

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 Растворимость, липофильность и клеточная проницаемость биоизостерных аналогов талидомида и деградеров на их основе

Обучающийся

Д. С. Леванова

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

к. х. н., О.Б. Григорьева

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

Консультант

Р. Э. Гасанов

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

Аннотация

Бакалаврская работа изложена на 54 страницах, состоит из введения, трех глав, 18 рисунков, 12 таблиц, заключения, списка из 50 источников, включая зарубежные источники.

Целью бакалаврской работы является исследование растворимости, липофильности и кишечной проницаемости помалидомида, биоизостера помалидомида – помалидомид-В, химерной молекулы, нацеленной на протеолиз, dВЕТ6 и его бензотриазольного аналога dВЕТ6-В.

Объектом бакалаврской работы являются глутаримидные производные: помалидомид, dВЕТ6 и их бензотриазольные аналоги помалидомид –В и dВЕТ6-В.

Предметом бакалаврской работы является изучение физико-химических свойств исследуемых соединений и их изменение при биоизостерной замене.

Бакалаврскую работу можно разделить на несколько логически связанных частей: обзор литературы, результаты и обсуждение, экспериментальная часть.

В первой части описаны технология направленного протеолиза, описание ADME-характеристик, их методы определения, а также комплекс E3-лигаза CRBN и его строение.

Во второй части описаны результаты исследований липофильности, растворимости и кишечной проницаемости исследуемых соединений.

Третья часть состоит из методологии проведения экспериментов.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что все исследуемые соединения можно рекомендовать для дальнейших исследований, они удовлетворяют правилу Липински. Дополнительно был проведен расчет *in silico*, но не все результаты согласуются с экспериментальными данными.

Abstract

The title of the graduation work is Solubility, lipophilicity and cell permeability of bioisosteric analogues of thalidomide and degraders based on them.

The graduation work consists of an introduction, three parts, 14 figures, 11 tables, a conclusion, the list of 50 references including foreign sources.

The aim of this graduation work is to investigate the solubility, lipophilicity and intestinal permeability of pomalidomide, a bioisoster of pomalidomide – pomalidomide-B, a chimeric molecule targeting proteolysis, dBET6 and its benzotriazole analogue dBET6-B.

The object of the senior thesis is the study of glutarimide derivatives: pomalidomide, dBET6 and their benzotriazole analogs pomalidomide-B and dBET6-B.

The subject of the thesis work is physicochemical properties of the studied compounds and their changes during bioisosteric replacement.

The graduation work may be divided into several logically connected parts which are literature review, results and their discussion and experimental part.

The first part describes the technology of directed proteolysis, the description of ADME-characteristics, their measurement methods and the E3-ligase CRBN complex and its structure.

The second part describes the results of lipophilicity, solubility and intestinal permeability studies of the investigated compounds.

The third part consists of the methodology of the experiments.

Based on the data obtained, it can be concluded that all the studied compounds can be recommended for further studies, they satisfy the Lipinski rule. An *in silico* calculation was also performed, but not all the results are consistent with the experimental data.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	5
Введение.....	6
1 Литературный обзор	7
1.1 Направленный протеолиз – новый взгляд на разработку лекарств	7
1.2 E3-лигаза CRBN и ее лиганды.....	11
1.3 ADMET – характеристики	16
1.4 Методы измерения.....	26
2 Результаты и их обсуждения.....	31
2.1 Определение концентрации исследуемых веществ	32
2.2 Определение липофильности веществ	37
2.3 Определение кинетической растворимости.....	40
2.4 Определение кишечной проницаемости	42
3 Экспериментальная часть.....	45
3.1 Реагенты и оборудование.....	45
3.2 Методика проведения эксперимента определение липофильности.....	46
3.3 Методика проведения эксперимента клеточной проницаемости	47
3.4 Методика проведения эксперимента кинетической растворимости	48
Заключение	49
Список используемой литературы	50

Определения, обозначения и сокращения

AB-MPS	Многопараметрическая оценочная функция
ACN	Ацетонитрил
BET	Семейство белков, состоящее из BRD2, BRD3, BRD4 и BRDT
BRD4	Бромдоменсодержащий белок 4
bRo5	За пределами правила пяти
BT-PROTAC	Бензотриазольный биоизостер dBET6
CK	казеинкиназа
CRBN	Цереблон
Cul	Куллин
dBET6	Деградер белков бромодомена BET
HBA	Акцептор водородной связи
HBD	Донор водородной связи
IKZF	Икарос
IMiDs	Иммуномодулирующие препараты
LPE	Показатель эффективности липофильной проницаемости
PAMPA	Анализ проницаемости искусственных мембран
PBS	Фосфатный буфер pH 7.4
POI	Белок интереса
PPV	Связывание с белками плазмы
PPI	Белок-белковые взаимодействия
PROTAC	Химерные молекулы, нацеленные на протеолиз
Ro5	Правило пяти
TPD	Направленная деградация белка
TPSA	Топологическая площадь полярной поверхности
UPS	Убиквитин-протеасомная система
VHL	Супрессор опухолей фон Гиппеля-Ландау
MM	Множественная миелома
ПЭГ	Полиэтиленгликоль

Введение

Лечение онкологических заболеваний может включать хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, иммунотерапию, а также гормонотерапию в зависимости от типа и стадии опухоли. Основным недостатком данных типов лечения является высокая вероятность развития лекарственной резистентности.

В настоящее время особое внимание уделяется химерным молекулам, нацеленным на протеолиз (PROTAC), которые избирательно разрушают целевые белки. В отличие от большинства низкомолекулярных ингибиторов, антагонистов и блокаторов, традиционно используемых в клинической практике, деградеры имеют уникальные преимущества. Однако, несмотря на их преимущества, у молекул есть ряд недостатков, а именно ADME-характеристики, которые сложно поддаются прогнозированию в контексте PROTAC. Скоординированная оптимизация этих взаимосвязанных параметров является важным условием для разработки эффективных и безопасных лекарственных препаратов.

Целью представленной работы является исследование растворимости, липофильности и кишечной проницаемости помалидомида, биоизостера помалидомида, химерной молекулы, нацеленной на протеолиз, dBET6 и его бензотриазольного аналога BT-PROTAC.

Обозначив цель данного исследования, были поставлены задачи, а именно:

- изучить физико-химические свойства помалидомида, биоизостерного лиганда, молекулы dBET6 и его бензотриазольного аналога;
- определить кинетическую растворимость и кишечную проницаемость методом Caco-2, а также липофильность методом ВЭЖХ;
- установить влияние биоизостерной замены на изменение ADMET-профиля по сравнению с dBET-6.

