

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 Липофильность новых лигандов цереблona

Обучающийся

Е.М. Заводчикова

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

к.х.н., профессор ЦМХ, О.Б. Григорьева

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

Тольятти 2023

Аннотация

Данная исследовательская работа изложена на 62 страницах, содержит 16 рисунков, 5 таблиц, 2 приложения. В ходе литературной проработки было изучено 77 литературных источников.

Объектами исследования в работе являются производные 1-окса-2,7-диазаспиро[4,5]дец-2-ен-6,8-диона, которые могут быть использованы в качестве новых лигандов цереплона. Так как пероральный способ приема лекарственных препаратов является наиболее предпочтительным, важной характеристикой при поиске лигандов является значение липофильности.

В литературном обзоре изложена научная новизна, практическая значимость производных фталимида, а также рассмотрено понятие липофильности и обобщены основные методы экспериментального определения липофильности,

Во второй части проведен анализ полученных результатов в ходе экспериментов, а также сравнение значений липофильности, полученных экспериментальным и расчётным методами.

Третья часть содержит описание методики определения коэффициента распределения методом ОФ ВЭЖХ, расчет факторов удерживания исследуемых соединений.

Сравнение результатов, полученных экспериментальным и теоретическим методами, можно сделать вывод, что в ряде случаев липофильность хорошо предсказывается с помощью специализированных программ, однако стоит подкреплять результаты экспериментальным методом.

Abstract

The title of the graduation work is «Lipophilicity of new cereblon ligands».

The graduation work consists of an explanatory note on 62 pages, introduction, including 16 figures, 5 tables, 2 applications, the list of 77 references, all of which are foreign sources.

The objects of research in this work are 1-oxa-2,7-diazaspiro[4,5]dec-2-en-6,8-dione derivatives, which can be used as new cereblon ligands. Since the oral method of taking medications is the most preferable, an important characteristic in the search for ligands is the value of lipophilicity.

The literature review outlines the scientific novelty, practical evaluation of phthalimide derivatives, as well as consideration of the concept of lipophilicity and generalization of the main experimental methods for determining lipophilicity.

In the second part, the analysis of the results obtained during the experiments, as well as a comparison of the lipophilicity values obtained by experimental and computational methods, is carried out.

The third part contains a description of the methodology for determining the distribution coefficient by the method of HPLC, calculation of retention factors of the studied compounds.

In conclusion for the investigated 1-oxa-2,7-diazaspiro[4,5]dec-2-en-6,8-dione derivatives, the lipophilicity values were calculated using the HPLC method. Comparing the results obtained by experimental and theoretical methods, it can be concluded that in some cases lipophilicity is well predicted using specialized programs, but it is worth supporting the results with an experimental method.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	5
Введение.....	7
1 Литературный обзор	9
1.1 PROTAC – новая фармакология.....	9
1.2 Фармакокинетика и ADMET характеристики PROTACs.....	14
1.3 Способы определения липофильности.....	21
1.4 Общая характеристика E3 лигазы cereblona	26
1.5 Лиганды к CRBN.....	29
1.6 Способы синтеза лигандов к CRBN.....	33
2 Результаты и их обсуждение.....	40
3 Экспериментальная часть.....	50
3.1 Реагенты и оборудование.....	50
3.2 Методика проведения эксперимента	50
3.3 Определение значения фактора удерживания	51
3.4 Расчет физико-химических свойств <i>in silico</i>	52
Заключение	53
Список используемой литературы	54
Приложение А Графики зависимостей фактора удерживания исследуемых соединений от доли метанола в подвижной фазе	63
Приложение Б Физико-химические свойства, рассчитанные <i>in silico</i>	73

Определения, обозначения и сокращения

ADME	введение, распределение, метаболизм, экскреция
AB-MPS	простая многопараметрическая оценочная функция
AIBN	азобисизобутиронитрил
ALK	киназа анапластической лимфомы
BTK	тирозинкиназа Брутона
BRD4	бромодоменсодержащий белок 4
CRBN	цереблон
CLIP-TAC	внутриклеточные клик-образующие химеры, нацеленные на протеолиз
CELMoD	препараты, модулирующие лигазу Цереблону E3
CBL	лимфома Каситаса В-линии
cIAP2	клеточный ингибитор белков апоптоза 2
CRL4	куллин-RING-лигаза 4
CUL4	куллин 4
DMF	<i>N,N</i> -диметилформамид
DIPEA	диизопропилэтиламин
DDB1	белок, связывающий повреждения ДНК
DMAP	диметиламинопиридин
HATU	бис(диметиламино)метилен]-1 <i>H</i> -1,2,3-триазоло[4,5-
HECT	домен, гомологичный карбонильному концу E6-ассоциированного белка
HBD	доноры водородной связи
HBA	акцепторы водородной связи
IAP	ингибитор белка апоптоза
IMiD	иммуномодулирующие препараты
IR	инсулиновый рецептор

MDM2	гомолог двойной минуты 2 мыши
MW	молярная масса
NBS	<i>N</i> -бромсукцинимид
NMP	метил-2-пирролидон
o	оптически управляемые PROTAC
PROTAC	химера, нацеленная на протеолиз
POI	белок интереса
PSA	площадь полярной поверхности
Pgp	P-гликопротеин
	химера фотохимического нацеливания
RING	домен реального интересного нового гена
RBX1	RING-box белок 1
STAT3	преобразователь сигнала и активатор транскрипции
TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран
UPS	убиквитин-протеасомная система
VHL	белок фон Гиппеля — Линдау
АМК	аминокислоты
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ОФ-ВЭЖХ	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Введение

Разработка лекарственных препаратов – трудоемкий и дорогостоящий процесс. При разработке новых биологически активных веществ важным этапом является начальный отбор потенциальных молекул, с последующим их тестированием на активность против биохимических мишеней. Только в результате данной процедуры выбираются наиболее перспективные кандидаты для дальнейшей разработки. При разработке также важно учитывать физико-химические свойства соединений. На начальных этапах разработки пользуются эмпирическим правилом Липински, которое помогает определить, насколько молекула, которая проявляет благоприятное биологическое воздействие, соответствует лекарству для перорального введения.

Одним из ключевых параметров, которые рассматривают при поиске биологически активных веществ, является их коэффициент распределения $\log P$. Согласно вышеупомянутому правилу, кандидаты в лекарственные препараты должны обладать липофильностью ≤ 5 . С помощью данного показателя возможно спрогнозировать биодоступность и предсказать возможный терапевтический эффект на организм.

В современной фармакологической индустрии привлекательной и перспективной терапевтической стратегией являются PROTAC [1]. Эти соединения позволяют нацеливаться на широкий спектр aberrантно гиперактивных ферментов, что помогает в борьбе с разными заболеваниями. Но нерешенным остается вопрос с физико-химическими свойствами, так как PROTAC зачастую имеют плохую биодоступность, что побуждает исследователей оптимизировать их.

Цель работы: определение экспериментальных значений липофильности новых лигандов цереблona.

Задачи работы:

– Методом ОФ ВЭЖХ определить логарифмы коэффициента удерживания новых лигандов цереблona при различном соотношении метанол-вода.

– По полученным данным определить значение фактора удерживания при 100%-ом содержании воды в подвижной фазе.

– Используя справочную литературу и экспериментальные данные веществ-стандартов вывести уравнение, связывающее $\log P$ с фактором удерживания. Рассчитать значения липофильности для исследуемых соединений.

– Сопоставить полученные экспериментальные значения с рассчитанными *in silico*.

1 Литературный обзор

1.1 PROTAC – новая фармакология

Технология PROteolysis TArgeting Chimeras — это новая стратегия деградации белков, набирающая все большую популярность в разработке лекарств. Она подразумевает использование бифункциональных небольших молекул, чтобы вызвать убиквитинирование и деградацию белков-мишеней через систему убиквитин-протеасома [1]. Данная молекула состоит из трех частей: 1) лиганд, связывающий интересующий нас белок-мишень (POI); 2) лиганд, связывающий убиквитин-лигазу E3; и 3) линкер, необходимый для их соединения (рисунок 1).

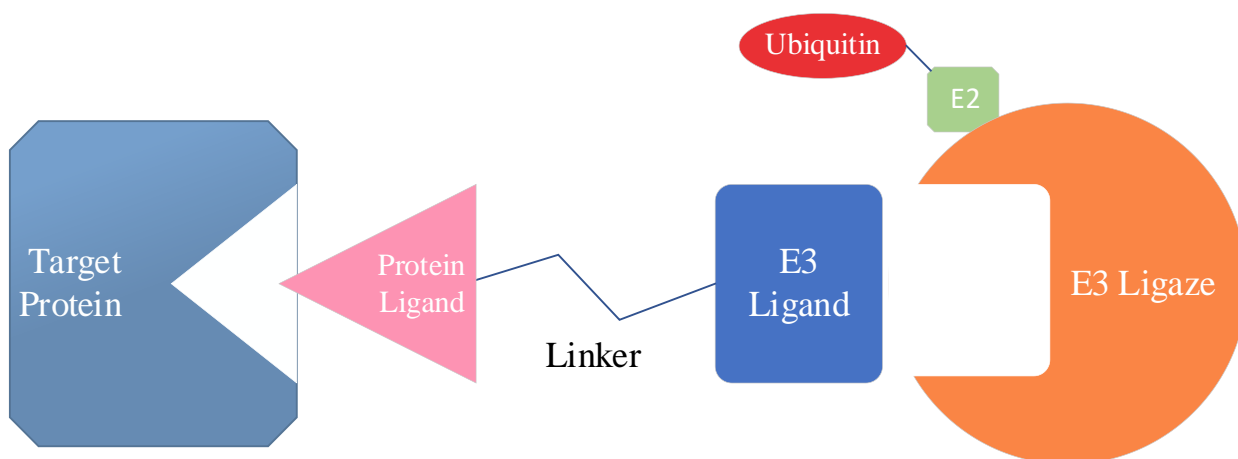


Рисунок 1 – Строение PROTAC

За последние десятилетия они стали главным предметом обсуждения среди ученых. Это связано с их неоспоримыми преимуществами перед низкомолекулярными ингибиторами. Например, они способны расщеплять белки, которые до этого считались «не поддающимися лечению», это происходит за счет того, что деградация, опосредованная молекулой PROTAC, требует только связующего белка интереса, а не функционального ингибитора

[2]. Однако, из-за того, что данное направление только начинает развиваться, существует также ряд проблем, не имеющих конкретного решения. К ним относятся недостаток информации об их свойствах, сложность дизайна, плохие ADME характеристики и отсутствие определенных методов решения проблем [3].

Роль PROTAC заключается в приведении целевого белка в тройной комплекс с убиквитинлигазой E3, что приводит к полиубиквитинированию мишени и ее деградации UPS. Поскольку PROTAC требуют взаимодействия нескольких белков-партнеров для образования тройных комплексов, которые продуктивно убиквитинируют и разрушают мишень, эти новые контакты могут привести к усилению активности, эффективности и селективности в деградации целевого белка [4, 5]. В этом процессе сам PROTAC не расщепляется, вместо этого он вновь может способствовать убиквитинированию и деградации других белков-мишеней (рисунок 2)

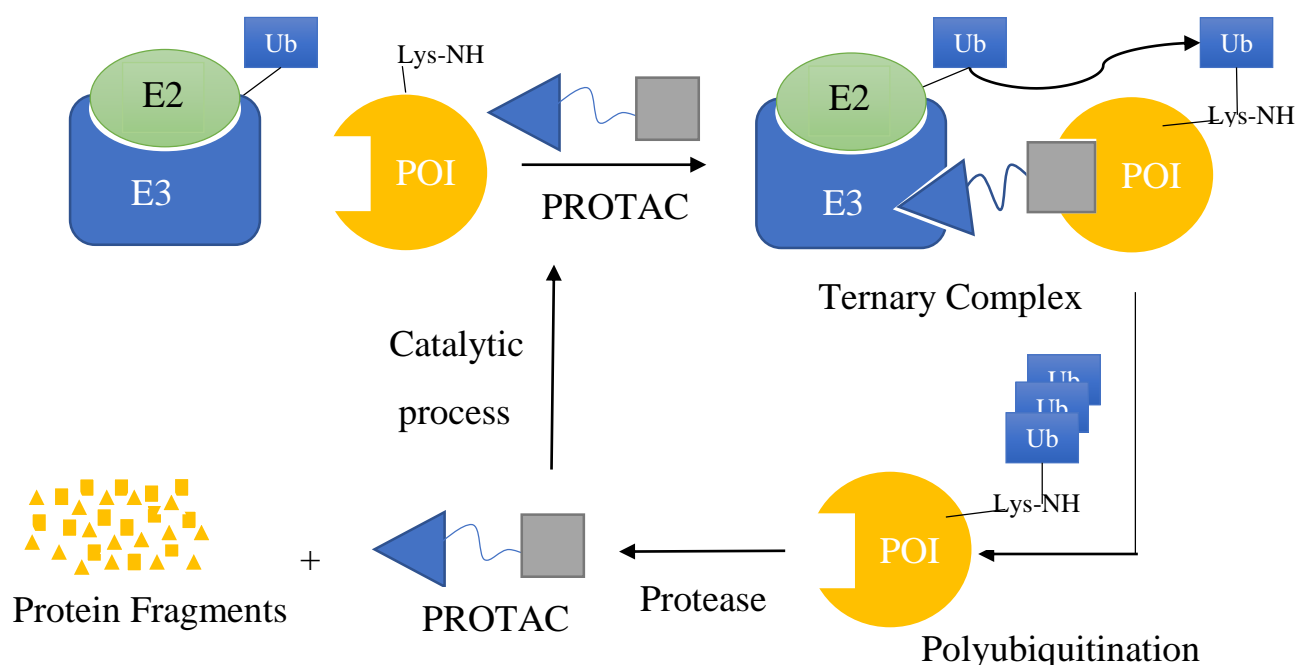


Рисунок 2 – Механизм работы PROTAC

Первые публикации о PROTAC появились в 2001 году, после чего они постепенно становились наиболее популярными в поиске лекарств [1]. Несмотря на то, что их обсуждения начались два десятилетия назад, данные об ADME характеристиках только начинают появляться [3].

Как нам известно, наиболее предпочтительный способ введения лекарственного препарата – пероральный. Одной из важнейших проблем PROTAC при разработке лекарственных средств является их полное несоответствие эмпирическому правилу пяти Липински. Данное правило гласит, что биодоступный препарат должен иметь MW не более 500 а.е.м, не более 5 доноров водородной связи, не более 10 акцепторов водородной связи и коэффициент распределения октанол-вода не более 5 [6].

Авторы статьи [7] провели анализ физико-химических дескрипторов PROTACs, связанные с правилом пяти, а также оценили площадь полярной поверхности, значение простой многопараметрической оценочной функции, количество вращающихся связей (nRotB) и также представили число нарушений правила Липински ($N_{\text{rule-of-5}}$). Результаты анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели физико-химических свойств PROTACs

Соединение	A1874	MZ1	RIPK2	SNIPER(ABL-39)	MT-802	P131
E3 Ligase	MDM2	VHL	VHL	IAP	CRBN	CRBN
MW, Da	1174	1003	1060	1115	788	913
cLogP	9.1	4.9		5.7	3.4	3
HBD	4	4	4	4	4	4
HBA	16	17	18	20	17	21
PSA, Å ²	200	210	233	228	211	247
nRotB	27	25	29	29	15	20
$N_{\text{rule-of-5}}$	3					
cLogD	7.9	3.5	3.7	5.9	3	3
AB-MPS	7.9	3	3		20	36.1

Структуры молекул, для которых проводилась оценка данных критериев, представлены на рисунке 3.

Несмотря на то, что в настоящий момент существует небольшое количество лигаз E3, комбинаций тройного комплекса есть огромное множество, что приводит к обширному разнообразию структур и физико-химических свойств.

Рассматривая преимущества и недостатки деградоров в качестве лекарственных препаратов, можно отметить, что несмотря на то, что PROTACs сильно отклоняются от эмпирического правила Липински, которому подчиняются устоявшиеся на рынке лекарственные препараты, это не исключает их сильных преимуществ перед низкомолекулярными ингибиторами. К таким преимуществам относятся:

- селективность. PROTAC избирательно воздействует на конкретные целевые белки (CRBN, VHL, MDM2, BTK и др.);

- возможность избежать лекарственной резистентности. PROTACs показали преимущества при лекарственно-устойчивом раке, благодаря разрушению всей молекулы белка [8]. Например, авторы статьи [9] представили PROTAC ARCC-4, который способен разлагать андрогеновый рецептор при наномолярных концентрациях, а также преодолевает рак предстательной железы, устойчивый к энзалутамиду;

- каталитический механизм действия. Благодаря этому достигаются хорошие эффекты деградации белка при малых концентрациях [10];

- может разрушать белок интереса, считающийся не поддающимся лечению. Существует подтверждающий случай, когда технология PROTAC, нацеленная на STAT3, проявила мощную биологическую активность *in vitro* и *in vivo* [11].

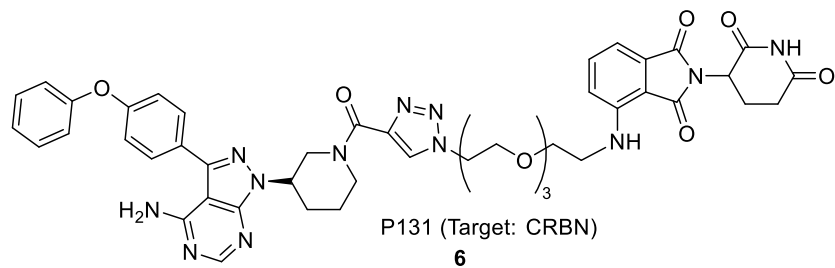
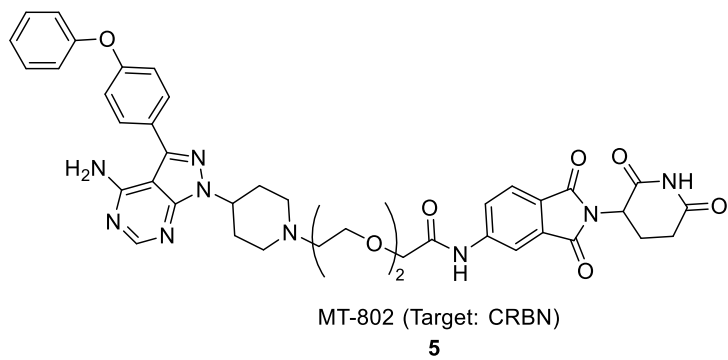
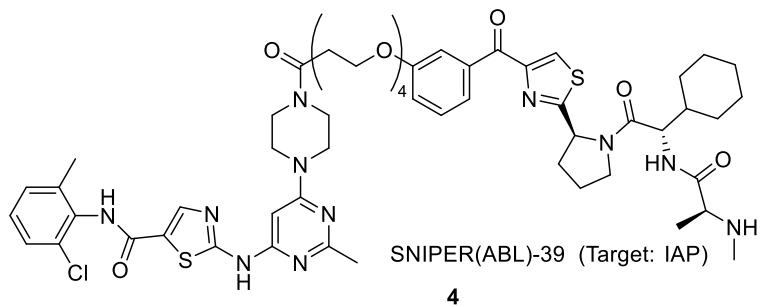
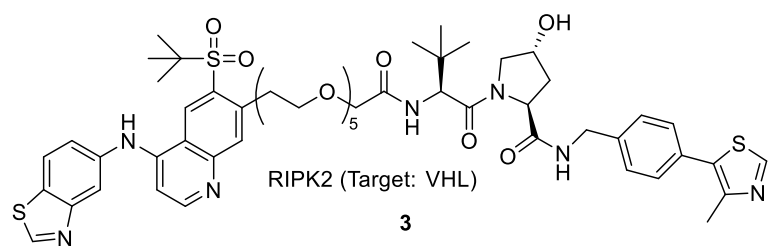
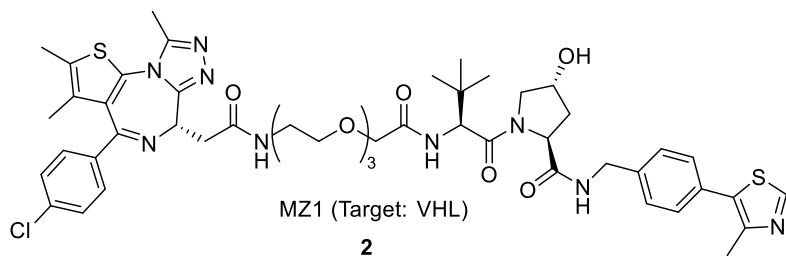
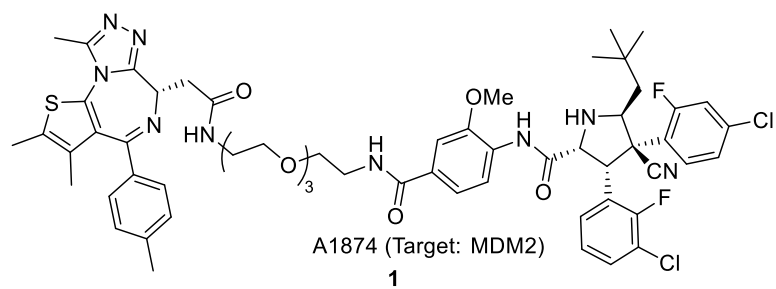


Рисунок 3 – PROTACs

Несмотря на все достоинства и перспективность PROTAC в разработке лекарств, необходимо понимать, что имеется также множество недостатков и вопросов, решение которых на данный момент все еще находится в разработке. Основными проблемами являются:

- плохая растворимость и проницаемость;
- сложность при оценке фармакокинетических и ADME характеристик.

