclear proteins by engaging DCAF16 / X. Zhang, V. M. Crowley, T. G. Wucherpfennig et al. // *Nature chemical biology*. – 2019. – Vol. 15. – №. 7. – P. 737-746.
30. Lu M. Discovery of a Keap1-dependent peptide PROTAC to knockdown Tau by ubiquitination-proteasome degradation pathway / M. Lu, T. Liu, Q. Jiao et al. // *European journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 146. – P. 251-259.
31. Yang Y. The E3 ubiquitin ligase RNF114 and TAB1 degradation are required for maternal-to-zygotic transition / Y. Yang, C. Zhou, Y. Wang et al. // *EMBO reports*. – 2017. – Vol. 18. – №. 2. – P. 205-216.
32. Ishida T. E3 ligase ligands for PROTACs: how they were found and how to discover new ones / T. Ishida, A. Ciulli // *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*. – 2021. – Vol. 26. – №. 4. – P. 484-502.
33. Nguyen T. V. USP15 antagonizes CRL4CRBN-mediated ubiquitylation of glutamine synthetase and neosubstrates / T. V. Nguyen // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – №. 40. – P. e2111391118.
34. Lopez-Girona A. E. A. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide / A. E. A. Lopez-Girona, D. Mendy, T. Ito et al. // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26. – №. 11. – P. 2326-2335.
35. Krönke J. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells / J. Krönke, N. D. Udeshi, A. Narla et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – №. 6168. – P. 301-305.
36. Fischer E. S. Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide / E. S. Fischer, K. Böhm, J. R. Lydeard et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 512. – №. 7512. – P. 49-53.
37. Chamberlain P. P. Structure of the human Cereblon–DDB1–lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs / P. P.

Chamberlain, A. Lopez-Girona, K. Miller et al. // Nature structural & molecular biology. – 2014. – Vol. 21. – №. 9. – P. 803-809.

38. Lu G. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins / G. Lu, R. E. Middleton, H. Sun et al. // Science. – 2014. – Vol. 343. – №. 6168. – P. 305-309.

39. Lee J. Discovery of E3 ligase ligands for target protein degradation / J. Lee, Y. Lee, Y. M. Jung et al. // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – №. 19. – P. 6515.

40. Buckley D. L. Small Molecule Inhibitors of the Interaction Between the E3 Ligase VHL and HIF1 α / D. L. Buckley, J. L. Gustafson, I. Van Molle et al. // Angewandte Chemie (International Ed. in English). – 2012. – Vol. 51. – №. 46. – P. 11463.

41. Zhao Q. Discovery of SIAIS178 as an effective BCR-ABL degrader by recruiting von Hippel–Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase / Q. Zhao, C. Ren, L. Liu et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 62. – №. 20. – P. 9281-9298.

42. Kang C. H. Induced protein degradation of anaplastic lymphoma kinase (ALK) by proteolysis targeting chimera (PROTAC) / C. H. Kang, D. H. Lee, C. O. Lee et al. // Biochemical and biophysical research communications. – 2018. – Vol. 505. – №. 2. – P. 542-547.

43. Cromm P. M. Addressing kinase-independent functions of Fak via PROTAC-mediated degradation / P. M. Cromm, K. T. Samarasinghe, J. Hines et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – Vol. 140. – №. 49. – P. 17019-17026.

44. Petrylak D. P. First-in-human phase I study of ARV-110, an androgen receptor (AR) PROTAC degrader in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following enzalutamide (ENZ) and/or abiraterone (ABI). – 2020 – Vol. 38. – №. 15. – P. 3500.

45. Xie H. The clinical advances of proteolysis targeting chimeras in oncology / H. Xie, J. Liu, D. M. A. Glison et al. // Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy. – 2021. – Vol. 2. – №. 6. – P. 511.

46. He Y. DT2216—a Bcl-xL-specific degrader is highly active against Bcl-xL-dependent T cell lymphomas / Y. He, R. Koch, V. Budamagunta et al. // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2020. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1-13.