1 Литературный обзор

1.1 Направленный протеолиз – новый взгляд на разработку лекарств

Терапевтический подход к направленной деградации белка (TPD) нашёл широкое применение, благодаря его потенциально более эффективному воздействию на белки по сравнению с их ингибированием. Недавние достижения в биотехнологии и фармацевтике привели к разработке соединений PROTAC, демонстрирующих многообещающие клинические результаты. Технология предполагает образование тройного комплекса белок-деградер-лигаза, отвечающего за биологическую функцию, а именно за убиквитинирование и последующую протеасомную деградацию посредством UPS [1].

Помимо технологии PROTAC, также большое внимание уделяется молекулярным клеям. Молекулярные клеи опосредуют индуцированную близостью деградацию белков и обладают неотъемлемыми преимуществами перед гетеробифункциональными химерами, нацеленными на протеолиз. Молекулярные клеи имеют отличную биологическую активность и благоприятные физико-химические свойства. Первоначально классические молекулярные деградеры были идентифицированы случайно, но в настоящее время рациональные стратегии открытия и дизайна быстро развиваются [2].

1.1.1 Технология PROTAC

PROTAC (Proteolysis targeting chimeras) – химерные молекулы, нацеленные на протеолиз, привлекающие большое внимание, могут стать потенциальным способом лечения рака [3]. Молекулы способны разрушать белки-мишени с помощью убиквитин-протеасомной системы (UPS), что позволяет по-новому взглянуть на разработку лекарств для лечения злокачественных новообразований. Важно отметить, что PROTACs

превосходит традиционные терапевтические средства и доступные низкомолекулярные ингибиторы с точки зрения эффективности, тканевой и клеточной селективности и профиля побочных эффектов [4].

Молекула PROTAC состоит из трех ковалентно связанных фрагментов: 1) лиганд, для связывания белка-интереса (POI); 2) лиганд, для распознавания лигазы E3 (лиганд E3); линкера, для конъюгации двух лигандов (рисунок 1) [5].

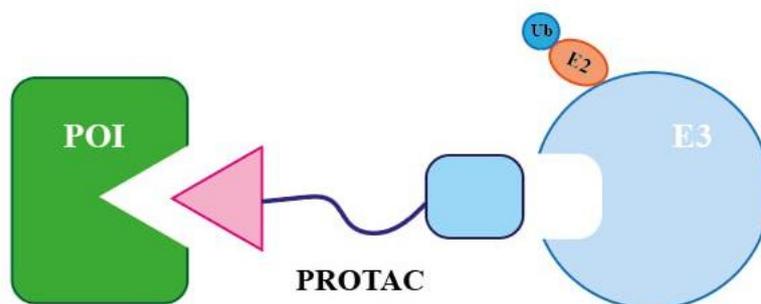


Рисунок 1 – Строение PROTAC

Основной механизм технологии PROTACs заключается в использовании убиквитин-протеасомной системы (UPS) для деградации белка-интереса (POI). Деградация целевого белка, опосредованная PROTAC, включает четыре основных этапа:

- 1) PROTAC связывается с белком интереса (POI) и лигазой E3, что приводит к образованию тройного комплекса (POI-PROTAC-E3);
- 2) лигаза E3 рекрутирует фермент E2 и опосредует перенос убиквитина (Ub) от фермента E2 к остаткам лизина на белок интереса (POI);
- 3) убиквитинирование происходит несколько раз с образованием цепочек мульти-Ub на поверхности целевого белка.
- 4) диссоциация тройного комплекса и разрушение полиубиквитинированного белка интереса (POI) 26S протеасомой.

В свою очередь, молекула PROTAC не расщепляется, а может способствовать деградации других белков [6] (рисунок 2).

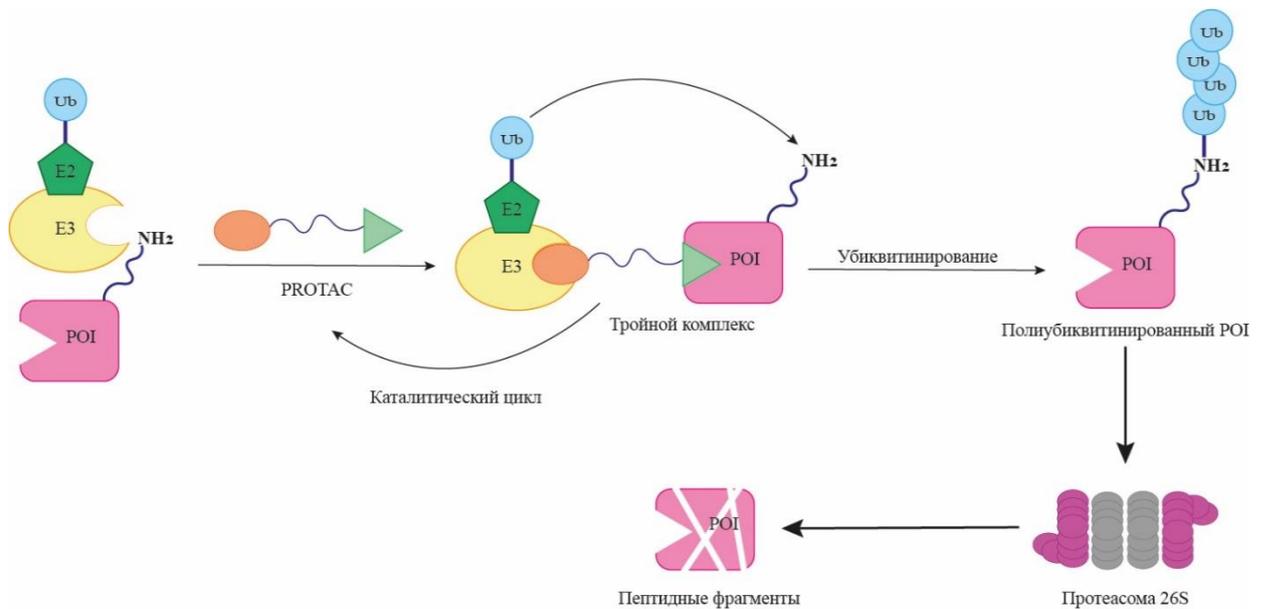


Рисунок 2 – PROTAC- опосредованная деградация белков-мишеней через UPS

В последнее десятилетие технология PROTAC привлекла большое внимание ученых в различных областях: от лечения рака до болезней двигательных нейронов [7]. Многие исследования показали, что деградация белка лучше, чем ингибирование его противораковой активности [8].