Полученные результаты зачастую являются неточными из-за проблем с растворимостью;

- проблемы при разработке PROTAC. Не все лигазы подходят всем мишеням. Отсутствие рационального дизайна;

- возможность непреднамеренной деградации белка. Такое может произойти в ситуации, когда нецелевой белок напрямую не связан с PROTAC, а находится в комплексе с белком интереса или около него;

- деградация полной молекулы белка. Данная особенность действия PROTAC может вызывать нежелательные побочные эффекты, например, если белок интереса играет важную роль для физиологической активности клеток [12, 13].

1.2 Фармакокинетика и ADMET характеристики PROTACs

1.2.1 Растворимость

Низкая растворимость плохо влияет на абсорбцию и биологическую доступность соединения после перорального приема и может привести к неустойчивым значениям биотестов во время разработки лекарственного средства. Минимальная растворимость, необходимая для соединения, строго зависит от его проницаемости и дозы. Для максимальной пероральной абсорбции соединения с высокой проницаемостью требуют более низкой растворимости, чем соединения с низкой проницаемостью [14]. В контексте PROTACs, которые имеют высокую молекулярную массу и, как правило,

низкую проницаемость, раннее внимание к растворимости имеет решающее значение для пероральной эффективности [3]. Предпочтителен выбор лигандов E3 с умеренной/высокой растворимостью, но их выбор зависит от мишени и экспрессии лигандов E3 в ткани.

Химические модификации линкера обеспечивают наиболее удобный способ оптимизации растворимости PROTAC. Повышение ионизации или способности связывания водородных связей являются одними из наиболее распространенных и практичных стратегий, используемых химиками-медиками для повышения растворимости органических соединений в воде. Например, замена традиционных линейных алкильных и ПЭГ-фрагментов гетероциклами с насыщенным азотом (пиперидины или пиперазины) значительно улучшает растворимость ARD-69 **7** (рисунок 4) [15]. Точно так же, включение полярных пиперазиновых и пиримидиновых фрагментов в линкер привело к более растворимым и активным соединениям [16]. Следует отметить, что придание жесткости линкеру гетероциклами может неблагоприятно сказаться на образовании тройного комплекса, что снизит биологическую активность деструкторов.

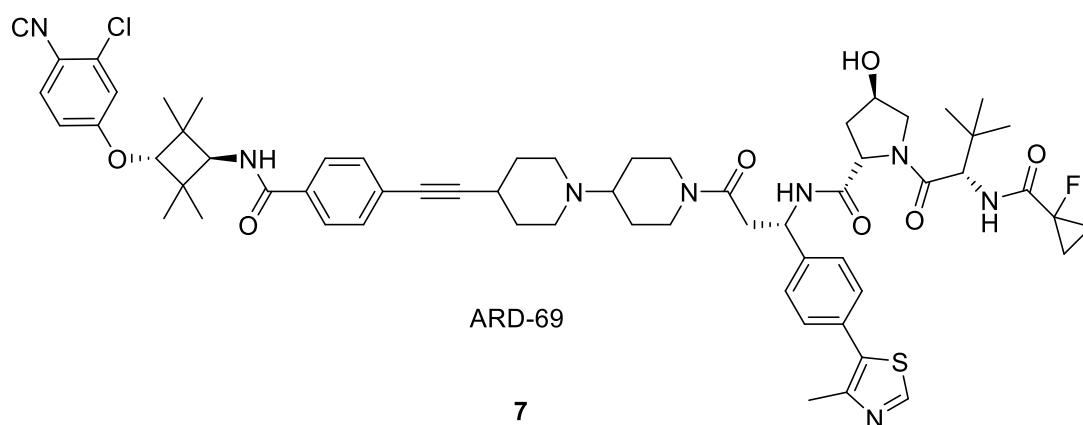


Рисунок 4 – Строение PROTAC

1.2.2 Метаболизм

Состав и длина линкера могут влиять на конечную внутреннюю растворимость, проницаемость и метаболическую стабильность данного PROTAC. Таким образом, внимание к структурным модификациям линкера имеет ключевое значение для разработки деструкторов.

Улучшение метаболической стабильности является еще одной стратегией для того, чтобы улучшить пероральную биодоступность. Структурно модификация двух лигандов ограничена их белками-мишенями, поэтому линкерная часть кажется более гибкой для оптимизации PROTAC. Например, для улучшения метаболической стабильности возможно изменение длины линкера, точки привязки линкера и использование циклических линкеров [17].

Длина и состав линкера оказывают значительное влияние на метаболическую стабильность PROTAC. По сравнению с отдельными лигандами, введение третьего элемента-линкера увеличивает количество слабых мест, несущих определяющую функцию действия молекулы. Деградаторы с короткими линейными линкерами показали лучшую метаболическую стабильность из-за больших стерических затруднений связывающего вещества, что может препятствовать взаимодействию с ферментами, связанными с метаболизмом [18]. В целом, более длинные линкеры увеличивают вероятность того, что деградаторы будут подвергаться быстрому метаболизму.

Четкая тенденция к улучшению метаболической стабильности PROTAC за счет модификаций линкера все еще отсутствует. Раннее выявление слабых мест может помочь ускорить этот процесс в сторону образования метаболически стабильных соединений [18].

1.2.3 Липофильность и проницаемость

Также, проблему в развитии PROTAC возможно решить путем улучшения клеточной проницаемости и оптимизации структуры линкера,

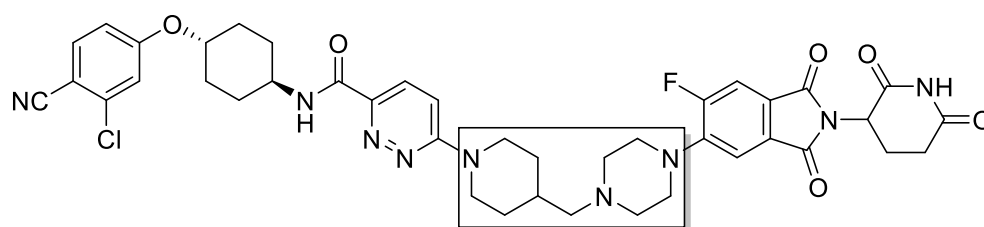
поскольку увеличенный размер соединений приводит к снижению проницаемости, что ограничивает всасывание лекарств при пероральном приеме.

Например, замена линкера ПЭГ на 1,4-дизамещенное фенильное кольцо значительно улучшает клеточную проницаемость PROTAC. Также следует избегать множественных амидных фрагментов для сохранения проницаемости. Помимо молекулярной массы, структурные модификации для улучшения проницаемости соединения включают снижение полярности и модулирование липофильности [19]. Доказано, что введение азота в ароматические кольца или алкильные линкеры улучшает липофильность PROTAC за счет минимизации площади полярной поверхности, и как следствие, улучшает клеточную проницаемость [20]. Помимо этого, изучаются варианты улучшения клеточной проницаемости с помощью образования внутримолекулярных водородных связей за счет уменьшения их молекулярного размера и полярности. Так, амиды лиганда VHL вблизи точек присоединения линкера способствуют снижению проницаемости, а сокращение присутствия доноров водородных связей, подверженных воздействию растворителей, или экранирование полярности -NH от растворителя (путем увеличения стерических затруднений) являются мощными стратегиями улучшения проницаемости нескольких типов линкеров [19]. Другой пример - PROTAC с относительно длинным, вытянутым и гибким ПЭГ-линкером, демонстрировал улучшенную клеточную проницаемость за счет изменения своей конформации на менее полярную [21]. При таком способе образования внутримолекулярных водородных связей молекула полосообразного типа трансформировалась в форму «шарика». Но введение внутримолекулярных водородных связей в конструкцию структуры PROTAC является наиболее сложным процессом [17, 22].

Пытаясь улучшить проницаемость клеток PROTAC за счет замены амидов на сложные эфиры в линкерах [23], наблюдали, что коэффициенты оттока увеличивались с липофильностью соединения. Следовательно, если, с

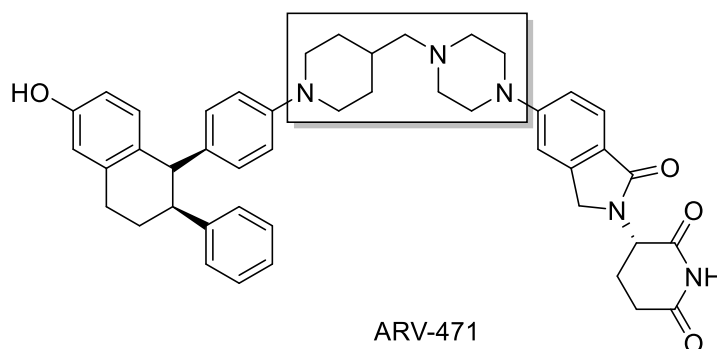
одной стороны, очень желательны высокопроницаемые PROTAC — с другой стороны, их более высокая склонность к активному оттоку представляет собой значительное ограничение для перорального всасывания.

Такие свойства, как растворимость и проницаемость, можно точно настроить, изменив длину линкера, количество доноров и акцепторов водородных связей, а также природу линкера — полярный/липофильный. Короткие липофильные линкеры, содержащие циклические ионизируемые группы, могли бы привести к более проницаемым и растворимым соединениям, которые менее склонны к метаболической нестабильности и оттоку Р-гликопротеина (Pgp), но их повышенная жесткость может изменить всю геометрию тройного комплекса, повлияв на эффективность PROTAC. Следовательно, модификации линкера должны сочетать в себе как стабильные тройные комплексные образования, так и хорошие свойства DMPK. Неудивительно, что первые два препарата PROTACs, включенные в клинические испытания фазы II, ARV-110 [24] и ARV-471 [25], соответствуют этим условиям (рисунок 5). Оба соединения несут короткий жесткий линкер с включенными фрагментами пиперидина и пиперазина.



ARV-110

8



ARV-471

9

Линкерная часть выделена прямоугольником

Рисунок 5 – Структура ARV-110 и ARV-471.

1.2.4 Оптимизация фармакокинетических свойств и ADME характеристик

Несмотря на то, что за последние 20 лет область применения PROTAC быстро росла, остаются нерешенные проблемы, которые мешают их развитию. Эти проблемы в основном связаны с молекулярной конструкцией деструкторов и оптимизацией лекарственной способности, а также с оценкой биологической активности.

Свойства PROTAC тесно связаны с типами лигаз E3 и в основном включают CRBN, VHL, IAP и MDM2, среди которых наиболее часто используются CRBN и VHL. Маловероятно, что PROTACs, нацеленные на VHL, будут иметь высокую пероральную экспозицию, однако PROTACs, нацеленные на CRBN, из-за меньшего молекулярного размера, более «подобны пероральным лекарствам» и изучаются в большей степени. Тем не

менее, ученые разработали пролекарство из соединения PROTAC, добавив липофильную группу к лиганду CRBN. Результаты показали значительное увеличение биодоступности PROTAC при пероральном приеме. Этот дизайн можно использовать для других PROTAC с аналогичными лигандами E3.

Одним из препятствий для разработки PROTACs являются их плохие фармакокинетические свойства и проницаемость через мембрану, в некоторой степени это происходит из-за большой молекулярной массы. Click-formed PROTAC (CLIPTAC) — это разработанный каркас, позволяющий формировать PROTAC из двух низкомолекулярных соединений с помощью клик-химии внутри клетки.

На рисунке 6 представлен механизм работы клик-формируемых PROTAC.

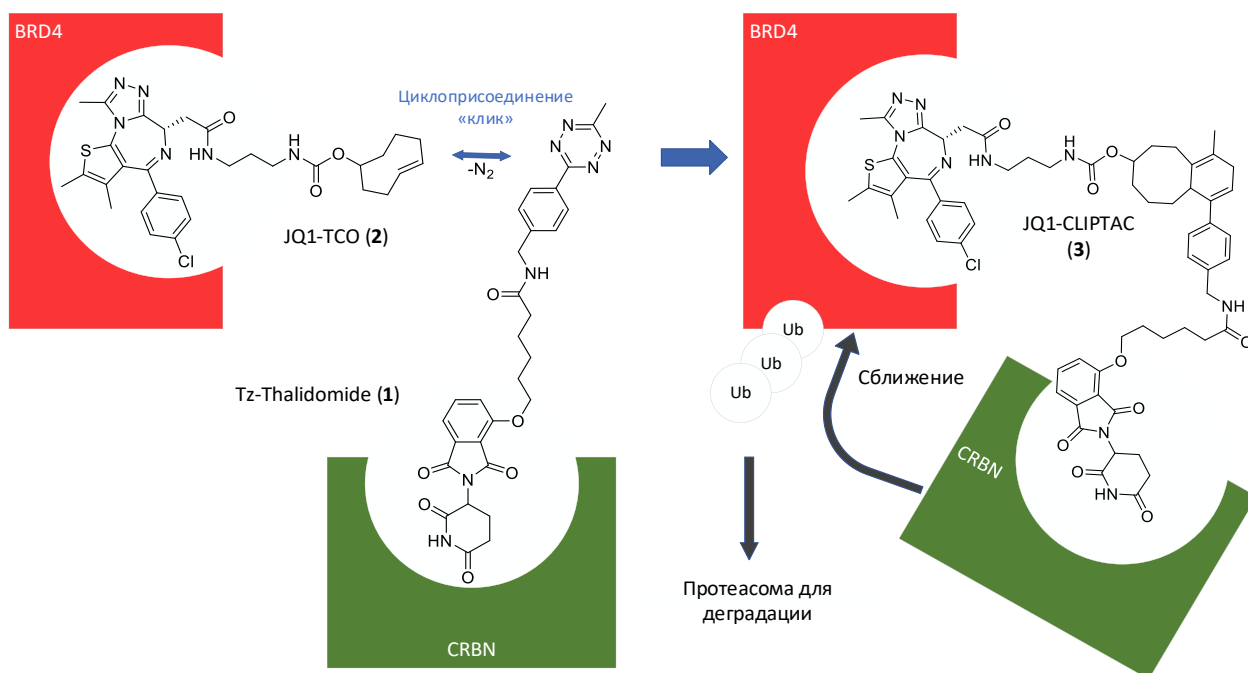


Рисунок 6 – Механизм действия клик-формируемых PROTAC (CLIPTAC) Tz-талидомид (1) меченое тетразином производное талидомида

Клетки последовательно обрабатывают двумя предшественниками CLIPTAC: TCO-меченым лигандом интересующего белка, например BRD4, за

которым следует рекрутирующий лиганд E3-лигазы с тетразиновой меткой, в данном случае талидомид (который рекрутирует CRBN). Реакция Click внутри клеток формирует гетеробифункциональную молекулу CLIPAC, которая приближает лигазу E3 к интересующему белку для убиквитинирования и последующей протеасомной деградации [26].

Недавно были разработаны новые классы PROTAC на основе CRBN - оптически управляемые PROTAC (**opto-PROTAC**). В этой системе используются соединения PROTAC, несущие фоторасщепляемую группу в глутаримидной части, что предотвращает его взаимодействие с CRBN (ультрафиолетовый свет вызывает элиминацию клеточной группы). Используя трифункциональную систему леналидомид-азо-дазатиниб, они могли контролировать деградацию белков ABL и BCR-ABL, изменяя конфигурацию PROTAC с помощью УФ-света. На основании этого они подтвердили, что активное состояние PROTAC может быть изменено УФ-облучением в живых клетках [27].

1.3 Способы определения липофильности

Понятие липофильности подразумевает собой возможность соединения растворяться в неполярных органических растворителях, жирах, липидах и маслах. Данный показатель играет одну из ведущих ролей при разработке лекарственных препаратов [28], так как помимо сродства молекулы к липофильной среде он также определяет растворимость соединения и его проницаемость сквозь клеточную мембрану. С помощью липофильности можно оценить фармакокинетику, фармакодинамику и токсикологический профиль соединения.

Коэффициент распределения выражается, как правило, в логарифмическом виде и вычисляется по формуле 1 [29].

$$\log P = \log \frac{C_{oct}}{C_{wat}}, \quad (1)$$

где C_{oct} – концентрация растворенного вещества в октанолe, мг/мл;

C_{wat} – концентрация растворенного вещества в воде, мг/мл.

Также липофильность иногда выражается через величину $\log D$, которая позволяет учитывать все формы взятого соединения: ионизированное, неионизированное состояния, а также учитывает pH среды. $\log D$ вещества определяется по формуле 2.

$$\log D = \log P - \log(1 - 10^{\pm(pK_a - pH)}) \quad (2)$$

1.3.1 Метод встряхивания колбы

Метод «shake-flask» является главным и наиболее надежным при определении липофильности [30]. Этот подход подразумевает измерение коэффициента распределения $\log P$ вещества между двумя фазами – октанол – вода.

Метод заключается в приготовлении раствора известной концентрации в смеси воды и октанолa, после чего его помещают в колбы и отправляют в механический шейкер на 24 часа. После встряхивания раствор оставляют до полного разделения фаз или используют метод центрифугирования. После полного разделения фаз производится определение концентрации исследуемого вещества в обеих фазах. Для этого можно использовать все доступные аналитические методы: газовую или высокоэффективную жидкостную хроматографии, фотометрию [31].

Метод встряхивания является «золотым стандартом» в контексте качества результатов в определении липофильности соединений. Главным его недостатком является трудоемкость и большое количество времени, необходимое для проведения данного процесса. Еще одной проблемой метода

встряхивания колбы является нелинейность сигнала детектора, которая возникает при большой разнице концентраций соединения в двух фазах. Также данный метод не позволяет судить о пропускной способности вещества.

На данный момент этот подход уже не имеет такой популярности, так как существуют более удобные и менее времязатратные методы.

1.3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – один из наиболее популярных аналитических методов, с помощью которого определяются различные физико-химические свойства соединений. Основная идея данного метода заключается в разделении соединений, находящихся в смеси, и их равновесном распределении между двумя несмешивающимися фазами [32].

ВЭЖХ разделяется на: нормально-фазовую и обращённо-фазовую. Для определения липофильности используется именно обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

ОФ-ВЭЖХ – вид ВЭЖХ, в котором неподвижная фаза является неполярной. Подвижную фазу составляют полярные растворители. В результате такого распределения фаз, неполярные молекулы имеют большее время удерживания, по сравнению с полярными. Длительное время удерживания неполярных молекул является следствием большого сродства к хроматографической колонке. Полярные же молекулы удерживаются в колонке в течение короткого времени из-за меньшего сродства к сорбенту.