47. You I. Discovery of an AKT degrader with prolonged inhibition of downstream signaling / I. You, E. C. Erickson, K. A. Donovan et al. // *Cell Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 27. – №. 1. – P. 66-73.

48. Kargbo R. B. PROTAC compounds targeting α -synuclein protein for treating neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Parkinson's diseases / R. B. Kargbo // *ACS medicinal chemistry letters*. – 2020. – Vol. 11. – №. 6. – P. 1086-1087.

49. Gasic I. Tubulin resists degradation by cereblon-recruiting PROTACs / I. Gasic, B. J. Groendyke, R. P. Nowak et al. // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – №. 5. – P. 1083.

50. Shi W. Structure-based discovery of receptor tyrosine kinase AXL degraders with excellent anti-tumor activity by selectively degrading AXL and inducing methuosis / W. Shi, Z. Feng, F. Chi et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 234. – P. 114253.

51. Wang Z. Proteolysis targeting chimeras for the selective degradation of Mcl-1/Bcl-2 derived from nonselective target binding ligands / Z. Wang, N. He, Z. Guo et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62. – №. 17. – P. 8152-8163.

52. Zhang X. Utilizing PROTAC technology to address the on-target platelet toxicity associated with inhibition of BCL-X L / X. Zhang, D. Thummuri, Y. He et al. // *Chemical Communications*. – 2019. – Vol. 55. – №. 98. – P. 14765-14768.

53. Xue G. Protein degradation through covalent inhibitor-based PROTACs / G. Xue, J. Chen, L. Liu et al. // *Chemical Communications*. – 2020. – Vol. 56. – №. 10. – P. 1521-1524.

54. Nowak R. P. Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation / R. P. Nowak, S. L. DeAngelo, D. Buckley et al. // *Nature Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 14. – №. 7. – P. 706-714.

55. Buhimschi A. D. Targeting the C481S ibrutinib-resistance mutation in Bruton's tyrosine kinase using PROTAC-mediated degradation / A. D. Buhimschi, H. A. Armstrong, M. Toure et al. // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 57. – №. 26. – P. 3564-3575.

56. Chi J. J. A novel strategy to block mitotic progression for targeted therapy / J. J. Chi, H. Li, Z. Zhou et al. // *EBioMedicine*. – 2019. – Vol. 49. – P. 40-54.

57. Zhou F. Development of selective mono or dual PROTAC degrader probe of CDK isoforms / F. Zhou, L. Chen, C. Cao et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 187. – P. 111952.

58. Zhao B. PROTACs suppression of CDK4/6, crucial kinases for cell cycle regulation in cancer / B. Zhao, K. Burgess // *Chemical Communications*. – 2019. – Vol. 55. – №. 18. – P. 2704-2707.

59. Steinebach C. Homo-PROTACs for the chemical knockdown of cereblon / C. Steinebach, S. Lindner, N. D. Udeshi et al. // *ACS Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 13. – №. 9. – P. 2771-2782.

60. Zhou L. Design and synthesis of α -naphthoflavone chimera derivatives able to eliminate cytochrome P450 (CYP)1B1-mediated drug resistance via targeted CYP1B1 degradation / L. Zhou, W. Chen, C. Cao et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 189. – P. 112028.

61. Potjewyd F. Degradation of polycomb repressive complex 2 with an EED-targeted bivalent chemical degrader / F. Potjewyd, A.-M. W. Turner, J. Beri et al. // *Cell Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 27. – №. 1. – P. 47-56.

62. Burslem G. M. The advantages of targeted protein degradation over inhibition: an RTK case study / G. M. Burslem, B. E. Smith, A. C. Lai et al. // *Chemistry & Biology*. – 2017. – Vol. 25. – №. 1. – P. 67.

63. Powell C. E. Chemically induced degradation of anaplastic lymphoma kinase (ALK) / C. E. Powell, Y. Gao, L. Tan et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – №. 9. – P. 4249-4255.