Рассматривая преимущества и недостатки молекул PROTAC, важно отметить их полное несоответствие эмпирическому правилу пяти Липински (bRo5) [9]. Согласно правилу, молекула должна иметь молекулярный вес не более 500 а.е.м., менее 5 доноров и 10 акцепторов водородной связи и коэффициент октанол-вода не более 5 [10].

Несмотря на такое отклонение, у молекул есть сильнейшие преимущества перед низкомолекулярными ингибиторами:

– возможность воздействия на неферментативные функции путем деградации целых белков. Традиционные низкомолекулярные препараты обычно действуют путем ингибирования ферментативной функции мишени и не оказывают влияния на неферментативную функцию, в то время как, молекулы PROTAC вызывают деградацию всего белка. Такая способность

имеет каталитический эффект и позволяет избежать применения высоких доз препарата;

– молекулы продемонстрировали особую восприимчивость к лекарственно-резистентным мишеням. Традиционные методы ингибирования часто не учитывают изменения в белках вследствие мутаций, которые приводят к повышению резистентности лекарственной формы, что решается подходом химерных молекул PROTAC, где для ингибирования не требуется связывание с мишенью;

– огромный потенциал в лечении лекарственно-устойчивых заболеваний;

– селективное воздействие на определенные белки.

По мере расширения исследований PROTAC начали проявляться и их ограничения. Их сложнее разработать, чем традиционные низкомолекулярные препараты, они с трудом деградируют некоторые типы белков, токсикология неясна, как и многие побочные эффекты. При пероральном приеме имеют низкую биодоступность. Огромное влияние на пониженную кишечную проницаемость оказывает их высокая молекулярная масса, большая площадь полярной поверхности и количество доноров водородной связи более 5 [11].

1.1.2 Технология молекулярного клея

Молекулярный клей – это малая молекула, вызывающая близость E3-лигазы и белка интереса (POI), позволяющая точно контролировать во времени различные биологические процессы (рисунок 3). Являясь химическими индукторами близости, молекулярные клеи способствуют димеризации или колокализации двух белков через образование тройного комплекса, что приводит к различным биологическим или фармакологическим функциям. Концепция «молекулярного клея» впервые была введена в начале 1990-х годов [12].

Молекулярные клеи-деградеры вызывают или стабилизируют белок-белковые взаимодействия (PPI) между убиквитин-лигазой и белком интереса,

что приводит к убиквитинированию белка и последующей деградации протеасомой.

С точки зрения механизма действия, молекулярные деградеры стимулируют убиквитинирование и деградацию мишени субстехиометрическим и каталитическим образом. Они позволяют подвергать деградации ранее недоступные или не поддающиеся деградации белки-мишени. Молекулярный клей не требует наличия связывающего кармана на белке интереса, они вызывают или усиливают взаимодействие между рецептором и белком интереса, которые обычно не взаимодействуют напрямую [13].



Рисунок 3 –Технология молекулярного клея

1.2 E3-лигаза CRBN и ее лиганды

Убиквитин-протеасомная протеолитическая система – это важный эндогенный путь деградации белка, обеспечивающий очистку поврежденных или сверхэкспрессированных белков и поддержание нормального уровня белка в клетках. В этом пути E3-лигазы отвечают за убиквитинирование нижестоящих белков [14].

Цереблон (CRBN) является субстратным рецептором E3-убиквитин-лигазы CUL4-RBX1-DDB1-CRBN (CRL4 CRBN) (рисунок 4), а также прямой

мишенью для талидомида и иммуномодулирующих препаратов (IMiDs) при множественной миеломе (ММ) и других гематологических злокачественных опухолях [15]. Размер CRBN составляет примерно 200 кДа, а домен CBD содержит сайт ориентации ионов цинка, координирующий аминокислоты [16].

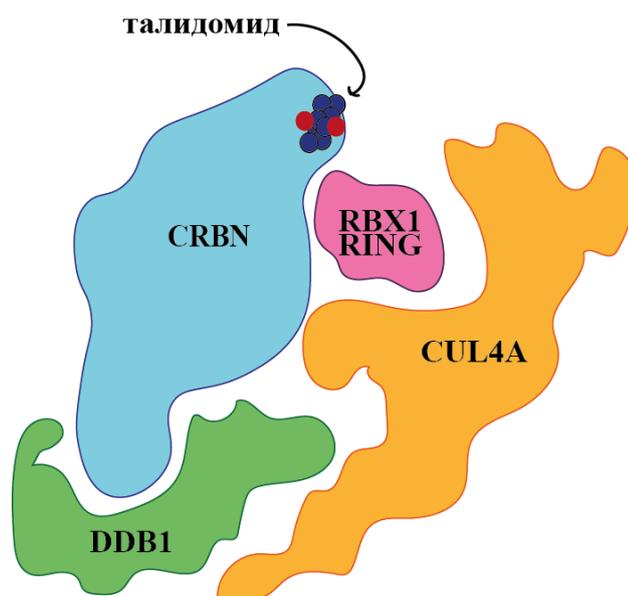


Рисунок 4 – Строение E3-убиквитин-лигазы CUL4-RBX1-DDB1-CRBN (CRL4 CRBN)

В этом комплексе куллин (Cul4) является каркасным белком, он может быть представлен двумя изоформами Cul4A или Cul4B, обладающими высокой гомологией (рисунок 5). Функцию адаптера между E3-лигазой и Cul4 выполняет белок DDB1.