Время выхода вещества из колонки прямо пропорционально его липофильности. Химические вещества удерживаются в колонке пропорционально их коэффициенту распределения $\log R$ в системе октанол-вода [33]. Колонка с твердой фазой традиционно состоит из углеводородов с длиной цепи от C_8 до C_{18} , нанесенных на носитель из силикагеля. В качестве подвижной фазы обычно используется ацетонитрил, но от условий эксперимента растворитель может изменяться.

Данный метод определяет время удерживания соединений, а значение липофильности описывается логарифмом коэффициента удерживания и вычисляется по формуле 3.

$$\log k = \log \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right) \quad (3)$$

где t_R – время удерживания исследуемого вещества;

t_0 – мертвое время.

Значения $\log P$ и $\log k$ могут быть связаны уравнением Колландера, как показано формулой 4.

$$\log P = a \log k_0 + b \quad (4)$$

где a и b – константы, которые получены в результате линейной регрессии (линейная регрессия – это модель зависимости одной переменной от другой переменной);

$\log k_0$ – логарифм фактора удерживания при полном отсутствии метанола в подвижной фазе.

Величину $\log k_0$ можно выразить из уравнения Снайдера-Сочевинского, как представлено формулой 5.

$$\log k_0 = \log k + S \cdot \varphi \quad (5)$$

где S – константа, полученная с помощью анализа линейной регрессии;

φ – объемная доля органического модификатора в подвижной фазе.

Формулы 4 и 5 считаются основными в методе ОФ-ВЭЖХ [34].

1.3.3 Обращенно-фазовая тонкослойная хроматография

Данный метод в отношении определения липофильности был введен в 1992 году [35]. Здесь липофильность характеризуется значением R_M , которое в свою очередь определяется по формуле 6.

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right), \quad (6)$$

где R_f – коэффициент удерживания, рассчитываемый делением расстояния, пройденного образцом, на расстояние, пройденное подвижной фазой, см.

Значения R_M определяются в присутствии разных концентраций органических растворителей в подвижной фазе. Далее устанавливается линейная зависимость между полученными показателями и различными пропорциями подвижной фазы, и коэффициент распределения рассчитывается путем экстраполяции на подвижную фазу чистой воды, в соответствии с уравнением Сочевинского-Вахтмайстера (уравнение 7)

$$R_M = R_{MW} + S\varphi, \quad (7)$$

где φ - объемный процент органического модификатора;

S - наклон графика регрессии (указывает на механизм удерживания);

R_{MW} - значение R_M , экстраполированное на $\varphi = 0$.

Данный метод считается одним из самых простых способов косвенного определения изотропной липофильности [36]. Неподвижная фаза представляет собой коммерчески доступную пластинку с силикагелем, а в качестве альтернативы можно использовать неполярную стационарную фазу из доступных пластин, после их измельчения с помощью *n*-октанола в диэтиловом эфире. Подвижные фазы представляют собой бинарную смесь

буфера или вода с органическим модификатором (зачастую используют метанол) [37].

Преимущества данного метода заключаются в более быстром определении, хорошей воспроизводимости и меньшей необходимости в чистоте образца за счет разделения во время хроматографического процесса.

1.3.4 Титрование

Титрование считается одним из наиболее популярных методов определения кислотности. Модификация данного метода нашла применение в определении липофильности [38]. Смысл его заключается в том, что исследуемый образец сначала титруют с добавлением известного количества кислоты или основания, чтобы получить кривую титрования. Для более достоверного результата данная операция повторяется несколько раз. Следующим шагом является титрование в присутствии известного количества октанола. Липофильность рассчитывается по сдвигу кривой, который образуется за счет распределения исследуемого образца между фазами.

$$\log P = \log \left(\frac{10^{|\Delta pK_{a1}-1|}}{r} \right), \quad (8)$$

где r – объемное соотношение октанола и кислоты либо основания

К недостаткам данного метода можно отнести необходимость в высокой чистоте образцов, возможность применения только для кислотных или основных соединений, а также неисполнимость исследования высоколипофильных соединений.

1.4 Общая характеристика E3 лигазы cereblona

Лигаза E3 подразделяются на три класса: RING, NECT и RBR [39, 40]. Все они содержат в структуре убиквитин-связывающий домен E2, различие заключается в механизме переноса убиквитина. RING представляет собой

наиболее обширное семейство убиквитин-лигаз, в котором домен связывает E2 с убиквитином, а субстрат связывающий домен рекрутирует его, после чего убиквитин переносится с каталитического цистеина E2 прямо на целевой субстрат. Структурно домен RING характеризуется наличием ионов цинка, которые координированы остатками цистеина и гистидина. Данный класс считается очень многообразным, поскольку некоторые домены активны как мономеры, такие как CBL [41] и RNF38 [42], в то время как некоторые активны как олигомеры, например, RNF4 [43] и cIAP2 [44]. Также, к классу RING относят белки U-box, они отличаются только тем, что не содержат ионов цинка в своей структуре [45].

Второй класс НЕСТ характеризуется N-концевым субстрат-связывающим доменом и C-концевым доменом НЕСТ, состоящим примерно из 350 АМК. Механизм переноса заключается в образовании тиоэфирного интермедиата с убиквитином через каталитический цистеин перед переносом на белок-субстрат [46].

Механизм работы лигазы E3 класса RBR (RING-between-RING) можно охарактеризовать как смесь классов RING и НЕСТ. Во-первых, он содержит мотив RING1-IBR-RING2, который способствует связыванию E2 и лигазы, что напоминает механизм RING [47]. Во-вторых, в 2011 году было обнаружено, что в домене RING2 содержится каталитический цистеин, который образует интермедиат тиоэфира с C-концевым доменом убиквитина, также, как лигазы E3 класса НЕСТ [48]. После этого был определен точный механизм, который заключается в первоначальном рекрутировании связанного E2 с убиквитином доменом RING1, после чего он переносит убиквитин на каталитический цистеин домена RING2 и его соединение с целевым субстратом.

На сегодняшний день лиганды CRBN являются наиболее часто используемыми лигандами лигазы E3 для конструирования PROTAC (талидомид и его производные). Эти лиганды являются лидерами в области PROTAC из-за неотъемлемых преимуществ лигандов CRBN:

– специфическая, сильная, биофизически подтвержденная аффинность связывания с их лигазами-мишенями E3;

– приемлемые физико-химические характеристики: молекулярная масса, растворимость, липофильность, отсутствие метаболических горячих точек;

– хорошо охарактеризованная структурная информация об их способах связывания.

Благодаря этим свойствам PROTAC на основе CRBN успешно используются для деградации различных типов белков-мишеней, связанных с различными заболеваниями, такими как рак, иммунные заболевания, различные вирусные инфекции сердечно-сосудистые и неродегенеративные заболевания (рисунок 7) [49].

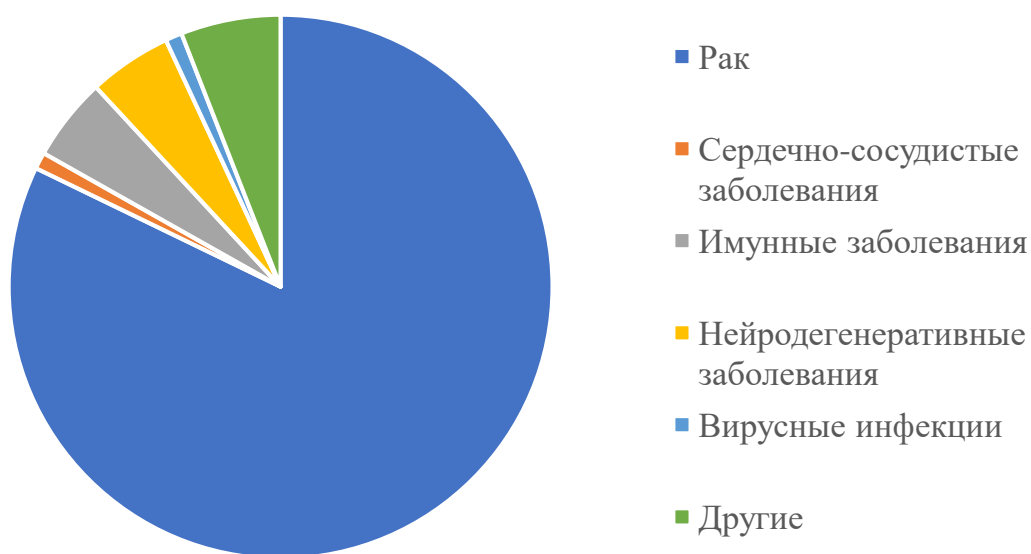


Рисунок 7 – Распределение PROTAC на основе CRBN при различных заболеваниях

CRBN образует комплекс убиквитинлигазы Куллин-4-RING E3, в котором он является одним из рецепторов субстрата и имеет важное значение

при действии малых молекул. Помимо cereblona CRL4 включает в себя DDB1, RBX1 и CUL4. Нацеливание иммуномодулирующих препаратов на cereblон меняет его субстратную специфичность в отношении неосубстратов и приводит к их убиквитинированию и протеасомной деградации. Строение комплекса CRBN-DDB1-E3 представлено на рисунке 8.

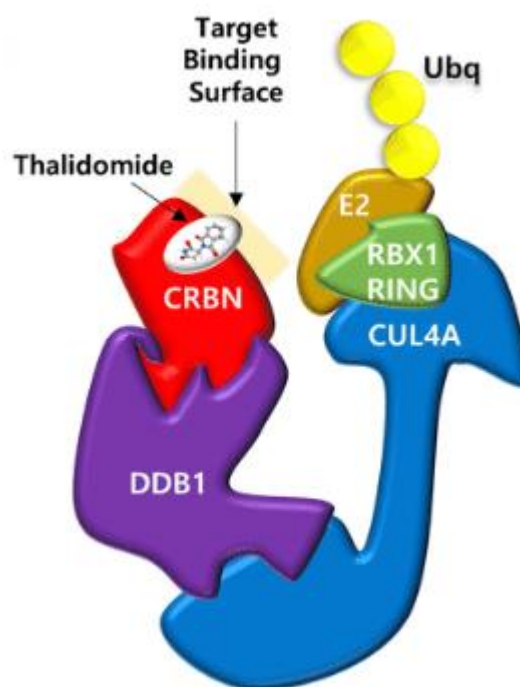
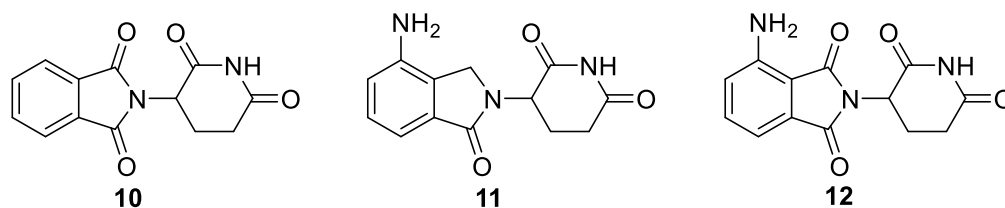


Рисунок 8 – Строение комплекса CRBN-DDB1-E3

1.5 Лиганды к CRBN

CRBN представляет собой многофункциональный белок из 442 аминокислот, который локализуется в цитоплазме, ядре и периферической мембране головного мозга и других тканей. CRBN широко экспрессируется в яичках, селезенке, простате, печени, поджелудочной железе, плаценте, почках, легких, скелетных мышцах, яичниках, тонком кишечнике, толстой кишке, и сетчатке. Первым описанным лигандом к cereblону был талидомид, после

чего были разработаны и его аналоги – помалидомид и леналидомид, представленные на рисунке 9.



10 – Талидомид; 11 – Леналидомид; 12 – Помалидомид

Рисунок 9 – Структурные формулы лигандов к CRBN

Талидомид – седативно-снотворное средство, разработанное и используемое в 1956-1962 годах немецкой фармкомпанией Grünenthal, которое является эффективным противорвотным средством и ранее назначалось при утренней тошноте на ранних сроках беременности. Вскоре после этого, у принимавших талидомид беременных женщин рождались дети с фокимелией (отсутствие проксимальных или средних частей конечностей и суставов). Этот препарат был изъят из продажи: за период использования талидомида было зафиксировано до 12000 случаев врожденных дефектов у новорожденных, при этом половина из них не выжили. Позже было выяснено, что талидомид оказался эффективным при лечении множественной миеломы и узловатой лепрозной эритемы [50].

Талидомид связан с рядом тератогенных эффектов, называемых талидомидной эмбриопатией, в ушах, глазах, лице, конечностях, гениталиях и внутренних органах, включая сердце, почки и желудочно-кишечный тракт. Тератогенность талидомида проявляется в различных критических периодах воздействия в течение эмбриогенеза. Причем самое раннее воздействие талидомида увеличивает риск аутизма и эпилепсии [51, 52]. Интересно, что тератогенность талидомида видоспецифична – пороки развития конечностей

у эмбрионов, подвергшихся воздействию талидомида, наблюдались у людей и кроликов, но не у грызунов.

Производные талидомида – леналидомид и помалидамид терапевтически активны при онкогематологических заболеваниях, и сейчас их используют в качестве иммуномодулирующих препаратов (IMiD) для лечения рака крови [53]. Современными учеными Мюнхенского университета было идентифицировано, что прямой биологической мишенью талидомида и его производных является цереблон - ключевой белок при аутосомно-рецессивной несиндромальной умственной отсталости, выполняющий функцию убиквитинлигазы [54]. При низких концентрациях мРНК цереблона наблюдается резистентность к иммуномодулирующим средствам, а высокий уровень показывает более длительную выживаемость больных, получающих иммуномодулирующие средства [55]. Кроме того, цереблон также регулирует экспрессию, сборку и активность других специальных белков, связанных с клеточной пролиферацией и метаболизмом, что приводит к возникновению и развитию метаболических заболеваний [56].

Основываясь на вышесказанном, изучение CRBN является важной задачей, так как он участвует во многих биологических процессах и отвечает за многие эффекты иммуномодулирующих препаратов.

Сейчас проводится много исследований разнообразных деградаторов на основе цереблона, нацеленных на деградацию различных белков.

Например, разработаны и изучены PROTACs на основе CRBN с ориентацией на киназу анапластической лимфомы для лечения рака. ALK представляет собой тирозинкиназу подсемейства киназ рецептора инсулина. Недавно группа ученых [57] описали структурный дизайн, синтез и оценку PROTACs, нацеленных на ALK. Сначала они исследовали лиганды CRBN, как часть лигазы E3, а затем получили серию мощных деструкторов ALK на основе различных лигандов CRBN, примерами которых являются PROTACs SIAI091 и PROTAC SIAI001 (рисунок 10) с линкерами на основе леналидомида/талидомида. Оба они индуцировали эффективную деградацию

ALK при низких наномолярных концентрациях в клетках и демонстрировали отличные ингибирующие эффекты роста. Важно отметить, что PROTAC SIAI001 продемонстрировал хорошую пероральную биодоступность в исследовании фармакокинетики.

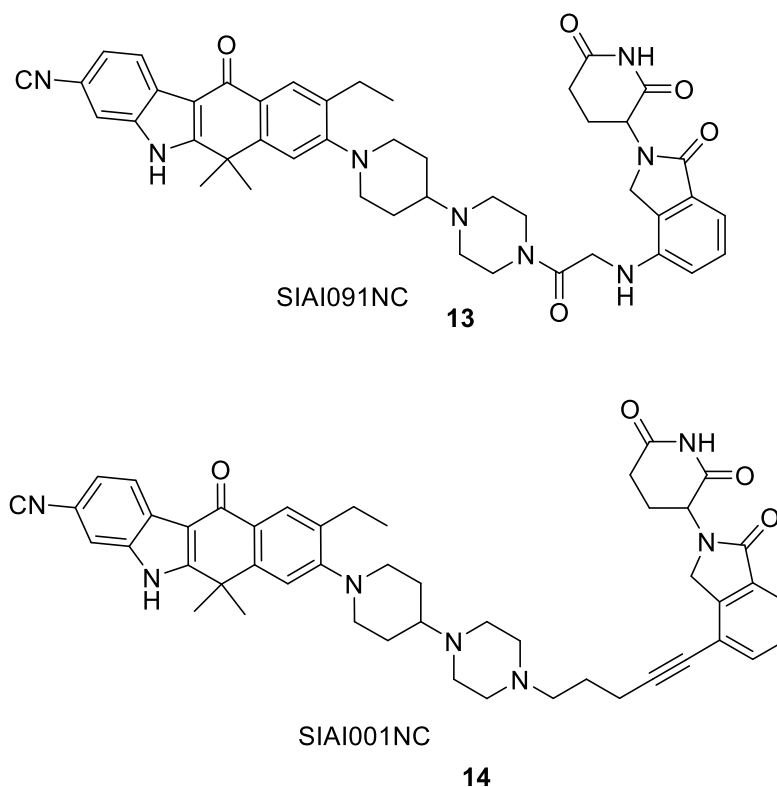


Рисунок 10 – Строение PROTAC

Для лечения нейродегенеративных заболеваний изучаются PROTAC нацеленные на GSK-3 β , LRRK2, Sirt2 и Tau [58-61]. Например, Tau - белок, ассоциированный с микротрубочками, регулирует их стабильность и играет роль в аксональном транспорте. Нарушение регуляции tau является характеристикой различных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и лобно-височная деменция (ЛВД) [62]. В 2019 году была разработана серия PROTAC на основе CRBN для деградации Tau и определено соединение-лидер - PROTAC QC-01-175 (рисунок 11). Авторами

было установлено, что он может преимущественно разрушать Тау-белок в нейронах ЛВД в сравнении со здоровыми клетками [61].

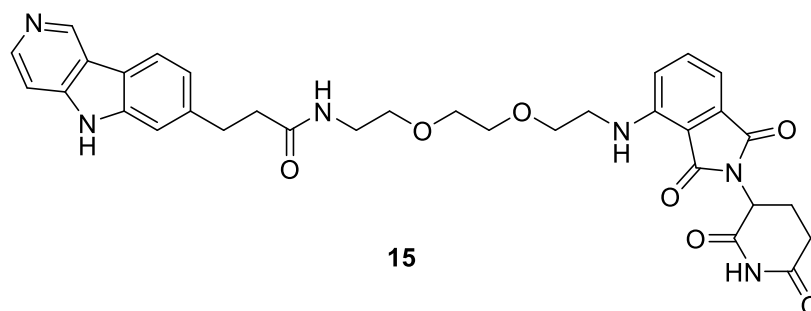


Рисунок 11 – Строение PROTAC QC-01-175

1.6 Способы синтеза лигандов к CRBN

Самыми распространенными лигандами к цереблону являются талидомид, леналидомид и помалидомида. На схеме 1 представлен метод получения помалидомида, основываясь на использовании 3-нитрофталевой кислоты. 3-нитрофталевый ангидрид **17**, полученный из соответствующей кислоты **16**, вступает в реакцию с гидрохлоридом 3-аминопиперидин-2,6-диона **18** с образованием соединения **19**. Последующее гидрирование приводит к получению помалидомида **20** [63].

Для получения производных 4-гидрокситалидомида авторы публикации [64] использовали коммерчески доступное соединение 3-нитрофталевый ангидрид **17**, который обрабатывали бензиловым спиртом и бензилбромидом. Далее проходило восстановление нитрогруппы, с последующим алкилированием. Продукт реакции **22** конденсировали с 3-аминопиперидино-2,6-дион гидрохлоридом, что привело к образованию *N*-алкилированного соединения **23**. Данное производное помалидомида можно вводить в реакции с первичными аминными линкерами, за счет образования амидной связи. Реагенты и условия представлены на схеме 2.