64. Smalley J. P. PROTAC-mediated degradation of class I histone deacetylase enzymes in corepressor complexes / J. P. Smalley, G. E. Adams, C. J.

Millard et al. // *Chemical Communications*. – 2020. – Vol. 56. – №. 32. – P. 4476-4479.

65. Hu M. Discovery of the first potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 / M. Hu, W. Zhou, Y. Wang et al. // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2020. – Vol. 10. – №. 10. – P. 1943-1953.

66. Li Y. Discovery of MD-224 as a first-in-class, highly potent, and efficacious proteolysis targeting chimera murine double minute 2 degrader capable of achieving complete and durable tumor regression / Y. Li, J. Yang, A. Aguilar et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62. – №. 2. – P. 448-466.

67. Silva M. C. Targeted degradation of aberrant tau in frontotemporal dementia patient-derived neuronal cell models / M. C. Silva, F. M. Ferguson, Q. Cai et al. // *eLife*. – 2019. – Vol. 8. – P. e45457.

68. Maniaci C. Homo-PROTACs: bivalent small-molecule dimerizers of the VHL E3 ubiquitin ligase to induce self-degradation / C. Maniaci, S. J. Hughes, A. Testa et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – №. 1. – P. 830.

69. Li Z. Development and characterization of a Wee1 kinase degrader / Z. Li, B. J. Pinch, C. M. Olson et al. // *Cell Chemical Biology*. – 2020. – Vol. 27. – №. 1. – P. 57-65.

70. Hu M. Discovery of potent and selective HER2 PROTAC degrader based Tucatinib with improved efficacy against HER2 positive cancers / M. Hu, Y. Li, J. Li et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 244. – P. 114775.

71. Holohan C. Cancer drug resistance: an evolving paradigm / C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D. B. Longley et al. // *Nature Reviews Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – №. 10. – P. 714-726.

72. Zou Y. The PROTAC technology in drug development: the PROTAC technology in drug development / Y. Zou, D. Ma, Y. Wang // *Cell Biochemistry and Function*. – 2019. – Vol. 37. – №. 1. – P. 21-30.

73. Martín-Acosta P. PROTACs to address the challenges facing small molecule inhibitors / P. Martín-Acosta, X. Xiao // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 210. – P. 112993.

74. Wang Y. Degradation of proteins by PROTACs and other strategies / Y. Wang, X. Jiang, F. Feng et al. // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2020. – Vol. 10. – №. 2. – P. 207-238.

75. Bond M. J. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) come of age: entering the third decade of targeted protein degradation / M. J. Bond, C. M. Crews // *RSC Chemical Biology*. – 2021. – Vol. 2. – №. 3. – P. 725-742.

76. Lazo J. S. Drugging undruggable molecular cancer targets / J. S. Lazo, E. R. Sharlow // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2016. – Vol. 56. – P. 23-40.

77. Neklesa T. K. Targeted protein degradation by PROTACs / T. K. Neklesa, J. D. Winkler, C. M. Crews // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2017. – Vol. 174. – P. 138-144.

78. Moon S. Chemically induced cellular proteolysis: an emerging therapeutic strategy for undruggable targets / S. Moon, B. H. Lee // *Molecules and Cells*. – 2018. – Vol. 41. – №. 11. – P. 933-942.

79. Nero T. L. Oncogenic protein interfaces: Small molecules, big challenges / T. L. Nero, C. J. Morton, J. K. Holien et al. // *Nature Reviews Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – №. 4. – P. 248-262.

80. Bondeson D. P. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead / D. P. Bondeson, B. E. Smith, G. M. Burslem et al. // *Cell Chemical Biology*. – 2017. – Vol. 25. – №. 1. – P. 78.

81. Troup R. I. Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review / R. I. Troup, C. Fallan, M. G. J. Baud // *Exploratory Targeted Therapies in Oncology*. – 2020. – Vol. 1. – №. 5. – P. 273-312.

82. Moore A. R. RAS-targeted therapies: Is the undruggable drugged? / A. R. Moore, S. C. Rosenberg, F. McCormick et al. // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2020. – Vol. 19. – №. 8. – P. 533-552.