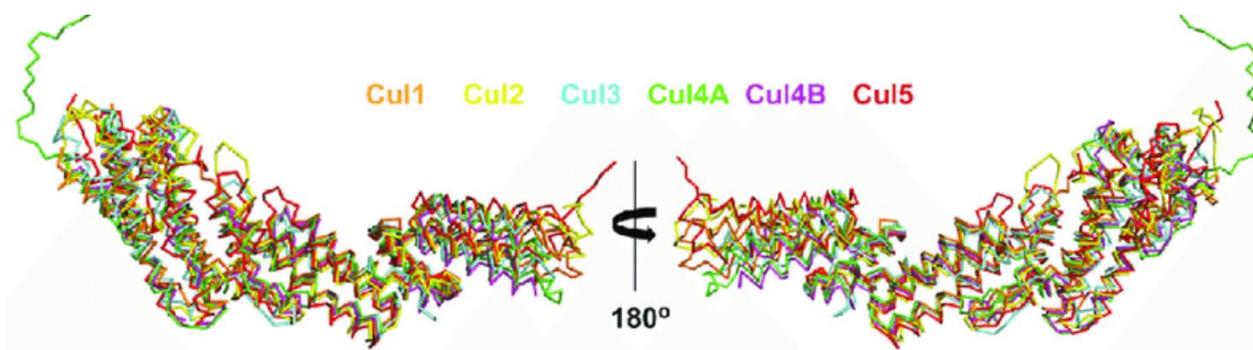


Рисунок 5 – Наложение кристаллических структур белков семейства Cullin

Лиганды CRBN являются наиболее часто используемыми для конструирования PROTAC, благодаря ряду преимуществ:

- 1) специфическое, сильное, биофизически подтвержденное средство связывания с их целевыми E3-лигазами;
- 2) приемлемые физико-химические характеристики, такие как молекулярная масса, растворимость, липофильность;
- 3) хорошо охарактеризованная структурная информация о режимах связывания.

Условно лиганды можно поделить на две группы: талимидоподобные и неталимидоподобные, стоит отметить, что первая группа более насыщена запатентованными препаратами.

Талимидоподобными лигандами цереблona являются талидомид **1** и его аналоги помалидомид **2** и леналидомид **3** (рисунок 6).

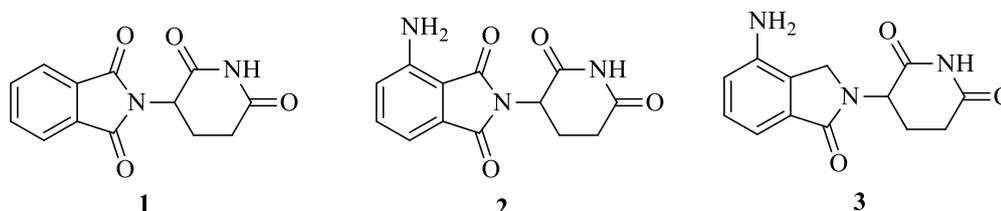


Рисунок 6 – Талимидоподобные лиганды цереблona

В 1950-х годах Грюнеталем был разработан талидомид, используемый в качестве седативного средства от утренней тошноты у беременных женщин. Однако в начале 1960-х годов, талидомид был изъят с рынка из-за выраженного тетрагенного действия. Позже данное явление было названо «талидомидной трагедией» [17]. После этого талидомид был широко изучен и модифицирован для лечения узловатой лепрозной эритемы и множественной миеломы.

На основе талидомида были разработаны леналидомид и помалидомид – новое поколение иммуномодулирующих препаратов (IMiD), обладающих хорошей активностью.

В настоящее время талидомид, леналидомид и помалидомид являются одобренными препаратами. Талидомид одобрен для лечения ряда видов рака (включая множественную миелому), реакции «трансплантат против хозяина» и проказы. Помалидомид разрешен к использованию для лечения множественной миеломы. Леналидомид используется в клинике для лечения ММ, однако также используется для лечения анемии у пациентов с миелодиспластическим синдромом, вызванным аномальной хромосомой.

Механизм воздействия IMiDs на заболевания напоминает эндогенный убиквитин-протеасомный протеолитический путь. Сначала под действием IMiDs активируется E3-убиквитин-лигаза CRL4CRBN, затем E3-убиквитин-лигаза рекрутирует нижележащие белки-субстраты, такие как IKZF1/IKZF3 и Sk1- α [18], и маркирует их убиквитином. Наконец, эти белки с убиквитиновой меткой распознаются и деградируют под действием 26S протеасомы. Цинковый транскрипционный фактор IKZF1/ IKZF3 играет важную роль в дифференцировке клеток крови, а также в пролиферации, метастазировании и прогрессии опухолевых клеток [19].

Авторы статьи [20] привели экспериментальные данные физико-химических свойств помалидомида, леналидомида и талидомида, приведенных в таблице 1.

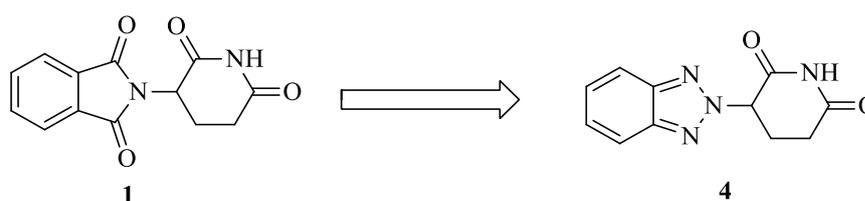
Таблица 1 – экспериментальные физико-химические данные IMiD

	Талидомид	Помалидомид	Леналидомид
MW	258	273	259
cLogP	0.3	0.2	-0.5
Caco-2 (10^{-6} cm/s)	35.6 ± 1.6 (0.9)*	24.9 ± 2.0 (1.1)*	1.45 ± 0.05 (1.7)*
kinetic solubility (μ M)	345 ± 47	78 ± 17	461 ± 47
human plasma $T_{1/2}$ (min)	22	159	284

* В скобках указано отношение базолатеральной к апикальной кажущейся проницаемости

Появление молекул PROTAC требует открытия новых лигандов для рекрутирования лигаз E3. Традиционные иммуномодулирующие препараты связываются с церебллоном, субстратным рецептором лигазы CRL4A CRBN E3. Авторы статьи [21] разработали аналог талидомида **1**, в котором фталимидный фрагмент заменен бензотриазолом. По сравнению с талидомидом полученный «бензотриазолоталидомид» **4** имеет аналогичный способ связывания, но улучшенные свойства (схема 1).

Схема 1



Способ связывания талидомида **1** включает водородную связь между одной из карбонильных групп фталимида и консервативным остатком аспарагина в белке, что способствует повышению сродства между двумя молекулами. Однако другая фталимидная карбонильная группа не участвует в специфических взаимодействиях, даже с молекулами воды, и, таким образом, представляет собой ненасыщенную полярную группу,

потенциально снижающую энергию связывания. Авторы статьи предположили, что замена фталимидного ядра на бензотриазол устранил возможность образования водородных связей с аспарагином, а также избавит молекулу от ненасыщенной карбонильной группы.

Соединение **4** не цитотоксично по отношению к линиям клеток множественной миеломы (в концентрации до 250 мкМ) и сохраняет большую популяцию живых клеток в экспериментах по индукции апоптоза.