Схема 1

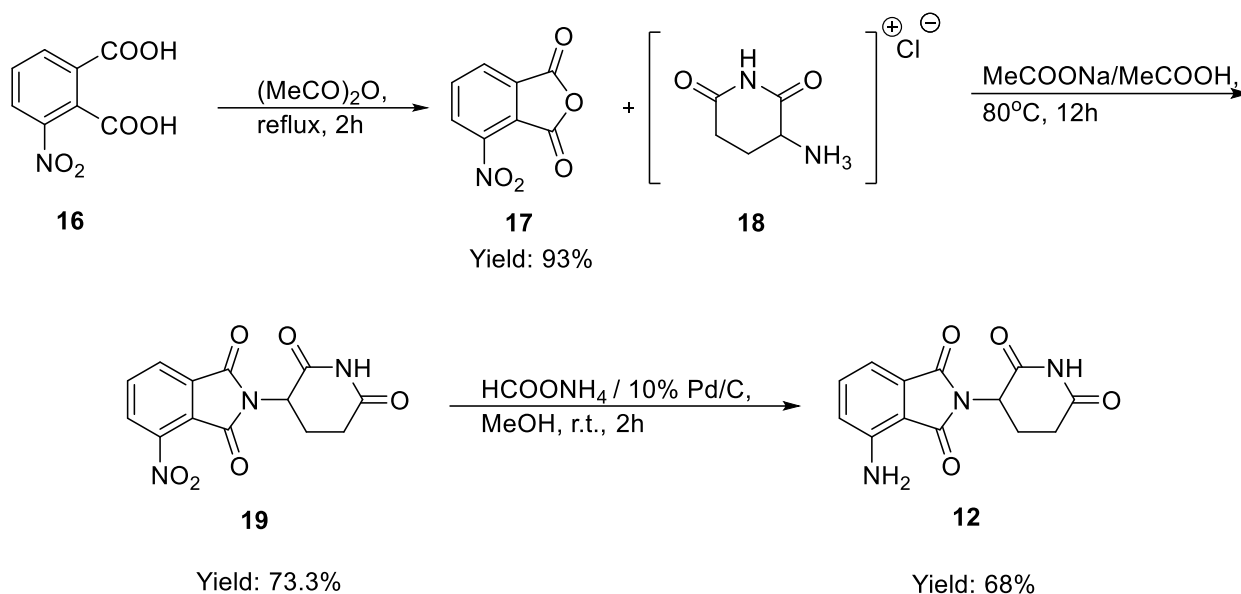
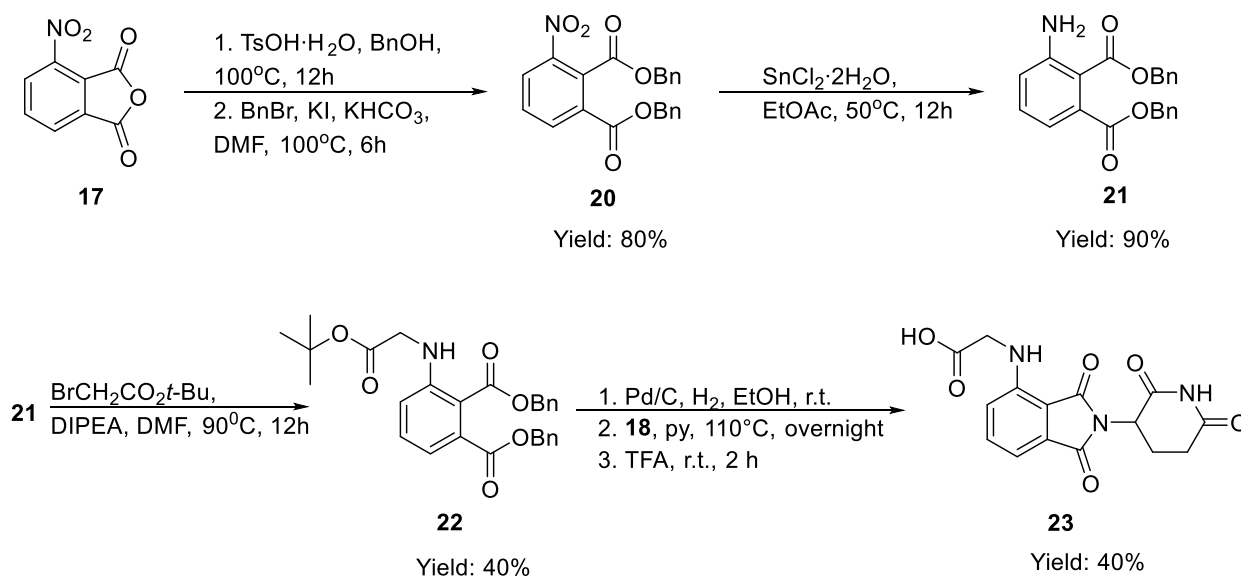


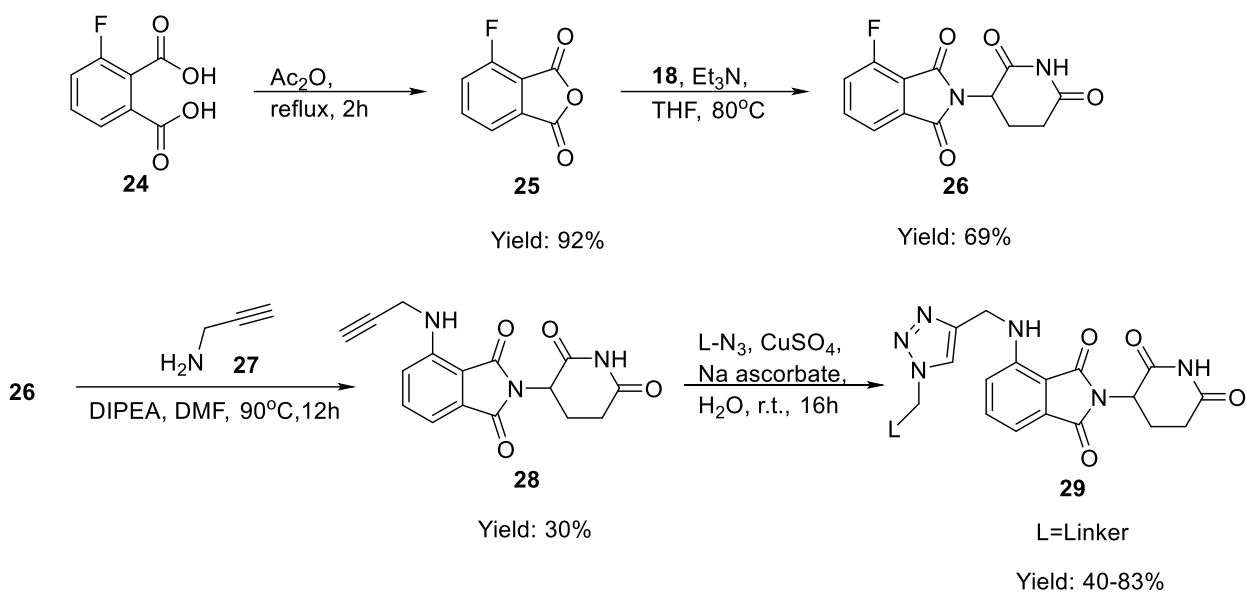
Схема 2



Также существуют методы синтеза, основанные на использовании галогензамещенных производных **10**. Так, авторы статьи [64], использовали коммерчески доступное соединение **25**, которое также можно получить циклизацией соответствующей кислоты. 3-фторфталевый ангидрид **25**

конъюгировали с **18**, что приводит к итоговому **26** с хорошим выходом. Данный синтетический подход представлен на схеме 3.

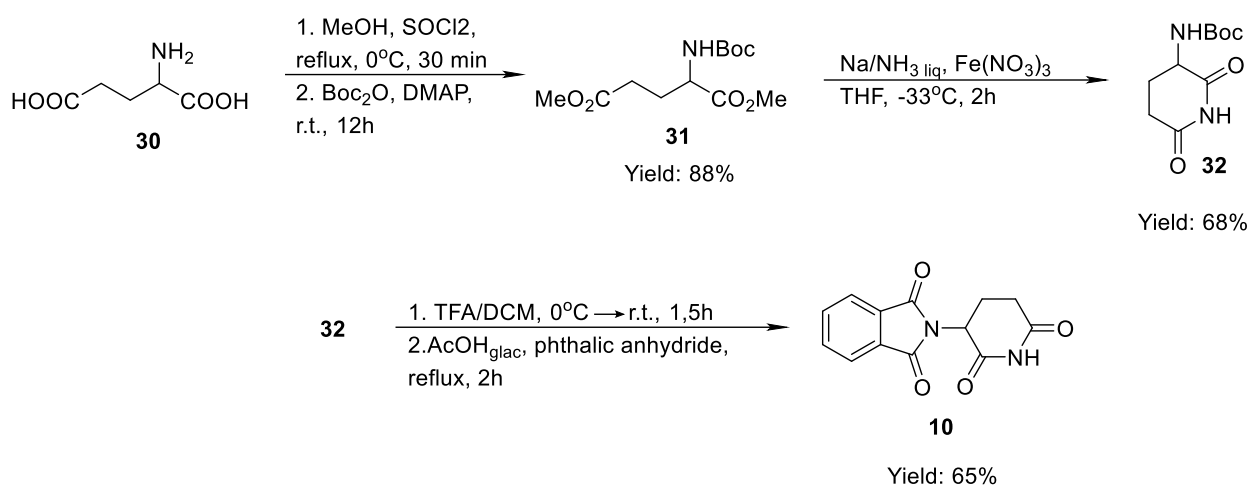
Схема 3



Взаимодействие полученного фторталидамида **26** с пропаргиламином приводит к образованию алкина **28** [65], который в свою очередь может вступать в клик-реакции азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемое медью [66, 67].

Синтетический подход к получению талидомида **10** представлен на схеме 4. Авторы статьи [68] использовали *трет*-бутил(2,6-диоксопиперидин-3-ил)карбамат **32**, который вводили в реакцию с фталевым ангидридом, при кипячении в присутствии ледяной уксусной кислоты.

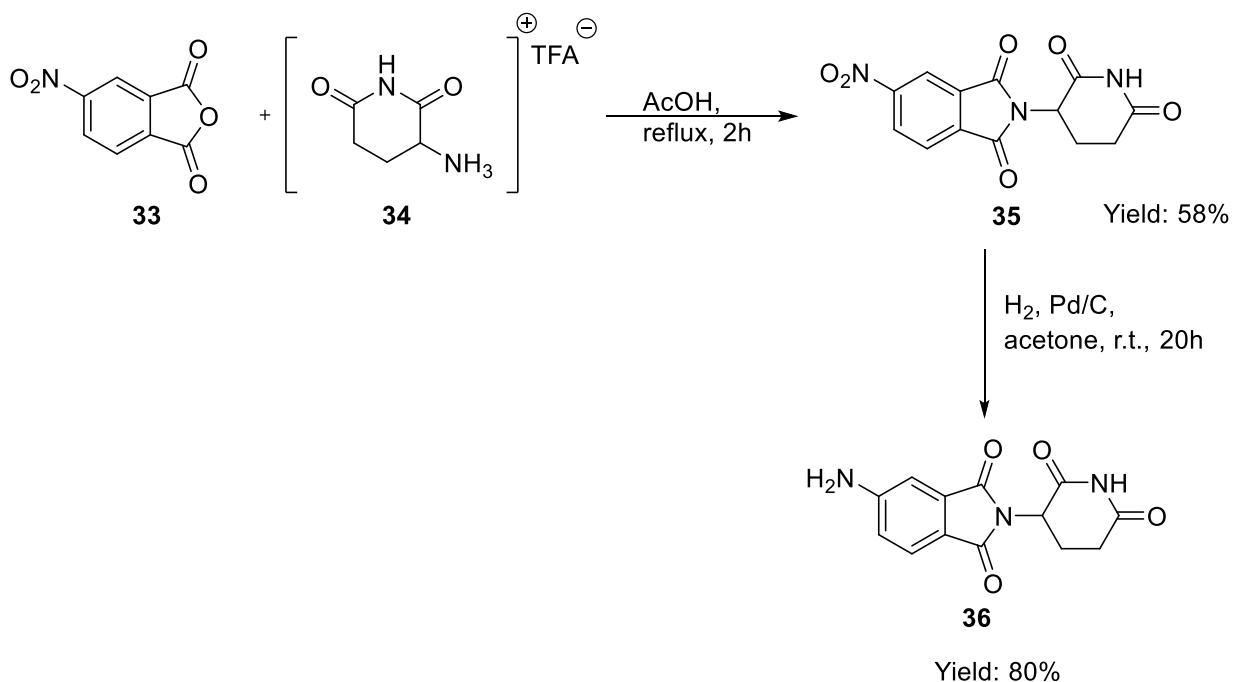
Схема 4



Также, лигандами к цереблону являются производные 4-гидрокситалидомида и 5-аминоталидомида.

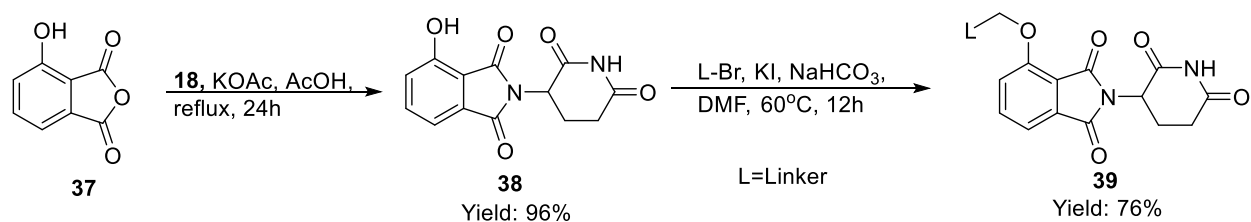
Реагенты и условия протекания реакций для получения 5-аминоталидамида представлены на схеме 5. Авторы исходили из 4-нитрофталевого ангидрида **33**, который вводили в реакцию с трифторацетатом 3-аминопиперидин-2,6-диона **34**, при кипячении в присутствии уксусной кислоты. Продукт реакции **35** восстанавливали с получением итогового 5-аминоталидамида [69].

Схема 5



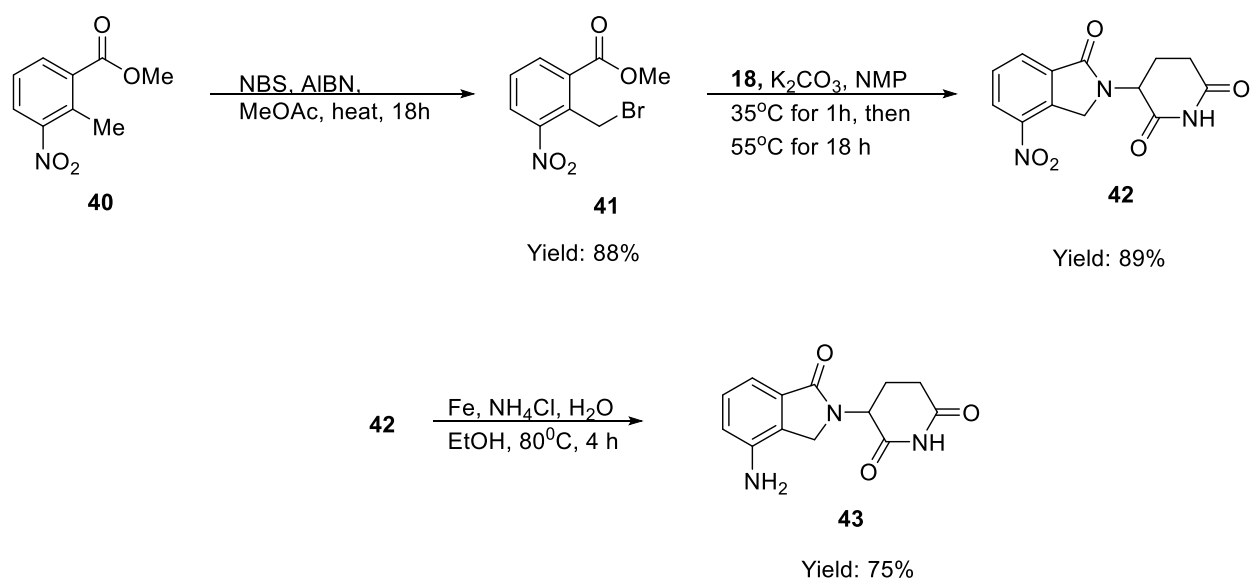
Для получения 4-гидрокситалидомида авторы использовали 3-гидроксифталевый ангидрид **37**, который вводили в реакцию с соединением **18**, при кипячении в присутствии ацетата калия и уксусной кислоты, что приводило к образованию итогового 4-гидрокситалидомида **38** [70]. Дальнейшее взаимодействие с бромными линкерами приводит к получению производных **39**, содержащих эфирную связь [64]. Реагенты и условия реакций данного синтетического подхода представлены на схеме 6.

Схема 6



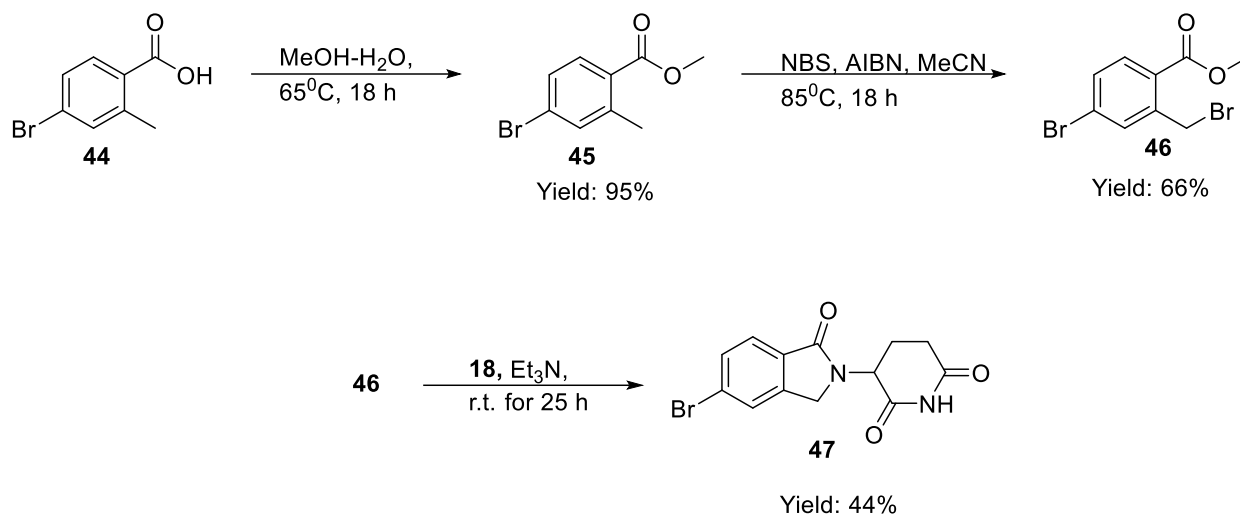
Лиганды на основе леналидомида обладают некоторым преимуществом, в сравнении с использованием производных талидомида и помалидомида. Это связано с отсутствием одной карбонильной группы, что обуславливает более высокую метаболическую и химическую стабильность соединений [71]. Так, авторы статьи [72] использовали метил 2-(бромметил)-3-нитробензоат **40**, полученный бромированием производного нитробензола **40**. Полученное соединение далее вводили в реакцию с гидроклоридом 3-аминопиперидин-2,6-диона **18**, в присутствии карбоната калия и *N*-метил-2-пирролидона в качестве растворителя. Последующее восстановление соединения **42** приводило к образованию конечного леналидомида **43**. Данный метод синтеза представлен на схеме 7.

Схема 7



Существуют также способы синтеза, основанные на использовании 4- и 5-бромпроизводных аналогов. Синтез представлен на схеме 8.

Схема 8



Сначала проводится этерификация 4-бром-2-(бромметил)бензоата **44** по Фишеру, с последующим радикальным бромированием толильной группы. Полученное соединение **46** вводили в реакцию конденсации с глутаримидным кольцом, в присутствии триэтиламина [73].

2 Результаты и их обсуждение

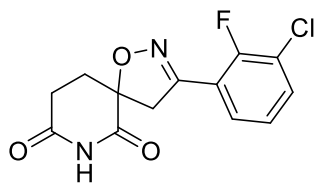
Растущий интерес к PROTAC на основе лигандов CRBN объясняется тем, что именно они находятся в химическом пространстве, частично перекрывающимся с пространством «правила пяти», в то время как деградоры на основе других лигандов E3-лигаз занимают более отдаленное пространство.

Показатель липофильности играет одну из ведущих ролей при разработке лекарственных препаратов. Помимо сродства молекулы к липофильной среде, данный физико-химический параметр также помогает установить растворимость соединения и его способность проникать сквозь клеточную мембрану.