83. Zeng M. Exploring targeted degradation strategy for oncogenic KRASG12C / M. Zeng, Y. Xiong, N. Safaee et al. // *Chemistry and Biology*. – 2020. – Vol. 27. – №. 1. – P. 19.

84. Tanaka N. Clinical acquired resistance to KRASG12C inhibition through a novel KRAS switch-II pocket mutation and polyclonal alterations converging on RAS-MAPK reactivation / N. Tanaka, J. J. Lin, C. Li et al. // *Cancer Discovery*. – 2021. – Vol. 11. – №. 8. – P. 1913-1922.

85. Bond M. J. Targeted degradation of oncogenic KRASG12C by VHL-recruiting PROTACs / M. J. Bond, L. Chu, D. A. Nalawansa et al. // *ACS Central Science*. – 2020. – Vol. 6. – №. 8. – P. 1367-1375.

86. Bruhn M. A. Second AKT: The rise of SGK in cancer signalling / M. A. Bruhn, R. B. Pearson, R. D. Hannan et al. // *Growth Factors*. – 2010. – Vol. 28. – №. 6. – P. 394-408.

87. Halland N. Discovery of N-[4-(1H-Pyrazolo[3,4-b]pyrazin-6-yl)-phenyl]-sulfonamides as highly active and selective SGK1 inhibitors / N. Halland, F. Schmidt, T. Weiss et al. // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2015. – Vol. 6. – №. 1. – P. 73-78.

88. Sherk A. B. Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic / A. B. Sherk, D. E. Frigo, C. G. Schnackenberg et al. // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – №. 18. – P. 7475-7483.

89. Gong G. Identification, structure modification, and characterization of potential small-molecule SGK3 inhibitors with novel scaffolds / G. Gong, K. Wang, X. Dai et al. // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2018. – Vol. 39. – P. 1902-1912.

90. Tovell H. Design and characterization of SGK3-PROTAC1, an isoform specific SGK3 kinase PROTAC degrader / H. Tovell, A. Testa, H. Zhou et al. // *ACS Chemical Biology*. – 2019. – Vol. 14. – №. 9. – P. 2024-2034.

91. Adjei A. A. What is the right dose? The elusive optimal biologic dose in phase I clinical trials / A. A. Adjei // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal*

of the American Society of Clinical Oncology. – 2006. – Vol. 24. – №. 25. – P. 4054-4055.

92. Bondeson D. P. Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs / D. P. Bondeson, A. Mares, I. E. D. Smith et al. // *Nature Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 11. – №. 8. – P. 611-617.

93. Martinez Molina D The cellular thermal shift assay: A novel biophysical assay for in situ drug target engagement and mechanistic biomarker studies / D. Martinez Molina, P. Nordlund // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2016. – Vol. 56. – P. 141-161.

94. Wu S. BRD4 PROTAC degrader ARV-825 inhibits T-cell acute lymphoblastic leukemia by targeting “Undruggable” Myc-pathway genes / S. Wu, Y. Jiang, Y. Hong et al. // *Cancer Cell International*. – 2021. – Vol. 21. – №. 1. – P. 230.

95. Gabay M. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance / M. Gabay, Y. Li, D. W. Felsher // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2014. – Vol. 4. – №. 6. – P. a014241.

96. Sun X. et al. Protacs: Great opportunities for academia and industry // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature, 2019. Vol. 4, № 1.

97. Cyrus K. et al. Impact of linker length on the activity of PROTACs // *Mol Biosyst*. 2011. Vol. 7, № 2. P. 359–364.

98. Troup R.I., Fallan C., Baud M.G.J. Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review // *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*. Open Exploration Publishing Inc, 2020. Vol. 1, № 5. P. 273–312.

99. Imrie F. et al. Deep Generative Models for 3D Linker Design // *J Chem Inf Model*. American Chemical Society, 2020. Vol. 60, № 4. P. 1983–1995.