1.3 ADMET – характеристики

За последние два десятилетия были открыты и разработаны многие мощные и эффективные химерные деструкторы, нацеленные на протеолиз (PROTAC). Достижение хорошей пероральной доступности PROTAC является одной из самых больших проблем, так как молекулы «выходят за пределы правила 5» (bRo5) для низкомолекулярных препаратов из-за их высокой молекулярной массы и других плохих физико-химических свойств.

Эффективные и безопасные препараты должны обладать точно подобранной комбинацией фармакодинамических и фармакокинетических свойств, включая высокую эффективность, сродство и селективность в отношении интересующей мишени, а также адекватную абсорбцию, распределение, метаболизм, выведение и переносимую токсичность (ADMET). Скоординированная оптимизация этих взаимосвязанных параметров является еще одним препятствием в исследованиях и разработке лекарственных препаратов.

Авторы статьи [22] суммировали необходимые физико-химические свойства перорально-доступных молекул PROTAC, включающих в себя лиганды CRBN. Исходя из этого, можно сделать вывод, что чем ближе физико-химические свойства молекул к принципу «правила пяти», тем лучше фармакокинетические свойства.

Таблица 2 – Параметры физико-химических свойств PROTACs

Молекула PROTAC	MW, kDa	CLogP	TPSA, Å ²	HBD	HBA	nRotB
ARV-110	794	4.2	180	2	10	11
ARV-471	724	6.8	96	2	5	7
ARD-2128	820	6.9	155	2	8	14
ARD-2585	763	4.8	149	2	8	10
AZ-B	803	3.6	199	4	10	16

MW- молекулярная масса; CLogP- коэффициент распределения октанол-вода; TPSA- топологическая площадь полярной поверхности; HBD- количество доноров водородной связи; HBA- количество акцепторов водородной связи; nRotB- количество вращающихся связей.

На рисунке 7 представлены структуры молекул, для которых была проведена оценка физико-химических параметров.

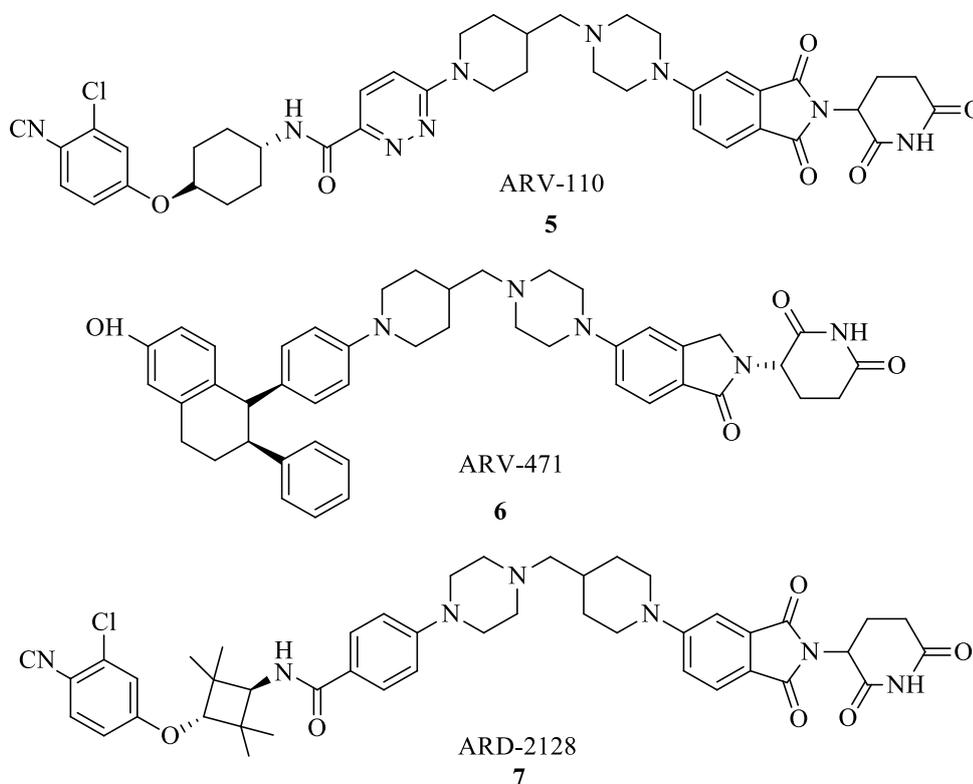
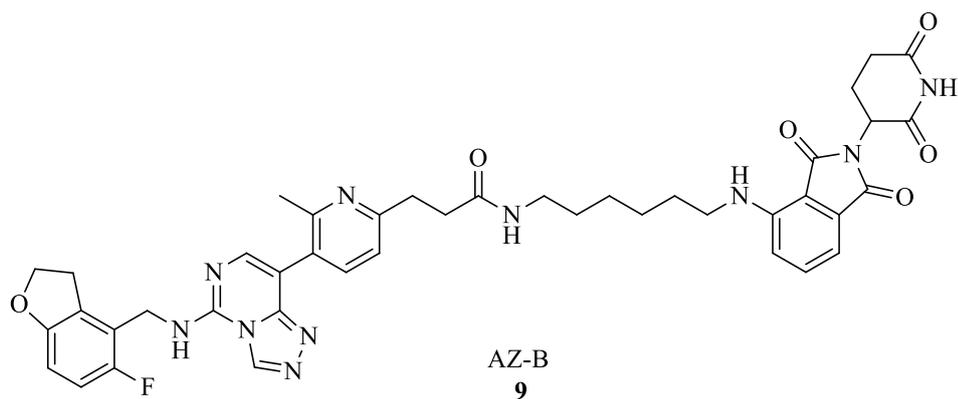
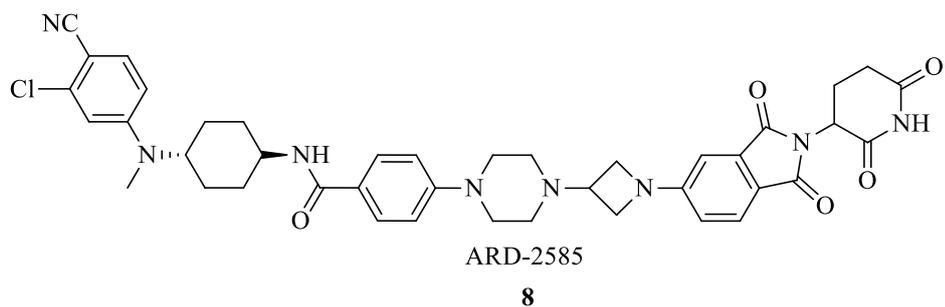


Рисунок 7 – Перорально-доступные химерные молекулы, нацеленные на протеолиз

Продолжение рисунка 7



Для достижения хорошей пероральной доступности необходимо использовать более короткие и жёсткие линкеры, включающие в свой состав как можно меньше ароматических колец.