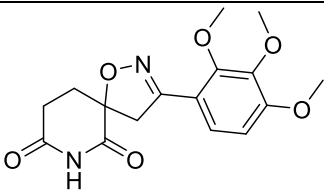
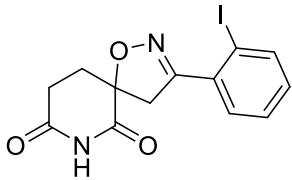
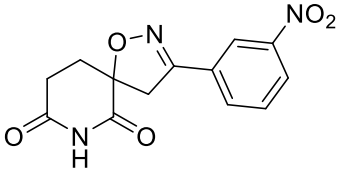
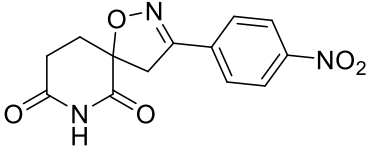
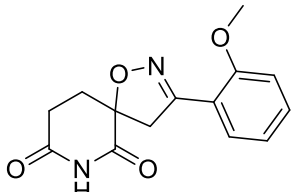
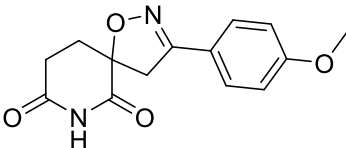
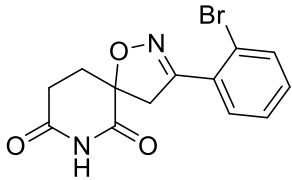
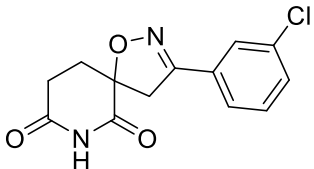
В данной работе определены значения липофильности для библиотеки из 23 соединений, которые являются потенциальными лигандами цереблona.

В качестве объекта исследования была взята библиотека соединений, синтезированных в партнерской лаборатории СПбГУ. Содержащиеся в ней соединения представляют собой производные фталимида, имеющие в структуре общий скаффолд (1-окса-2,7-дiazаспиро[4,5]дец-2-ен-6,8-дион), а также заместители различной природы в 3 положении изоксазольного фрагмента. Структуры веществ представлены в таблице 2.

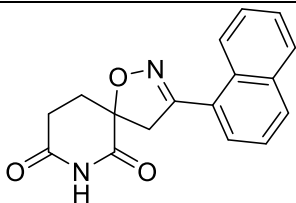
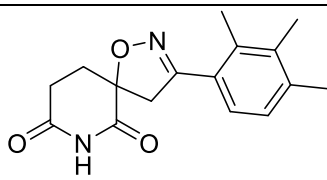
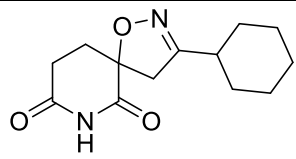
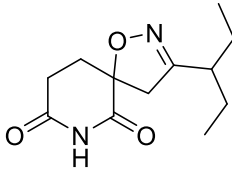
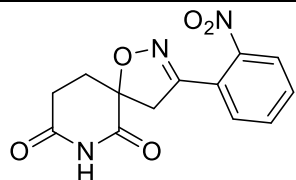
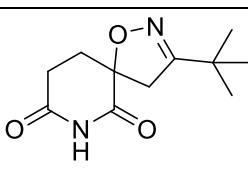
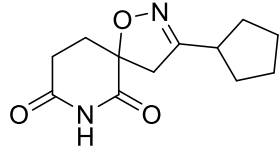
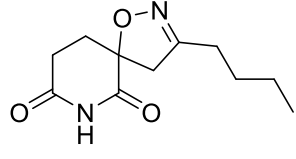
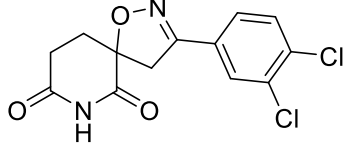
Таблица 2 – Структурные формулы исследуемых соединений

Название по номенклатуре ИЮПАК	Код соединения	Формула	Молекулярная масса, Да
3-(3-хлор-2-фторфенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	044		296,6876

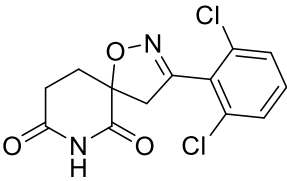
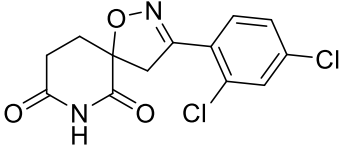
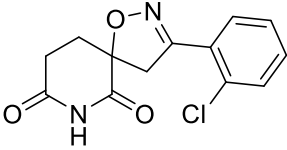
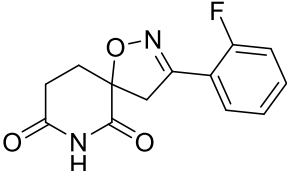
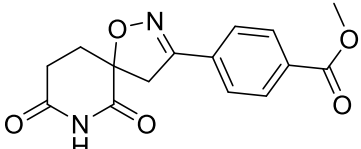
Продолжение таблицы 2

3-(2,3,4-триметоксифенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	069		334.3317
3-(2-йодофенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			
3-(3-нитрофенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			
3-(4-нитрофенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			
3-(3-метоксифенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			
3-(4-метоксифенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			
3-(2-бромфенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	113		3 2 3
3-(3-хлорфенил)-1-окса-2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	114		

Продолжение таблицы 2

3-(нафталин-1-ил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	115		
3-(2,3,4-триметилфенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			2 8
3-циклогексил-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			2 5
3-(пентан-3-ил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			238.2889
3-(3-нитрофенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	139		
3-(трет-бутил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	144		2 2
3-циклопентил-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	145		2 3
3-бутил-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион			2 2
3-(3,4-дихлорфенил)-1-окса-2,7-дiazаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8-дион	160		

Продолжение таблицы 2

-дихлорфенил)-1-окса-2,7- диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8- дион	161		
,4-дихлорфенил)-1-окса-2,7- диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8- дион	162		
-хлорфенил)-1-окса-2,7- диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8- дион	163		
фторфенил)-1-окса-2,7- диазаспиро[4.5]дец-2-ен-6,8- дион	174		
метил 4-(6,8-диоксо-1-окса- 2,7-диазаспиро[4.5]дец-2-ен- 3-ил)бензоат			3 0

Липофильность может быть оценена через параметр гидрофобности $\log R$, представляющий собой коэффициент распределения в системе н-октанол-вода. В настоящее время метод ОФ ВЭЖХ является широко распространенным способом определения данного параметра. В данном виде ВЭЖХ соединения распределяются между неполярной неподвижной фазой (октадецилсиликагель) и полярным элюентом по аналогии с системой н-октанол-вода.

Далее было необходимо получить уравнение зависимости логарифма коэффициента распределения в системе н-октанол-вода от логарифма фактора удерживания при нулевом содержании метанола. Значения $\log R$ для эталонных соединений были найдены в справочной литературе. Данные приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Значения $\log P_{o/w}$ и $\log k_0$ для стандартных веществ

Наименование стандарта		
Нафталин		
2-бутанон		
Ацетофенон		
Ацетанилид		
Бензол		
П-нитроанилин		
Дифениламин		

По полученным значениям времен удерживания стандартных веществ с известными значениями липофильности нами было получено уравнение, связывающее фактор удерживания с $\log P$:

$$\log P_{o/w} = 0,9729 \log(k_0) + 0,5454 \quad (9)$$

Далее для исследуемых соединений были получены значения $\log k$ при различных соотношениях метанол-вода (см. раздел 3) и построены градуировочные графики зависимости $\log k$ от доли метанола в подвижной фазе.

На рисунках 12-14 приведены примеры графиков для некоторых из производных 1-окса-2,7-дiazаспиро[4,5]дец-2-ен-6,8-диона (графики остальных соединений представлены в приложении А).

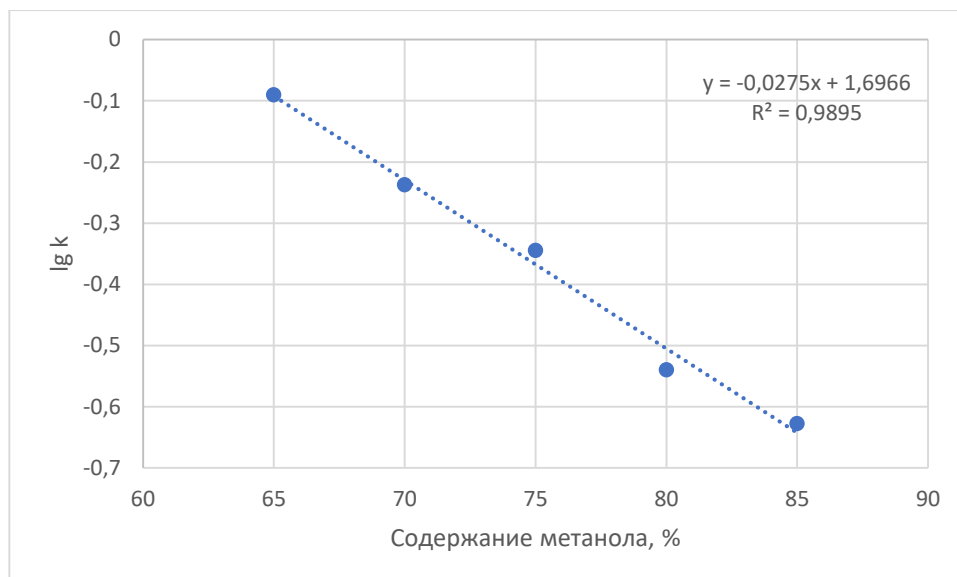


Рисунок 12 - Зависимость фактора удерживания 044 от доли метанола в составе подвижной фазы

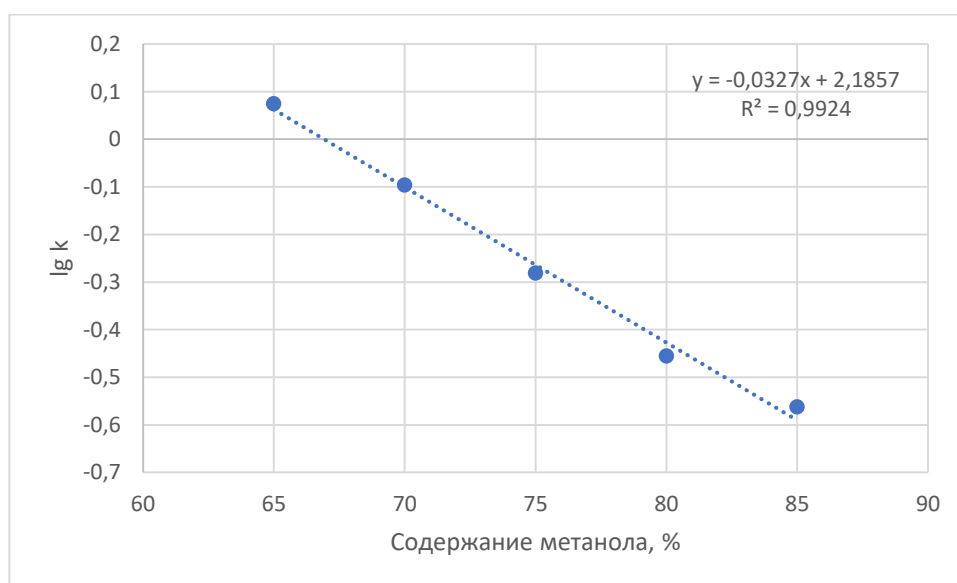


Рисунок 13 - Зависимость фактора удерживания 069 от доли метанола в составе подвижной фазы

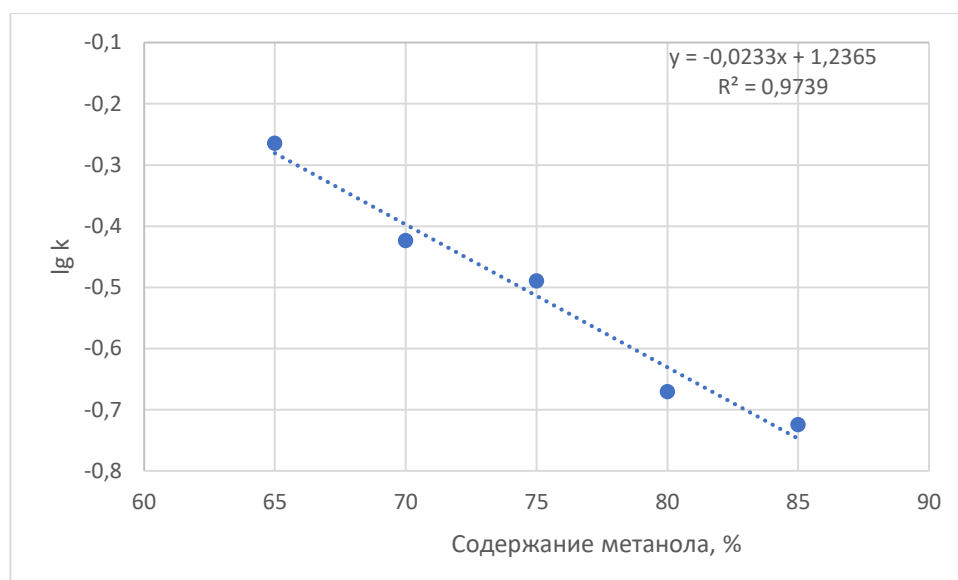


Рисунок 14 - Зависимость фактора удерживания 070 от доли метанола в составе подвижной фазы

По полученным результатам были найдены значения $\log k_0$, путем экстраполяции на нулевое содержание метанола.

Используя выведенное уравнения зависимости логарифма коэффициента распределения $\log P$ от $\log k_0$ были рассчитаны значения липофильности для исследуемых соединений. Дополнительно нами был проведен расчет значения $\log P$ с помощью алгоритма QikProp [74, 75], интегрированного в ПО SchrodingerSuite. Значения логарифмов коэффициента распределения, определенные экспериментально и предсказанные *in silico*, а также разница между ними ($\Delta \text{Log} P_{o/w}$) представлены в таблице ниже (таблица 4).

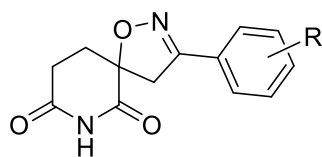
Таблица 4 – Полученные данные для новых лигандов цереблona

Исследуемое соединение	Log k_0	Log $P_{o/w}$	QPLog $P_{o/w}$	$\Delta \text{Log} P_{o/w}$
069				0.91

Продолжение таблицы 4

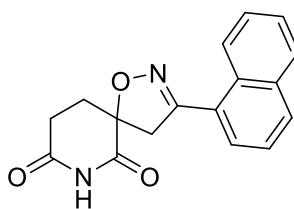
Исследуемое соединение	Log k ₀	Log P _{o/w}	QPLog P _{o/w}	ΔLogP _{o/w}
	1			0.18
				0.91
				1.05
				0.67
				0.50
113				0.17
114				0.60
115				0.23
				0.41
				0.35
				0.13
139				0.43
				0.01
				0.07
				0.29
				0.91
				0.19
				0.43
				0.06
				0.07
				0.53

В общей сложности вся библиотека соединений может быть разбита на три кластера (рисунок 15). К первому кластеру относятся соединения, содержащие в своей структуре замещенные арилы, во втором кластере находится соединение, содержащее нафталин-1-ильную группу, а в третьем те соединения, в чьей структуре содержатся алкильные заместители.



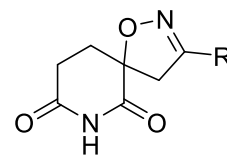
- 044:** R = 2,3-Hal
069: R = 2,3,4-OMe
070, 113, 163, 174: R = 2-Hal
087: R = 3-NO₂
088: R = 4-NO₂
098: R = 2-OMe
099: R = 4-OMe
114: R = 3-Cl
116: R = 2,3,4-Me
139: R = 2-NO₂
160: R = 3,4-Cl
161: R = 2,6-Cl
162: R = 2,4-Cl
205: R = CO₂Me

Cluster index: 1
Cluster size: 17



115

Cluster index: 2
Cluster size: 1



- 118:** R = C₆H₁₁
119: R = 3-C₅H₁₁
144: R = *t*-Bu
145: R = C₅H₉
147: R = C₄H₉

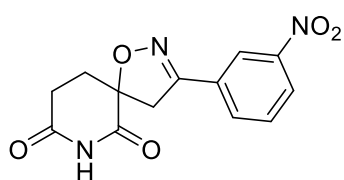
Cluster index: 3
Cluster size: 5

Рисунок 15 – Кластеры исследуемых соединений

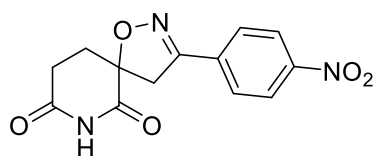
К первому кластеру относятся соединения **044-114, 116, 139, 160-205**, чей диапазон значений липофильности составляет 1,23–3,13. Во втором кластере находятся соединения **115**, чье значение липофильности составляет 2,53. К третьему кластеру относятся соединения **118, 119, 144-147**; диапазон значений липофильности данного кластера составляет 0,87–1,87.

Все полученные значения соответствуют правилу Липински ($\log P < 5$). Помимо этого, можно отметить, что на значения липофильности также влияет расположение заместителей (соединения **087, 088, 139; 160-162**). Плюс к этому, видна закономерность при наличии у арильного фрагмента в одном положении заместителей различной природы: электронодонорные заместители имеют большее значение липофильности, чем соединения с электроноакцепторными группами (соединения **088, 099; 098, 139**).

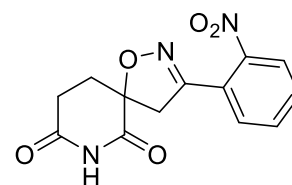
Структуры данных соединений и значения их липофильности представлены на рисунке 16.



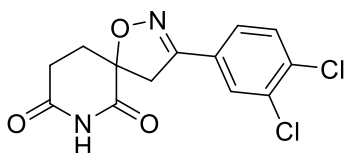
087; $\log P_{o/w} = 1.58$



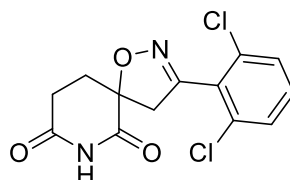
088; $\log P_{o/w} = 1.71$



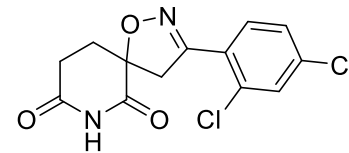
139; $\log P_{o/w} = 1.23$



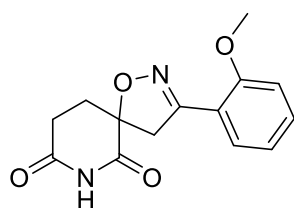
160; $\log P_{o/w} = 3.13$



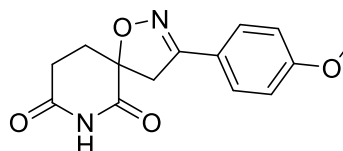
161; $\log P_{o/w} = 1.96$



162; $\log P_{o/w} = 2.68$



098; $\log P_{o/w} = 2.22$



099; $\log P_{o/w} = 1.96$

Рисунок 16 – Влияние заместителей

Проанализировав полученные результаты, представленные в таблице 4, можно сделать вывод о том, что в целом экспериментальные данные сопоставимы с расчетными. Однако полностью заменять экспериментальное определение теоретическими расчетами не стоит. Расчеты с помощью специализированных компьютерных программ следует применять в качестве предварительной оценки липофильности, для исключения неподходящих соединений на начальных этапах разработки лекарственных препаратов, с последующим подкреплением экспериментальными данными.

Подводя итоги, можно сказать, что данные соединения соответствуют лекарству для перорального введения по показателю липофильности, основываясь на правило Липински и рекомендуются к дальнейшим исследованиям.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Реагенты использовались коммерчески доступные, без дополнительной очистки.