100. Farnaby W. et al. BAF complex vulnerabilities in cancer demonstrated via structure-based PROTAC design // *Nat Chem Biol*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 15, № 7. P. 672–680.

101. Yang Y. et al. SyntaLinker: Automatic fragment linking with deep conditional transformer neural networks // Chem Sci. Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 11, № 31. P. 8312–8322.
102. Tunjic T.M., Weber N., Brunsteiner M. Computer aided drug design in the development of proteolysis targeting chimeras // Comput Struct Biotechnol J. Elsevier BV, 2023. Vol. 21. P. 2058–2067.
103. Nori D. De novo PROTAC design using graph-based deep generative models / D. Nori, C. W. Coley, R. Mercado // arXiv preprint arXiv:2211.02660. – 2022.
104. Klambauer G. et al. Graph Networks for Molecular Design Tox21 Machine Learning Data Set View project Advanced machine learning for Innovative Drug Discovery (AIDD) View project GRAPH NETWORKS FOR MOLECULAR DESIGN.
105. Lipinski C.A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings // Advanced Drug Delivery Reviews. 2001. Vol. 46. 3–26 p.
106. Edmondson S.D., Yang B., Fallan C. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs)in ‘beyond rule-of-five’ chemical space: Recent progress and future challenges // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 29, № 13. P. 1555–1564.
107. Cantrill C. et al. Fundamental aspects of DMPK optimization of targeted protein degraders // Drug Discovery Today. Elsevier Ltd, 2020. Vol. 25, № 6. P. 969–982.
108. Rossi Sebastiano M. et al. Impact of Dynamically Exposed Polarity on Permeability and Solubility of Chameleonic Drugs beyond the Rule of 5 // J Med Chem. American Chemical Society, 2018. Vol. 61, № 9. P. 4189–4202.
109. Weng G. et al. Integrative Modeling of PROTAC-Mediated Ternary Complexes // J Med Chem. 2021. Vol. 64, № 21. P. 16271–16281.

110. Zaidman D., Prilusky J., London N. ProsetTac: Rosetta based modeling of PROTAC mediated ternary complexes // *J Chem Inf Model*. American Chemical Society, 2020. Vol. 60, № 10. P. 4894–4903.
111. Garzon J.I. et al. FRODOCK: A new approach for fast rotational protein-protein docking // *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25, № 19. P. 2544–2551.
112. Liao J. et al. In Silico Modeling and Scoring of PROTAC-Mediated Ternary Complex Poses // *J Med Chem*. American Chemical Society, 2022. Vol. 65, № 8. P. 6116–6132.
113. Li F. et al. DeepPROTACs is a deep learning-based targeted degradation predictor for PROTACs // *Nat Commun*. Nature Research, 2022. Vol. 13, № 1. P. 7133.
114. Drummond M.L., Williams C.I. In Silico Modeling of PROTAC-Mediated Ternary Complexes: Validation and Application // *J Chem Inf Model*. American Chemical Society, 2019. Vol. 59, № 4. P. 1634–1644.
115. Labute P. LowModeMD - Implicit low-mode velocity filtering applied to conformational search of macrocycles and protein loops // *J Chem Inf Model*. American Chemical Society, 2010. Vol. 50, № 5. P. 792–800.
116. Nowak R.P. et al. Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation article // *Nat Chem Biol*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 14, № 7. P. 706–714.
117. Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H. J. Efficient unbound docking of rigid molecules // *Algorithms in Bioinformatics: Second International Workshop, WABI 2002 Rome, Italy, September 17–21, 2002 Proceedings 2*. – Springer Berlin Heidelberg, 2002. – P. 185-200.
118. Lyskov S., Gray J. J. The RosettaDock server for local protein–protein docking // *Nucleic acids research*. – 2008. – Vol. 36. – №. suppl_2. – P. W233-W238.
119. Shih E.S.C., Hwang M.J. A critical assessment of information-guided protein-protein docking predictions // *Molecular and Cellular Proteomics*. 2013. Vol. 12, № 3. P. 679–686.