1.3.1 Абсорбция

В последние годы появился ряд лекарственных препаратов, находящихся за пределами правила пяти Липински. Несмотря на эти нарушения, многие из этих соединений демонстрируют достаточную пероральную доступность для дальнейшей разработки в качестве пероральных препаратов. При низком уровне печеночного и кишечного метаболизма пероральная доступность зависит от абсорбированной фракции препарата.

Абсорбция относится к процессу, посредством которого лекарственное средство попадает в кровоток из места его введения. Часто предполагается, что этот термин относится к всасыванию из желудочно-кишечного тракта после перорального приема, поскольку является предпочтительным путём

введения, лекарственное средство должно проходить через клеточные мембраны на пути в кровоток.

Стало необходимым создать дескрипторы, которые могли бы предсказать абсорбцию препарата. Несколько групп учёных проанализировали различные наборы соединений, выходящих за правило пяти.

В 2015 году Doak и др. собрали несколько из верхних границ ключевых дескрипторов, первоначально описанных Липински. Несколько групп соединений продемонстрировали, что соединения находящиеся в этом пространстве, могут проявлять пероральную абсорбцию, а после попытались связать их с различными свойствами *in silico*.

Комплексный показатель был описан Degoeu и др. Метрика АВ-MPS, которая может быть рассчитана с использованием cLogD (коэффициент распределения, используемый в расчёте липофильности), числа ароматических колец (nAr) и числа вращающихся связей (nRotB) по формуле 1:

$$AB - MPS = |(cLogD - 3) + nAr + nRotB| \quad (1)$$

Наиболее высокая вероятность абсорбции достигается при наименьшем показателе АВ-MPS. При значении ≤ 14 наиболее вероятна наилучшая пероральная абсорбция [23].

1.3.2 Растворимость

Согласно официальному определению *International Union of Pure and Applied Chemistry* (англ. IUPAC), растворимость – это аналитический состав насыщенного раствора, выраженный в виде доли определенного растворенного вещества в определенном растворителе. Данный параметр играет решающую роль в разработке перорально доступных лекарственных средств [24].

Низкая растворимость негативно влияет на абсорбцию и биодоступность соединений после перорального приема, а также может привести к ошибочным значениям результатов *in vitro* тестов во время разработки лекарств, что затрудняет процесс выявления потенциально активных соединений. Минимальная растворимость, которой должно обладать лекарственное средство, строго зависит от его проницаемости и дозировки. Высокопроницаемые соединения могут обладать меньшей растворимостью для достижения максимальной перорально доступной абсорбции [25].

В контексте дизайна молекул PROTAC, имеющих высокую молекулярную массу и низкую проницаемость, на ранних этапах разработки стоит учитывать растворимость, так как данный параметр имеет решающее значение для достижения высокой эффективности и пероральной доступности.

Одним из оптимальных путей оптимизации растворимости являются химические модификации линкеров. Так, замена традиционных алкильных и полиэтиленгликолевых (ПЭГ) молекул на пиперидины или пиперазины в линкере значительно улучшают растворимость.

Авторы статьи [26] разработали молекулу PROTAC **10**, содержащую PEG-линкер, однако его неудовлетворительные физико-химические параметры не позволяли использовать его в качестве молекулы *in vivo*. Дальнейшая оптимизация молекулы, а именно модификация линкера и замена точки присоединения, продемонстрировала увеличение растворимости и уменьшение липофильности соединения **11** (схема 2). Физико-химические параметры соединений **10** и **11** приведены в таблице 3.

Стоит отметить, что большим недостатком использования жестких линкеров, а именно гетероциклических соединений, является негативное влияние на биологическую активность деградера.

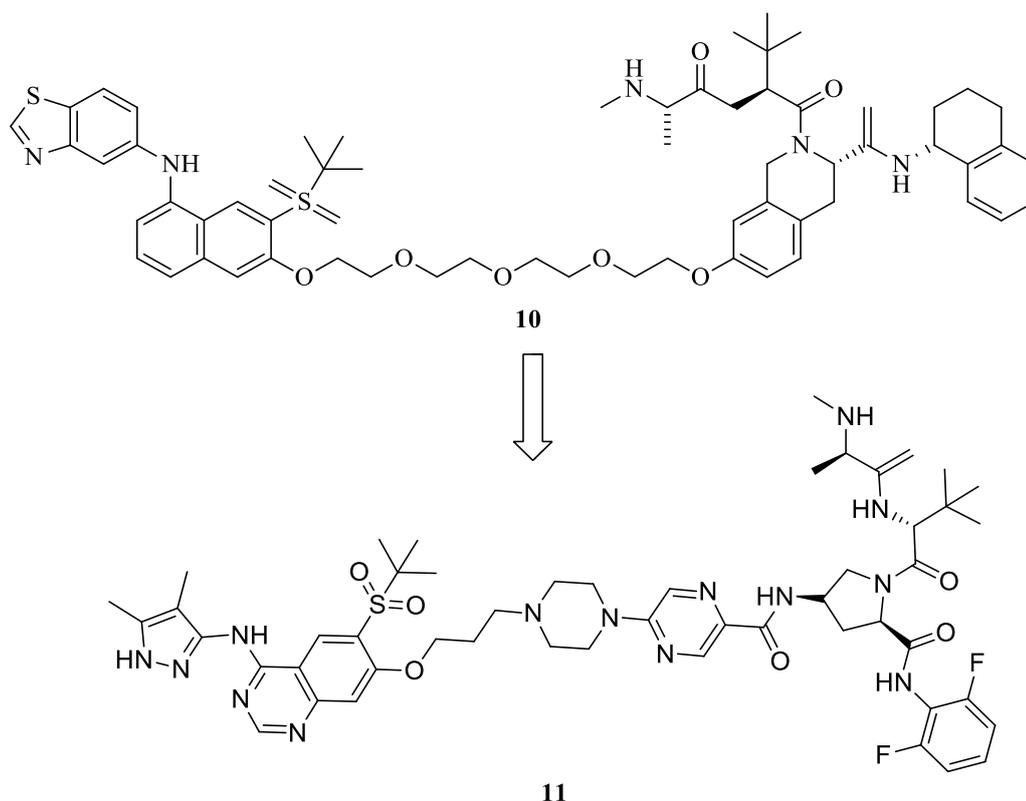


Таблица 3 – Сравнение физико-химических параметров

PROTAC	pCD ₅₀	LogD	CL _{int(rat/human mic)}
10	7.9	6.1	11/29 mL/min/g
11	9.4	3.6	<0.8<4.45 mL/min/g