- Нитрит натрия, х.ч.;
- Нафталин, х. ч.;
- 2-бутанон, х. ч.;
- Ацетофенон, 99.9 %;
- Бензол, х. ч.;
- Ацетанилид, х. ч.;
- П-нитроанилин, х.ч.;
- Дифениламин, х.ч.;
- Метанол для ОФ ВЭЖХ, 99.9 %;
- Вода дистиллированная;
- Жидкостный хроматограф фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC;
- Микрошприц Agilent объёмом 50 мкл;
- Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
- Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (100x4.6 мм), с размером частиц 5 мкм

3.2 Методика проведения эксперимента

Исследования проводили на жидкостном хроматографе фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC с хроматографической колонкой (неподвижная фаза) Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 4,6 ×100 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол – вода в различных

соотношениях: 85 : 15, 80 : 20, 75 : 25, 70 : 30, 65 : 45 (об. %). Опыты проводили при комнатной температуре, расход элюента составляет 1 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волн УФ – детектора, равной 254 нм. По экспериментальным данным был проведён расчёт факторов удерживания (k) исследуемых объектов и соответственно $\log k$. В качестве несорбирующегося вещества был использован нитрит натрия (NaNO_2).

3.3 Определение значения фактора удерживания

Фактор удерживания был рассчитан по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (10)$$

где t_R – время удерживания исследуемых соединений, с;

t_M – время удерживания несорбирующегося соединения (NaNO_2), с.

Для каждого из изучаемых соединений рассчитаны факторы удерживания k , а также $\log k$ при всех исследуемых соотношениях метанол–вода (таблица 5).

Таблица 5 – Рассчитанные величины логарифма фактора удерживания для исследуемых соединений при различных соотношениях метанол-вода.

Исследуемое соединение	Значение $\log k$				
044	-				

Продолжение таблицы 5.

Исследуемое соединение	Значение <i>logk</i>				
113					
114					
115					
139					

3.4 Расчет физико-химических свойств *in silico*

Все *in silico* расчеты физико-химических свойств исследуемых соединений в рамках выполненной выпускной квалификационной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2023-1 на рабочей станции MacBook Air 2020, снабженной процессором Apple M1 (8 ядер, тактовая частота до 3.2 ГГц) под управлением macOS Ventura 13.3.1

Соединения были подготовлены с применением модуля LigPrep [76]: определены и минимизированы трехмерные структуры с учетом конфигурации обоих изомеров, спрогнозировано состояние протонирования при физиологическом $\text{pH} = 7 \pm 2$ с помощью алгоритма Epik [77]. Модуль QikProp [74, 75] использовался для предсказания физико-химических свойств.

Заключение

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Проведен обзор соответствующей литературы, представлены классические способы определения липофильности, как одной из составляющих ADME характеристик. Данный показатель предсказывает растворимость соединений, что является важным требованием при разработке фармацевтической продукции.

2. Методом ОФ ВЭЖХ определены значения логарифмов факторов удерживания производных фталимида при различных объемных соотношениях подвижной фазы.

3. По полученным результатам рассчитаны значения факторов удерживания, экстраполированные на нулевое содержание метанола в подвижной фазе.

4. Выведено уравнение зависимости логарифма коэффициента распределения от логарифма фактора удерживания при нулевом содержании метанола: $\log P_{o/w} = 0,9729 \log(k_0) + 0,5454$

5. Были рассчитаны значения липофильности *in silico* для новых лигандов цереблona. Было выявлено, что в целом полученные экспериментальные данные сопоставимы с расчетными, что позволяет сделать вывод о применимости данного метода для расчета липофильности в отношении производных фталимида.

6. Соединения, содержащие в фенильном фрагменте заместители в *para*-положении обладают большим значением липофильности, в следствие большей гидрофобной поверхности. Производные глутаримида с алкильными заместителями имеют меньшие значения липофильности, что позволит оптимизировать их, с большей вероятностью получения итоговой молекулы PROTAC со значением липофильности <5.

Список используемой литературы

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. // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2001. – Vol. 98. – №. 15. – P. 8554–8559.
2. 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 // Cell Chem. Biol. – 2018. – Vol. 25. – №1. – P. 1-11.
3. Cantrill C. Fundamental aspects of DMPK optimization of targeted protein degraders. / C. Cantrill., P. Chaturvedi., C. Rynn., J. P. Schaffland et al // Drug Discov. Today – 2020. – Vol. 24. – №6. – P. 969-982.
4. Li X., Song Y. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy // Journal of Hematology & Oncology. – 2020. – V. 13. – №. 1.
5. Paiva S. L., Crews C. M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design // Current opinion in chemical biology. – 2019. – V. 50. – P. 111-119.
6. Lipinski C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution / C. A. Lipinski // Drug Discov. Today Technol. – 2004. – Vol. 1. – №4. – P. 337-341.
7. Edmondson S. D. Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) in ‘Beyond Rule-of-Five’ chemical space: recent progress and future challenges / S. D. Edmondson, B. Yang, C. Fallan // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2019 – Vol. 29. – №13. – P. 1555-1564.
8. Zhu C. L. Structure-based rational design enables efficient discovery of a new selective and potent AKT PROTAC degrader / C. L. Zhu, X. Luo, Z. Rao et al // Eur. J. Med. Chem. – 2022 – Vol. 235. – P. 114459.

9. Salami J. Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance / J. Salami, S. Alabi, R. R. Willard et al // *Commun. Biol.* – 2018. – Vol. 1. – P. 1-9.

10. Fisher S. L. Targeted protein degradation and the enzymology of degraders / S. L Fisher, A. J Phillips // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2018 – Vol. 44. – P. 47-55.

11. Bai L. A. Potent and selective small-molecule degrader of STAT3 achieves complete tumor regression *In Vivo* / L. Bai., H. Zhou., R. Xu et al // *Cancer Cell* – 2019 – Vol. 36. – №5. – P. 498-511.

12. Winter G. E. DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. / G. E. Winter, D. L. Buckley, J. Paulk et al // *Science* – 2019. – Vol. 348. – № 6241. – P. 1376-1381.

13. Nunes J. Targeting IRAK4 for degradation with PROTACs / J. Nunes, A. McGonagle, J. Eden et al // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2019. – Vol. 10. – №7. – P. 1081-1085.

14. Kerns E. H. Drug-like properties: Concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization / E. H. Kerns, L. Di // 2008, P. 56-58

15. Han X. Discovery of ARD-69 as a highly potent Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer / X. Han, C. Wang, C. Qin et al // *J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 62. – №2. – P. 941-964.

16. Mares A. Extended pharmacodynamic responses observed upon PROTAC-mediated degradation of RIPK2 / A. Mares, A. H. Miah., I. E. D. Smith et al // *Commun. Biol.* – 2020 – Vol. 3. – №1.

17. Pike A. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective. / A. Pike, B. Williamson, S. Harlfinger et al // *Drug Discov. Today* – 2020. – Vol. 25. – №10. – P. 1793-1800.

18. Goracci L. Understanding the metabolism of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs): The next step toward pharmaceutical applications / L. Goracci, J. Desantis, A. Valeri et al // *J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 63. – №20. – P. 11615-11638.
19. Klein V. G. Understanding and improving the membrane permeability of VH032-Based PROTACs / V. G. Klein, C. E. Townsend, A. Testa et al // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 30. – №9. – P. 1732-1738.
20. Zeng M. Exploring targeted degradation strategy for oncogenic KRAS^{G12C} / M. Zeng, Y. Xiong, N. Safaee et al // *Cell Chem. Biol.* – 2020. – Vol. 27. – №1. – P. 19-31.
21. Atilaw Y. Solution conformations shed light on PROTAC cell permeability / Y. Atilaw, V. Poongavanam, C. Nilsson et al // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2020. – Vol. 12. – №1. – P. 107-114.
22. Cecchini, C. Linkers as game-changers in PROTAC technology: emphasizing general trends in PROTAC pharmacokinetics for their rational design / C. Cecchini, S. Tardy, L. Scapozza // *Chimia* – 2022. – Vol. 76. – №4. – P. 341-345.
23. Klein V. G. Amide-to-Ester substitution as a strategy for optimizing PROTAC permeability and cellular activity / V. G. Klein, A. G. Bond, C. Craigon, R. S. Lokey, A. Ciulli, // *J. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 64. – №24. – P. 18082-18101.
24. Neklesa T. ARV-110: An androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer / T. Neklesa, L.B. Snyder, R.R. Willard et al // *J. Clin. Oncol.* – 2019. – Vol. 37. – №. 7. – P. 259.
25. Flanagan F.F. ARV-471, an oral estrogen receptor PROTAC degrader for breast cancer / F.F. Flanagan, Y. Qian, S.M. Gough et al. // *Cancer Research.* – 2018. – Vol. 79. – №. 4.
26. Lebraud H. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras. / H. Lebraud, D.J. Wright, C.N. Johnson, T.D. Heightman // *ACS Cent. Sci.* – 2016. – Vol. 2. – №12. – P. 927-934

27. Reynders M. PHOTACs enable optical control of protein degradation. / M. Reynders, B. S. Matsuura, A. Marzio et al // *Sci. Adv.* – 2020. – Vol. 6 – № 8. – eaay5064
28. Waring M. Lipophilicity in drug discovery/ M. J. Waring // *Expert opin. drug discov.* – 2010. – Vol. 5. – №3. – P. 235–248.
29. Arnott A. J. The influence of lipophilicity in drug discovery and design / A. J. Arnott, S. L. Planey // *Expert opin. drug discov.* – 2012. – Vol. 7. – №10. – P. 863-875.
30. Wenlock M. A method for measuring the lipophilicity of compounds in mixtures of 10 / M. C. Wenlock, T. Potter, P. Barton, R. P. Austin // *J. Biomol. Screen.* – 2011. – Vol. 16. – №3. – P. 348-353.
31. ГОСТ 32381-2013 Межгосударственный стандарт. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение коэффициента распределения в системе н-октанол/вода методом встряхивания колбы. Издательство стандартов
32. Benhaim D. Characterization of ascentis RP-Amide column: lipophilicity measurement and linear solvation energy relationships / D. Benhaim, E. Grushka // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – Vol. 1217. – №1. – P.65-74.
33. Valko K. L. Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery / K. L. Valko // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – Vol. 130. – P. 35-54
34. Liang. C. Recent advances in lipophilicity measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography / C. Liang., H. Lian // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 2015. – Vol. 68. – P. 28-36
35. Constantinescu T. Lipophilicity as a central component of drug-like properties of chalcones and flavonoid derivatives / T. Constantinescu, C. N. Lungu, I. Lung // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – №. 8. – P. 1505.
36. Abbas N.S. Simple TLC-spectrodensitometric method for studying lipophilicity and quantitative analysis of hypoglycemic drugs in their binary mixture.

/ N. S. Abbas, Y. A. S. Mohamed, S. M. Derayea, M. A. Omar, G. A. Saleh // Biomed. Chromatogr. – 2021. – Vol. 35. – №11. – e5154

37. Giaginis C. Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. / C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. – 2007. – Vol. 31. – P. 79–96.

38. Barzanti C. Potentiometric determination of octanol–water and liposome–water partition coefficients (logP) of ionizable organic compounds / C. Banzarti, R. Evans, J. Fouquet et al // Tetrahedron Lett. – 2007. – Vol. 48. – №. 19. – P. 3337–3341.

39. Metzger M. B. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance / M. B. Metzger, V. A. Hristova, A. M. Weissman // J. Cell Sci. – 2012. – Vol. 125. – №. 3. P. 531–537.

40. Capili A. D. Structure of the C-terminal RING finger from a RING-IBR-RING/TRIAD motif reveals a novel zinc-binding domain distinct from a RING / A. D. Capili, E. Edghill, K. Wu, K. Borden // J. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 340. – №. 5. P. 1117–1129.

41. Zheng, N. Structure of a c-Cbl–UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin–protein ligases. / N. Zheng, P. Wang, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich // Cell – 2000. – Vol. 102. – №4. – P. 533–539.

42. Buetow L. Activation of a primed RING E3-E2–ubiquitin complex by non-covalent ubiquitin. / L. Buetow, M. Gabrielsen, H. Dou et al // Mol. Cell – 2015. – Vol. 58. – №2. – P. 297–310

43. Plechanovova A. Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4. / A. Plechanovova, E. G. Jaffray, R. T. Hay // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 18. – №9. – P. 1052–1059

44. Mace P. D. Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment. / P. D. Mace, K. Linke, J. Silke // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283. – № 46. – P. 31633–31640

45. Ohi M. D. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. / M. D. Ohi, C. W. Vander Kooi, J. A. Rosenberg, W. J. Chazin, K. L. Gould // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – Vol. 10. – №4. – P. 250–255
46. Zheng N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation / N. Zheng, N. Shabek // *Annu. Rev. Biochem.* – 2017. – Vol. 86. – №. 1. – P. 129–157.
47. Moynihan T. P. The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-AP1. / T. P. Moynihan, S. A. Rose, H. C. Ardley et al // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – №. 1. – P. 30963–30968
48. Wenzel D. UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. / D. M. Wenzel, A. Lissounov, P. S. Brzovic, R. E. Klevit // *Nature.* – 2011. – Vol. 474. – №7349. – P. 105–108.
49. Ashton C. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm / C. Ashton, M. Craig // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2017. – Vol. 16. – № 2. – P. 101-114
50. Sherbet G. Therapeutic potential of thalidomide and its analogues in the treatment of cancer / G. Sherbet // *Anticancer Research.* – 2015. – Vol 35. – №. 11
51. Miller M. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review. / M. Miller, K. Strömmland, L. Ventura et al // *Int. J. Dev. Neurosci* – 2005. – Vol. 23. – №2-3. – P. 201–219.
52. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. / N. Vargesson // *Birth. Defects. Res. C. Embryo Today* – 2015. – Vol. 105. – №2. – P. 140–156.
53. Lopez-Girona A. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. / A. Lopez-Girona, D. Mendy, T. Ito et al // *Leukemia* – 2012. – Vol. 26. – №11. – P. 2326–2335.

54. Ito T. Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives. / T. Ito, H. Handa // Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. – 2020. – Vol. 96 – №6. – P. 189–203.

55. Бессмельцев С.С. Эффективность и переносимость помалидомида у больных с рецидивирующими/рефрактерными формами множественной миеломы / С. С. Бессмельцев // Вестник гематологии. – 2017. – Том 3. – №4.

56. Shi Q. Cereblon: A protein crucial to the multiple functions of immunomodulatory drugs as well as cell metabolism and disease generation. / Q. Shi, L. Chen // J. Immunol. Res. – 2017. – P. 1–8.

57. Ren C. Structure-based discovery of SIAIS001 as an oral bioavailability ALK degrader constructed from Alectinib / C. Ren, N. Sun, Y. Kong et al // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – Vol. 6 – № 8. – P. 113335-11351

58. Jiang X. PROTACs suppression of GSK-3 β , a crucial kinase in neurodegenerative diseases / X. Jiang, J. Zhou, Y. Wang et al // Eur. J. Med. Chem. – 2021. – Vol. 210. – P. 112949-112984

59. Konstantinidou M. The tale of proteolysis targeting chimeras (PROTACs) for leucinerich repeat kinase 2 (LRRK2) / M. Konstantinidou, A. Oun, P. Pathak et al // Chem. Med. Chem. – 2021. – Vol. 16. - №6. – P. 959-965

60. Hong J. Y. Simultaneous Inhibition of SIRT2 deacetylase and defatty-acylase activities via a PROTAC strategy / J. Y. Hong, H. Jing, I. R. Price et al // ACS Med. Chem. Lett. – 2020. – Vol. 11. - №11. – P. 2305-2311

61. 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. – e45457.

62. Ballatore C. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders / C. Ballatore, V. M-Y Lee, J. Q. Trojanowski // Nat. Rev. Neurosci. – 2007. – Vol. 8. - №9. – P. 663-672

63. Huang D. A new synthesis route for the preparation of pomalidomide. / D. Huang, C. Shen, W. Wang, L. Huang, F. Ni, J. Li // Synthetic Communications. – 2016. – Vol. 46. – №16. – P. 1343-1348

64. Zhou B. Discovery of a small-molecule degrader of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins with picomolar cellular potencies and capable of achieving tumor regression. / B. Zhou, J. Hu, F. Xu et al // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 61. – № 2 – P. 462-481.

65. Wu H. Development of multi-functional histone deacetylase 6 degraders with potent anti-myeloma activity. / H. Wu, K. Yang, Z. Zhang et al // *J. Med. Chem.* – 2019. – Vol. 62. – № 15 – P. 7042-7057

66. Tornøe C. W. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides / C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal // *J. Org. Chem.* – 2002. – Vol. 67. – №9. – P. 3057–3064.

67. Rostovtsev V. V. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes / V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2002. – Vol. 41. – №14. – P. 2596–2599.

68. Varala R. A practical and efficient synthesis of thalidomide via Na/Liquid NH₃ methodology / R. Varala, S. R. Adapa // *Org. Process. Res. Dev.* – 2005. – Vol. 9. – №6. – P. 853–856.

69. Capitosti S. M. Facile synthesis of an azido-labeled thalidomide analogue. / S. M. Capitosti, T. P. Hansen, M. L. Brown // *Org. Lett.* – 2003. – Vol. 5 – № 16. – P. 2865–2867.

70. Robb C. M. Chemically induced degradation of CDK9 by a proteolysis targeting chimera (PROTAC). / C. M. Robb, J. I. Conteras, S. Kour et al // *Chem. Commun.* – 2017. – Vol. 53 – № 54. – P. 7577-7580

71. Hoffmann M. Absorption, metabolism and excretion of [14C]pomalidomide in humans following oral administration. / M. Hoffmann, C. Kasserra, J. Reyes // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 71. – № 2. – P. 489-501.

72. Ponomaryov Y. Scalable and green process for the synthesis of anticancer drug lenalidomide / Y. Ponomaryov, V. Krasikova, A. Lebedev et al // Chem. Heteroc. Comp. – 2015. – Vol. 51. – P. 133-138

73. Hansen J. D. CC-90009: A Cereblon E3 Ligase Modulating Drug That Promotes Selective Degradation of GSPT1 for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia / J. D. Hansen, M. Correa, M. Nage et al // J. Med. Chem. – 2021. – Vol. 64. – № 4. – P. 1835-1843

74. Duffy E. M. Prediction of properties from simulations: free energies of solvation in hexadecane, octanol, and water / E. M. Duffy, W. L. Jorgensen // J. Am. Chem. Soc. – 2000. – Vol. 122. – P. 2878-2888.

75. Duffy E. M. Prediction of drug solubility from Monte Carlo simulations / E. M. Duffy, W. L. Jorgensen // Bioorg. Med. Chem. Let. – 2000. – Vol. 10. – №11. – P. 1155-1158.

76. Sastry G. M. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments / G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day et al // J. Comput. Aided Mol. Des. – 2013. – Vol. 27 – №3. – P. 221-234

77. Shelley J. C. Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules / J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye // J. Comput. Aided Mol. Des. – 2007. – Vol. 21 – №12. – P. 681-691

Приложение А

Графики зависимостей фактора удерживания исследуемых соединений от доли метанола в подвижной фазе

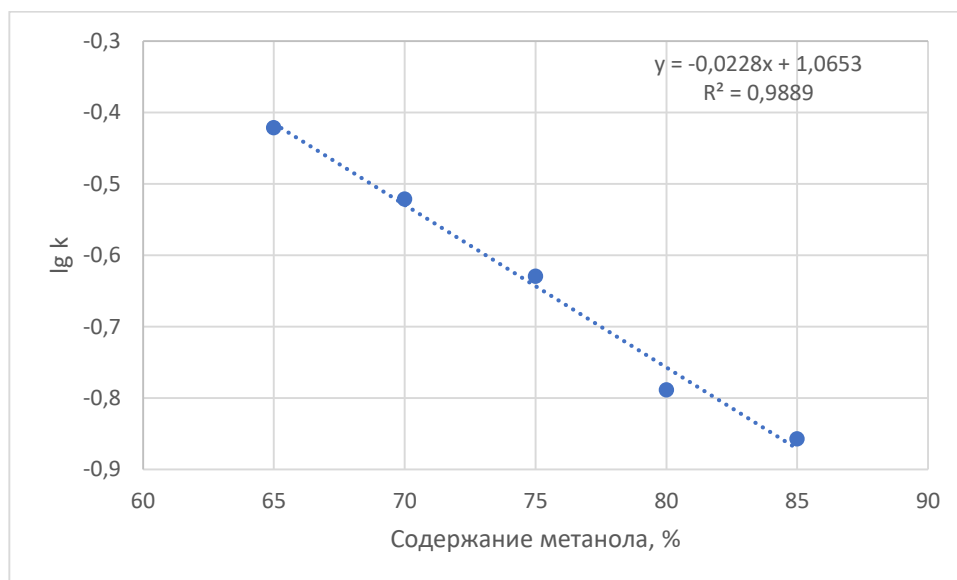


Рисунок А1 — Зависимость фактора удерживания 087 от доли метанола в составе подвижной фазы

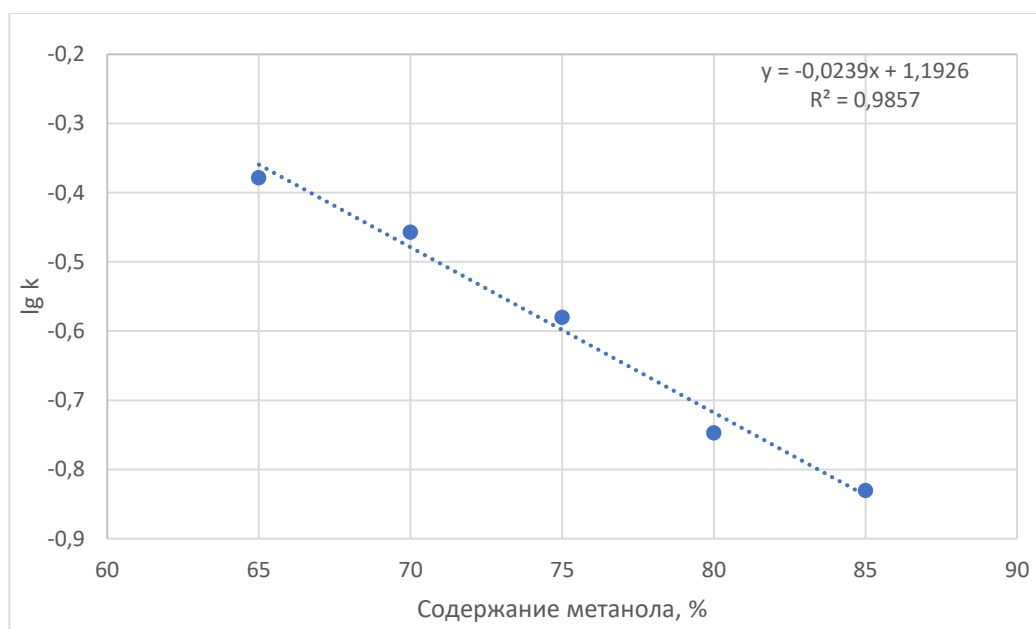


Рисунок А2 — Зависимость фактора удерживания 088 от доли метанола в составе подвижной фазы

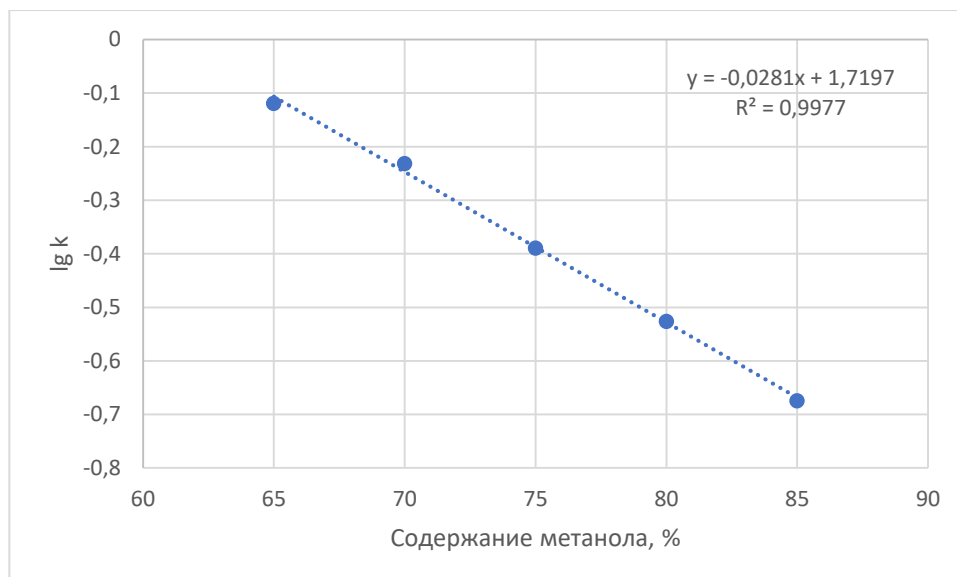


Рисунок А3 – Зависимость фактора удерживания 098 от доли метанола в составе подвижной фазы

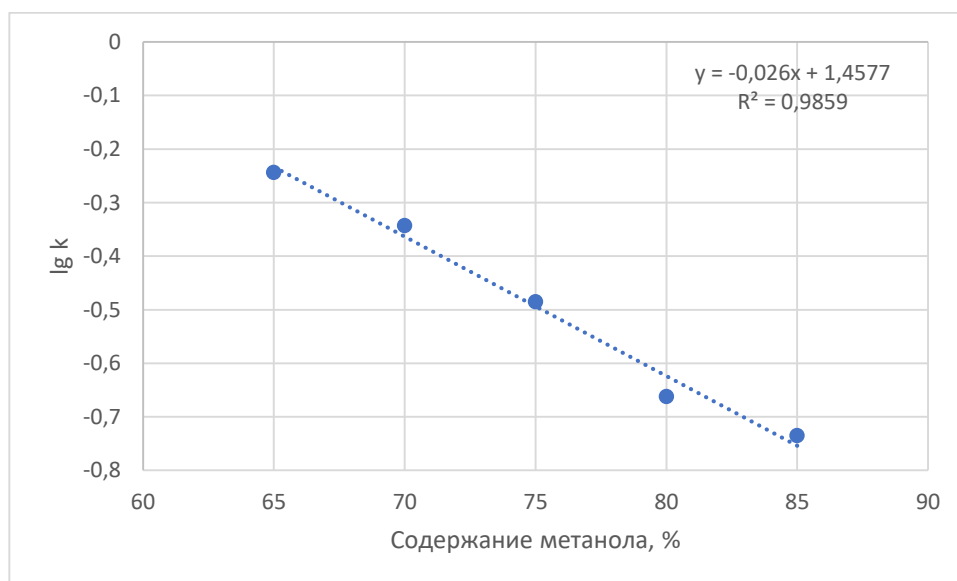


Рисунок А4 – Зависимость фактора удерживания 099 от доли метанола в составе подвижной фазы

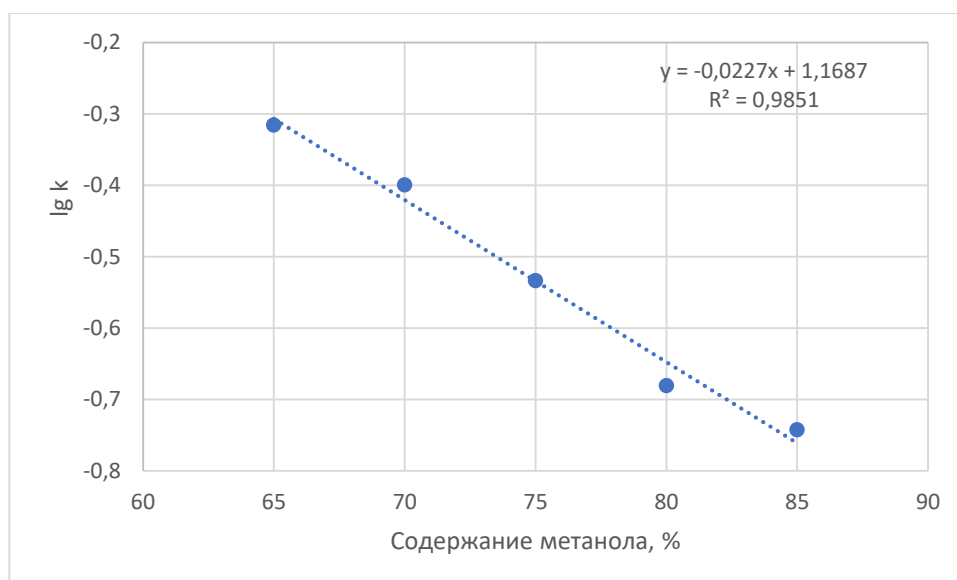


Рисунок А5 – Зависимость фактора удерживания 113 от доли метанола в составе подвижной фазы

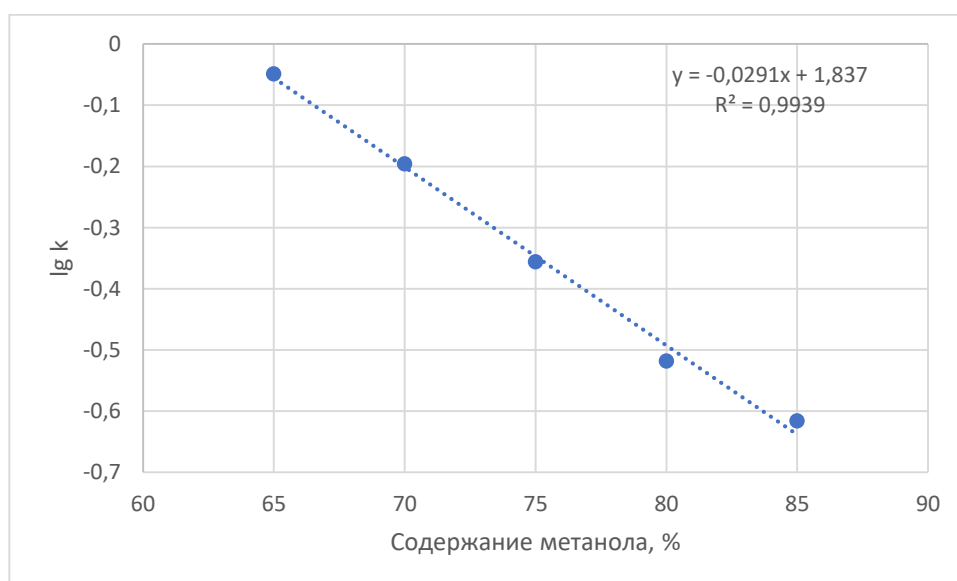


Рисунок А6 – Зависимость фактора удерживания 114 от доли метанола в составе подвижной фазы

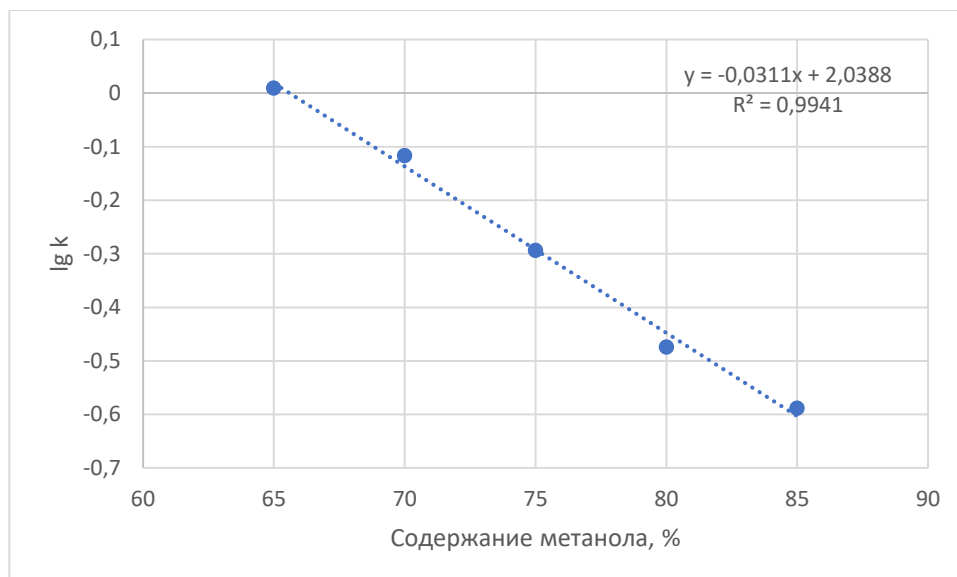


Рисунок А7 – Зависимость фактора удерживания 115 от доли метанола в составе подвижной фазы

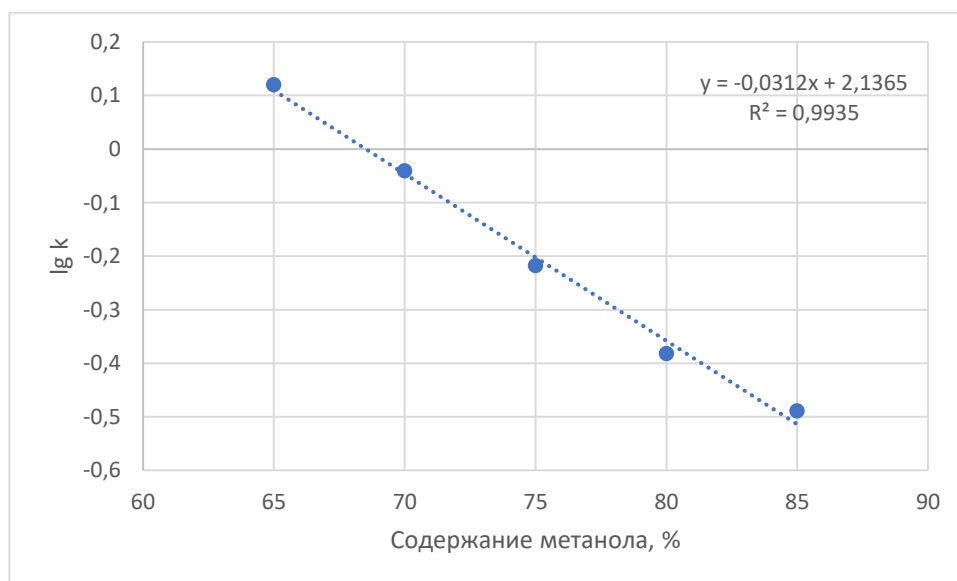


Рисунок А8 – Зависимость фактора удерживания 116 от доли метанола в составе подвижной фазы

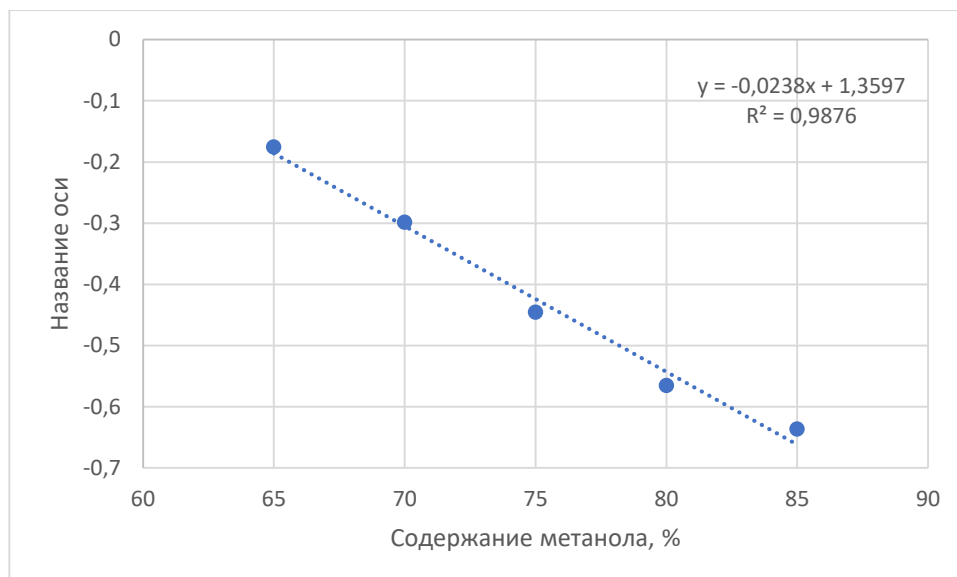


Рисунок А9 – Зависимость фактора удерживания 118 от доли метанола в составе подвижной фазы

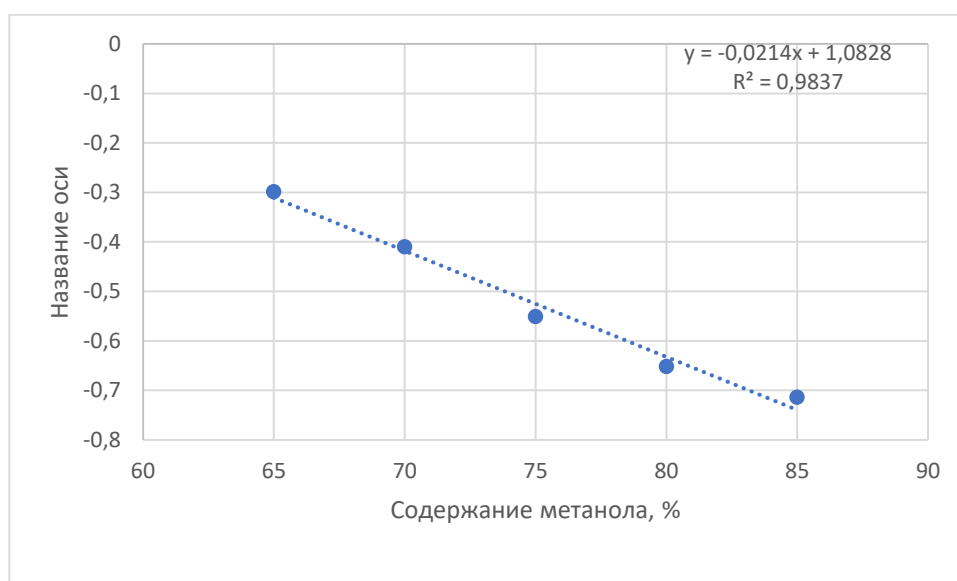


Рисунок А10 – Зависимость фактора удерживания 119 от доли метанола в составе подвижной фазы

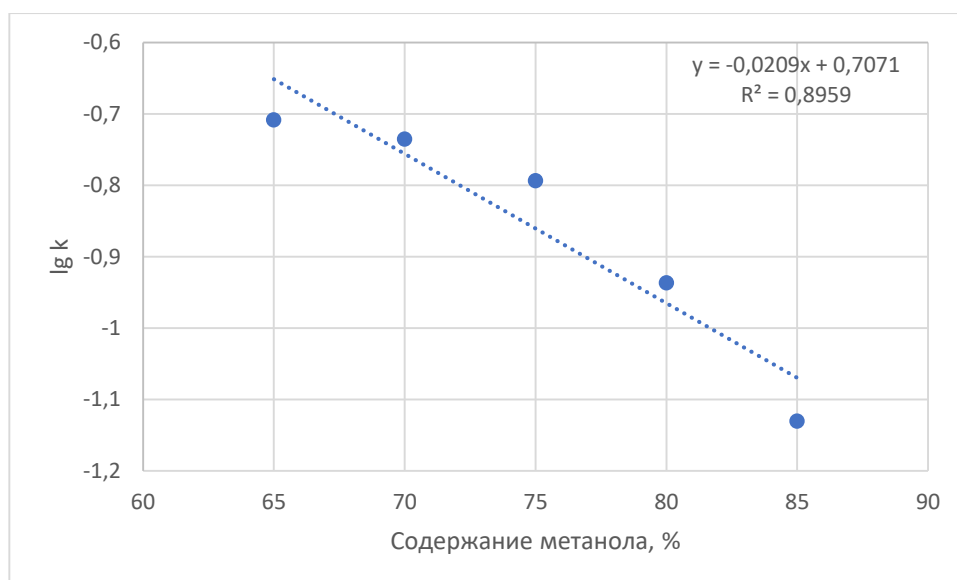


Рисунок A11 – Зависимость фактора удерживания 139 от доли метанола в составе подвижной фазы