1.3.3 Кишечная проницаемость

Важным фармакокинетическим препятствием для молекул PROTAC является проницаемость. Несмотря на очень низкую проницаемость по сравнению с отдельными компонентами лиганда и традиционными ингибиторами, молекулы PROTAC могут проявлять мощную клеточную активность. Поэтому существует большой интерес к разработке стратегий улучшения клеточной проницаемости. Большинство химерных молекул демонстрируют плохую клеточную проницаемости из-за их большой

молекулярной массы (обычно более 800 Да), что является отклонением от стандарта «правила 5» (Ro5).

Для улучшения кишечной проницаемости лекарственных препаратов прибегают к таким модификациям, как уменьшение полярности, контроль липофильности на отметки $\log P = 3-5$, а также уменьшение доноров и акцепторов водородной связи. Несмотря на быстрое развитие инструментов *in silico*, достижение баланса растворимость-проницаемость все еще является сложной и трудно предсказуемой задачей [27].

Использование коротких алкильных линкеров или включение в структуру третичных аминов, минимизирующих топологическую площадь полярной поверхности (TPSA), положительно влияло на липофильность и клеточную проницаемость соединений PROTAC.

Авторы статьи [28] объединили анализ проницаемости искусственных мембран (PAMPA) и показатель эффективности липофильной проницаемости (LPE). Изучение пассивной проницаемости молекул производилось на молекулах PROTAC на основе молекул VHL. В данном исследовании было продемонстрировано, что сочетание PAMPA и LPE дает представление о взаимосвязи структуры и проницаемости деградеров. Важно, что эти анализы моделируют только пассивную проницаемость без мешающих эффектов активного транспорта. Результаты исследования показали, что подверженные влиянию растворителя амидные группы лиганда VHL вблизи точек присоединения линкера негативно влияют на проницаемость.

Относительно простой стратегией повышения проницаемости и биоактивности деградеров оказалась биоизостерическая замена амидной группы на сложноэфирную в линкере. Был разработан новый набор амид/эфир-замещенных деградеров ВЕТ на основе VHL с целью повышения проницаемости. Авторы использовали семь различных линкеров, подверженных биоизостерической замене [29]. Особое внимание при разработке PROTAC с хорошей кишечной проницаемостью стоит уделять значению молекулярной массы, а также количеству доноров и акцепторов

водородной связи. Авторы статьи обозначили узкий диапазон значений, а именно: MW=600-800, HBD=3-4, HBA=6-8. Соединение **12** обладает не только самой высокой проницаемостью PAMPA ($P_e=0.6\times 10^{-6}$ см/с), из всей серии PROTAC, но и в 7.5 раз более проницаем, чем его амидный аналог **13** (рисунок 8). Также **12** демонстрирует самую мощную деградацию BRD4 по сравнению с другими исследуемыми соединениями. На более высокую активность сложноэфирных PROTAC по сравнению с их амидными аналогами влияет их способность более эффективно проникать в клетки, инициируя тем самым каталитический нокдаун целевых белков BET при более низких дозах, что приводит к образованию более мощных деградирующих соединений.

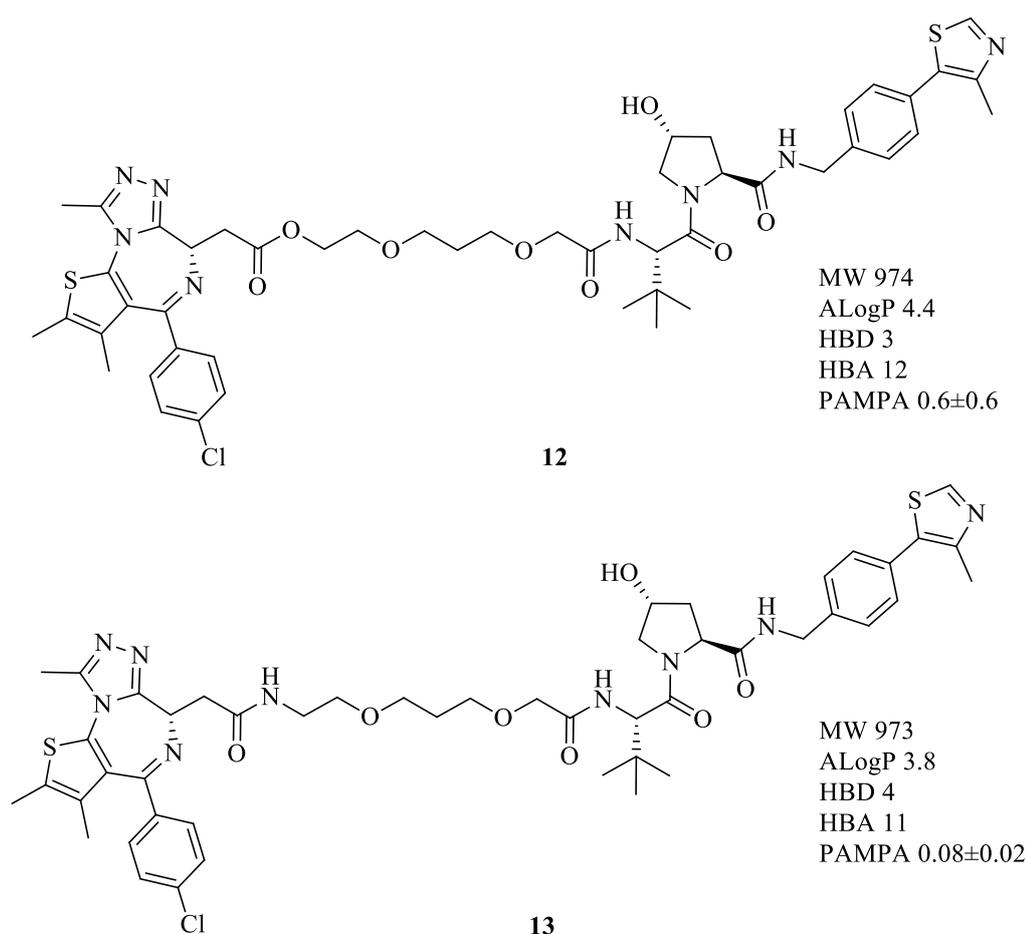


Рисунок 8 – Пример биоизостерической замены

Конформация соединений также влияет на свойства лекарственного препарата. Молекулярная хамелеонность – особое свойство молекул, позволяющее скрывать полярные фрагменты, находящиеся в неполярной среде, за счет чего повышается липофильность, и наблюдается снижение полярности. Можно предположить, что более гибкие линкеры в химерных молекулах могут быть хамелеонами. Это можно достичь за счет количества свободно вращающихся связей [30].