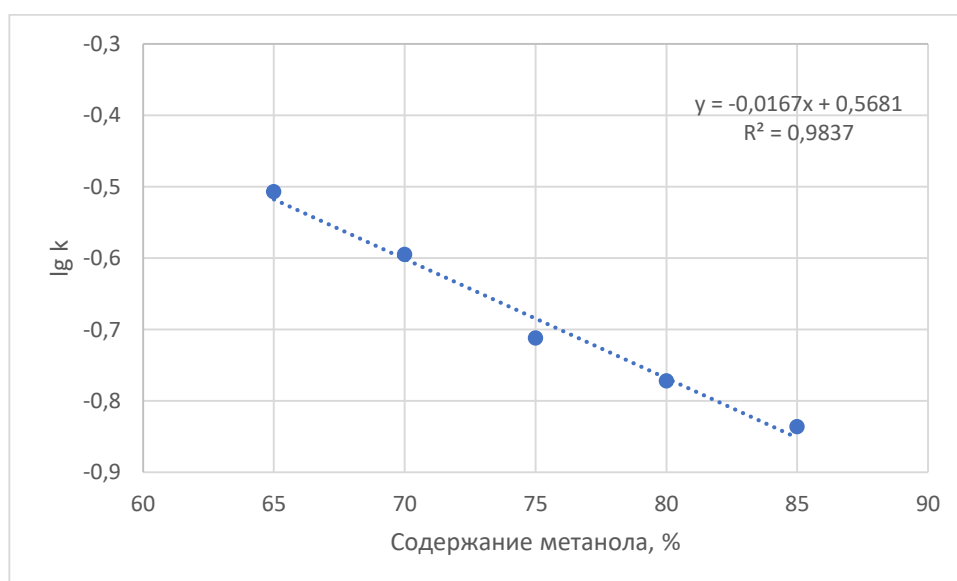


Рисунок A12 – Зависимость фактора удерживания 144 от доли метанола в составе подвижной фазы

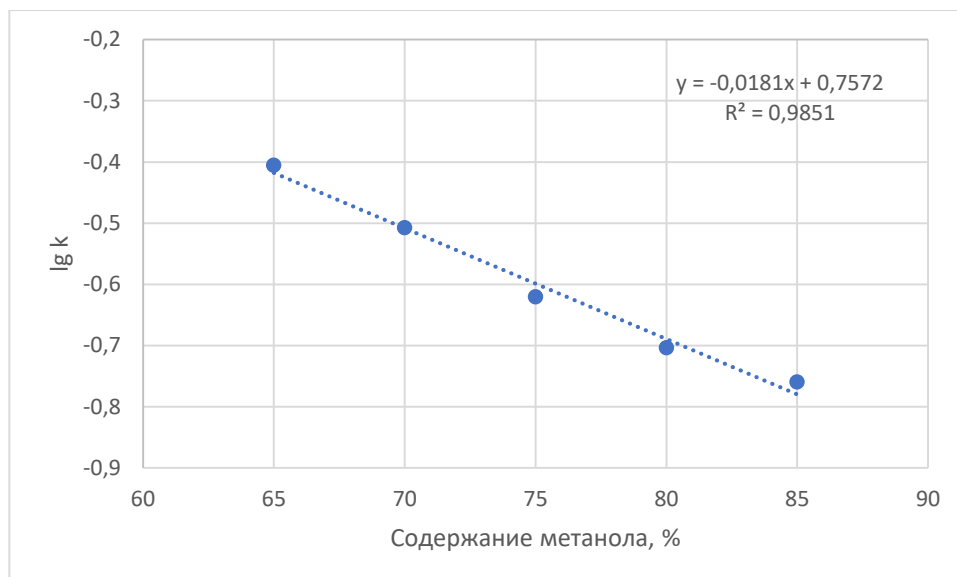


Рисунок А13 – Зависимость фактора удерживания 145 от доли метанола в составе подвижной фазы

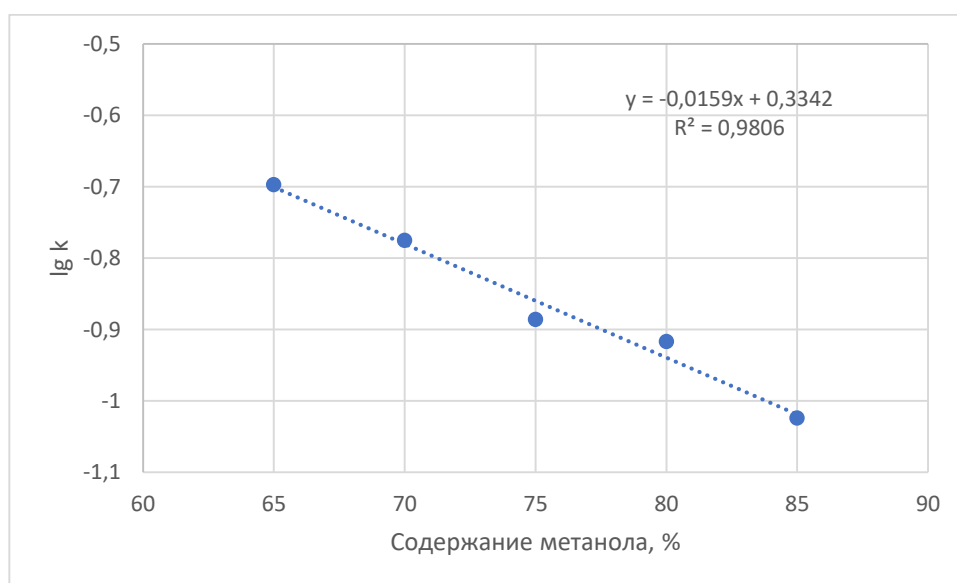


Рисунок А14 – Зависимость фактора удерживания 147 от доли метанола в составе подвижной фазы

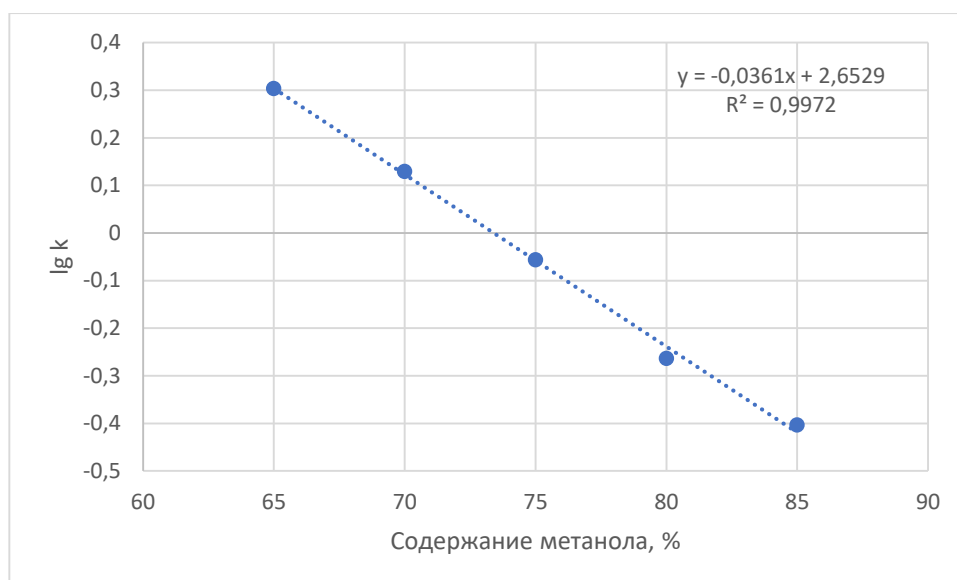


Рисунок А15 – Зависимость фактора удерживания 160 от доли метанола в составе подвижной фазы

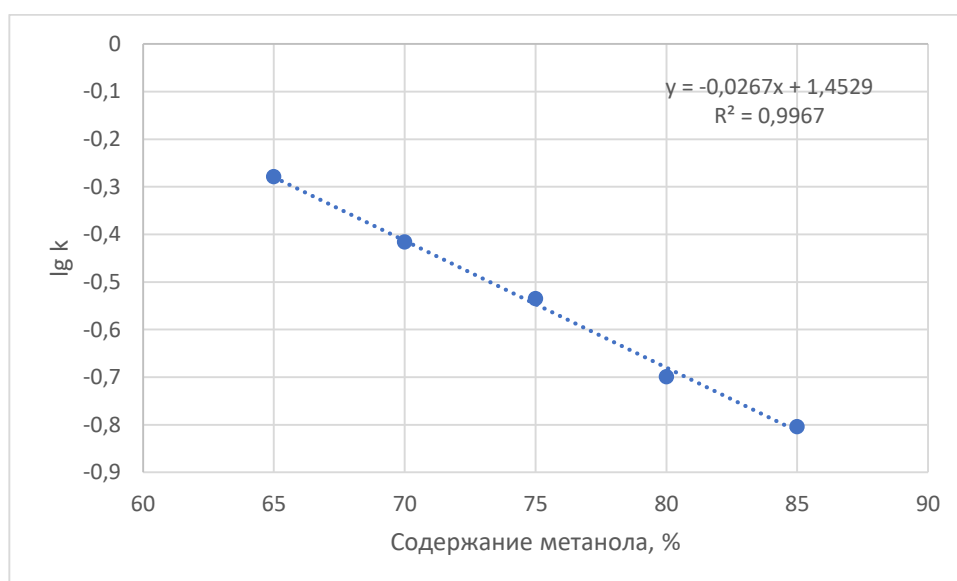


Рисунок А16 – Зависимость фактора удерживания 161 от доли метанола в составе подвижной фазы

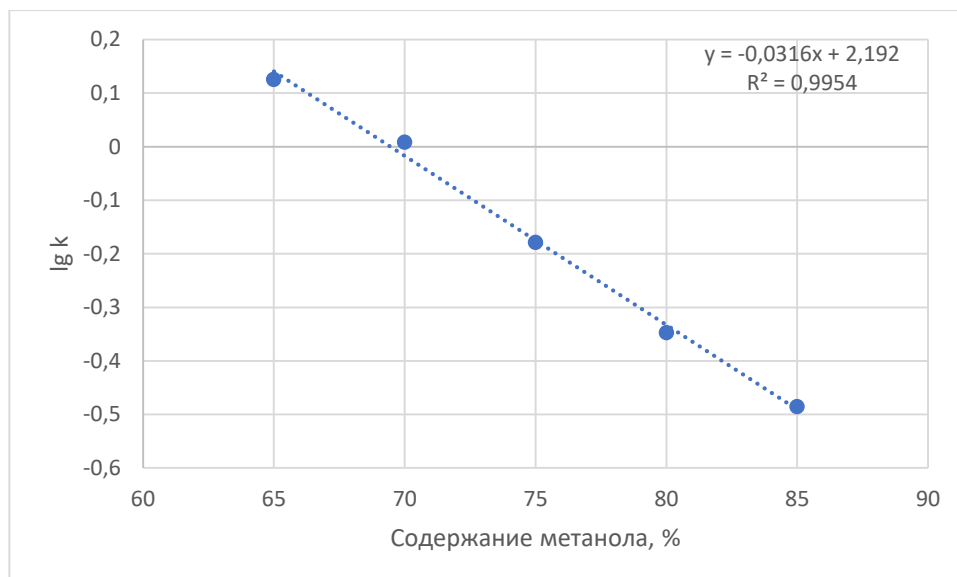


Рисунок А17 – Зависимость фактора удерживания 162 от доли метанола в составе подвижной фазы

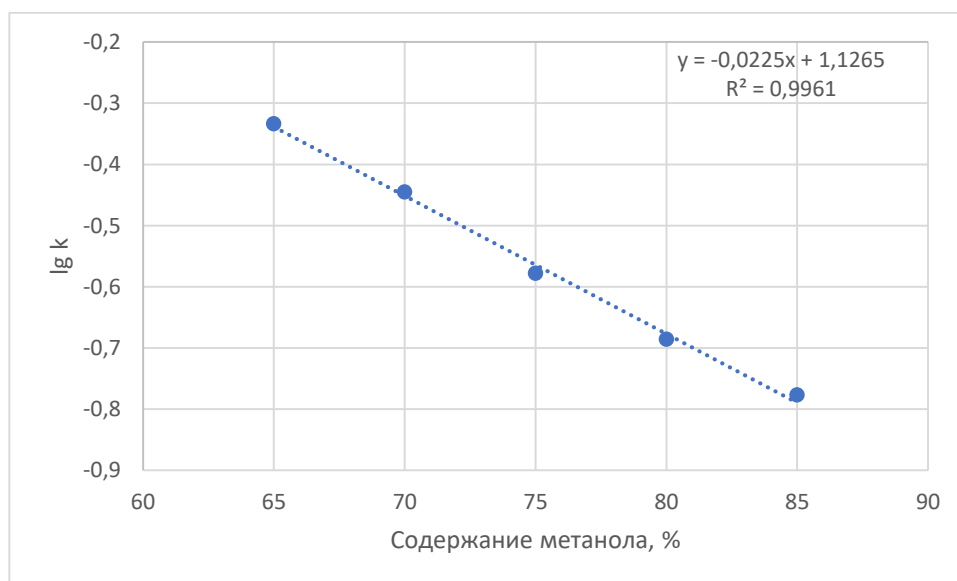


Рисунок А18 – Зависимость фактора удерживания 163 от доли метанола в составе подвижной фазы

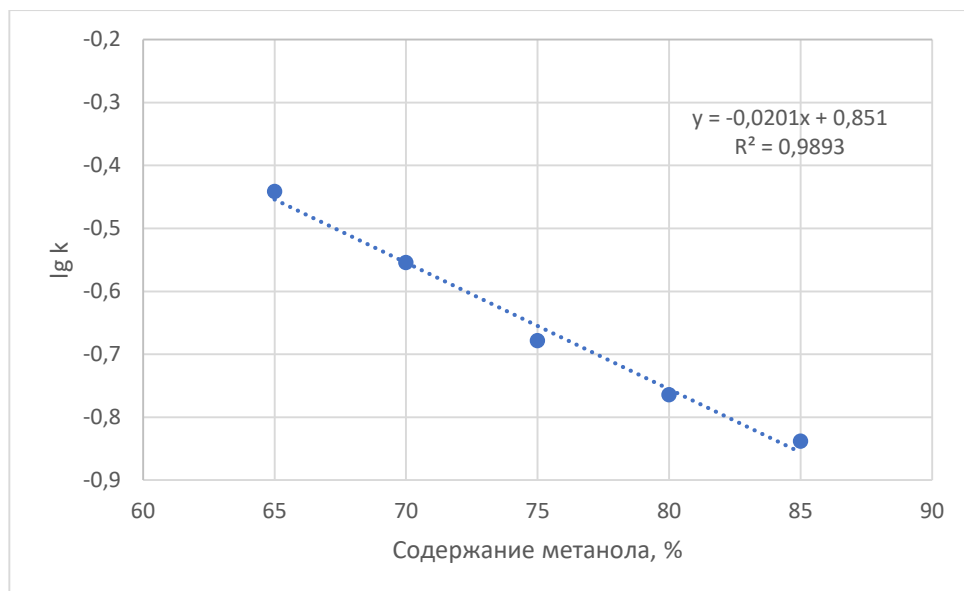


Рисунок А19 – Зависимость фактора удерживания 174 от доли метанола в составе подвижной фазы

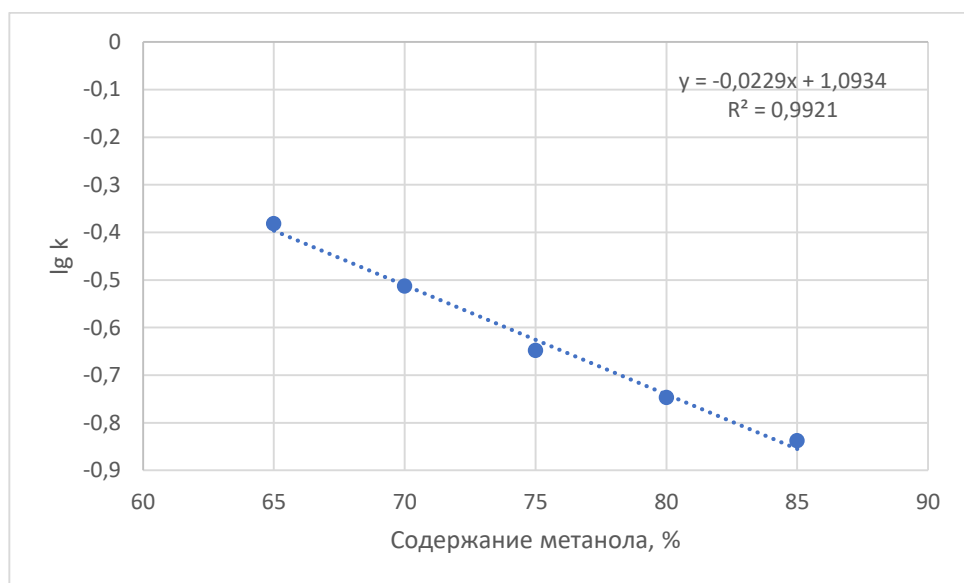


Рисунок А20 – Зависимость фактора удерживания 205 от доли метанола в составе подвижной фазы

Приложение Б

Физико-химические свойства, рассчитанные *in silico*

Таблица Б1 – Физико-химические свойства, рассчитанные *in silico* (R изомеры)

Код	S _A	F _D	P _L	V _o	QPlogP _{o/w}	QPlogS, моль/дм ³	QPPCaco, нм/с	HumOralAbsorb	P _o	P _s
	484.067	109.788	133.364	822.894	2.018	-3.904	429.108	3	85.877	93.211
	561.092	353.584	64.362	1001.094	1.755	-3.542	434.961	3	84.447	115.205
		106.098	161.643	824.809				3	85.036	94.671
		110.191	140.005	841.761				3	60.850	139.032
		109.546	138.898	840.038				3	60.766	139.069
		202.028	154.040	851.004				3	83.247	99.253
		202.809	143.419	843.795				3	82.033	102.182
		107.450	162.374	816.539				3	84.558	94.326
		110.317	151.406	813.006				3	83.531	94.061
		110.909	266.749	900.012				3	88.098	92.797
								3	87.263	93.036
								3	83.203	93.980
								3	83.904	94.769

Продолжение таблицы Б1

Код	S Å ²	F Å ²	P Å ²	V Å ³	QPlogP _{o/w}	QPlogS, моль/дм ³	QPPCaco, нм/с	HumOralAbsorb	P %	P %
		104.256	156.607	834.366				3	65.292	136.311
								3	80.710	93.786
								3	81.085	94.060
								3	79.861	95.384
		110.269	113.499	853.370				3	86.438	94.057
		105.401	133.496	841.467				3	87.123	95.374
		109.579	118.857	850.919				3	87.759	92.532
		109.561	166.390	806.729				3	84.517	92.530
		109.788	173.417	780.757				3	81.637	93.241
								3	69.866	130.453

SASA (англ. Solvent accessible surface area) – площадь поверхности соединения, доступная для растворителя, Å²; FOSA -- гидрофобный компонент SASA, Å²; PISA – полярный компонент SASA, Å²; volume – полный объем соединения, доступный для растворителя, Å³; QPlogP_{o/w} – предсказанное значение коэффициента распределения в системе *n*-октанол/вода; QPlogS – предсказанное значение растворимости, моль/дм³; QPPCaco – предсказанное значение кишечной проницаемости на модели клеток Caco-2, нм/с; HumOralAbsorb – количественная оценка перорального поглощения соединения, 1 – плохое, 2 – среднее, 3 – хорошее; PercentHumOralAbsorb – предсказанное значение перорального поглощения соединения, %.

Таблица Б2 – Физико-химические свойства, рассчитанные *in silico* (S изомеры)

Код	S	F	P	V	QPlogP _{o/w}	QPlogS, моль/дм ³	QPPCaco, нм/с	HumOralAbsorb	P	P
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		

Продолжение таблицы Б2

Код	S	F	P	V	Q _{PlogP_{o/w}}	Q _{PlogS} , моль/дм ³	Q _{PPCaco} , нм/с	HumOralAbsorb	P	P
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		
								3		