1.3.4 Распределение

Распределение описывает обратимый перенос лекарственного средства из одного места в другое. При пероральном приеме лекарственного препарата распределение происходит из кровотока в интерстициальную и межклеточную жидкости. В контексте молекул PROTAC, связывание с белками плазмы (РРВ) коррелирует с липофильностью, поэтому вещества с большим показателем липофильности будут иметь низкую несвязанную фракцию (f_u) [31]. Низкое значение f_u не позволяет экстраполировать результаты исследований *in vivo* и *in vitro*, что не позволяет прогнозировать внутренний клиренс (Cl_{int}) [32].

1.3.5 Метаболизм

Метаболические процессы PROTAC значительно отличаются от традиционных низкомолекулярных препаратов. Метаболизм ксенобиотиков можно определить, как химическую трансформацию биологической системой, обычно с помощью ферментов, метаболизирующих лекарственные средства, которые обычно превращают относительно липофильные соединения в более легко выводимые из организма гидрофильные метаболиты и выражается периодом полураспада ($t_{1/2}$) и внутренним клиренсом (Cl_{int}). В свою очередь, метаболиты лекарственных средств могут быть фармакологически активными, слабоактивными или неактивными.

Чжоу и др. [33] оценили метаболизм соединения **14** в микросомах печени мышей (только метаболизм I фазы), после 20 и 40 минут инкубации.

Соединение **14** разрушает ВЕТ белки, в качестве лиганда CRBN – талидомид (рисунок 9).

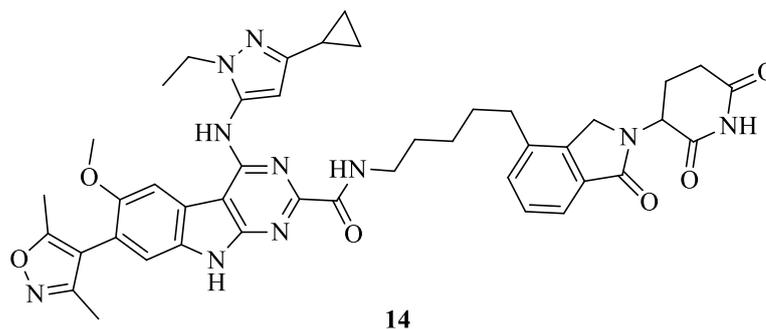


Рисунок 9 – PROTAC, нацеленный на ВЕТ семейство белков

Предполагается, что основным метаболитом является моно- или дигидроксилированный продукт, возникающий в алкильной цепи линкера. Кроме того, расщепление связи $C(sp^3)-C(sp^2)$ между линкером и CRBN-связывающим лигандом и N-диэтилирование пиразольного мотива являются альтернативными путями метаболизма **14**.

В 2020 году впервые был проведен анализ метаболической стабильности в криоконсервированных гепатоцитах человека в различные моменты времени. Авторы статьи установили значение периода полураспада, а также идентифицировали мягкие участки, что позволило выявить общие тенденции метаболизма химерных молекул. Важно отметить, что наиболее уязвимым фрагментом деградера является его линкер, так как его длина, место соединения и гибкость оказывает влияние на общую метаболическую активность PROTAC [34].

1.3.6 Выведение

Экскреция химерных молекул полностью не установлена. Для ограниченных исследований билиарная и почечная экскреция не были основными путями выведения из-за низкого значения f_u [31]. А отсутствие билиарного клиренса было неожиданным, учитывая высокую молекулярную массу PROTAC.

Для понимания полного процесса выведения PROTAC из организма в настоящее время недостаточно исследований.

1.4 Методы измерения

1.4.1 Определение стабильности соединений

Стабильность в плазме крови имеет большое значение при открытии новых лекарственных препаратов. Если соединения быстро разрушаются в плазме, их концентрация в терапевтической мишени будет недостаточной для проявления фармакологической активности. Высокий клиренс в плазме и короткий период полувыведения в естественных условиях являются характеристиками нестабильности в плазме.

Экспериментальные условия для определения стабильности в плазме важны для получения релевантных и высококачественных данных. Рекомендуемые условия, для проведения анализа включают в себя:

- концентрацию исследуемого вещества 1 мкМ;
- концентрацию плазмы - 50% в PBS буфере, pH 7.4;
- 2,5 % ДМСО;
- инкубирование исследуемого вещества при 37°C в течение трех часов.

Стабильность в биологической среде очень важна для определения взаимосвязи структура-активность (SAR) [35].

Исследование стабильности проводится в точных условиях биопробы, включая состав буфера, pH, температуру и время инкубации, концентрацию. Предпочтительным методом анализа является ЖХ-МС (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией) из-за низкой концентрации тестируемого соединения (от 1 до 10 мкМ). Образцы вводятся в режиме реального времени во время инкубации или гасятся холодным АСН для удаления белков в среде аналита перед введением в хроматограф. Для выяснения кинетики можно отслеживать различные временные точки. Для

исследования стабильности при открытии лекарственных препаратов используются стандартные ацетатный, фосфатный и боратный буферы. Важно использовать одинаковые противоионы и концентрации при сравнении стабильности различных соединений для получения достоверных данных [36].

1.4.2 Определение кинетической растворимости

Важнейшим фактором, определяющим оптимальную дозировку лекарственного препарата, является их всасывание в кровеносную систему, а проявление фармакологического действия напрямую связано с растворимостью вещества. Основной проблемой разработки рецептуры нового лекарства является его ограниченная растворимость в воде. Препараты с низкой растворимостью требуют больших доз для достижения максимальной эффективной концентрации в кровотоке при пероральном приёме [37].

Растворимость соединения зависит от его структуры и условий растворения. Структура вещества определяет липофильность, количество водородных связей и ионизируемость, которые определяют растворимость. На условия растворения влияют рН, добавки, соразтворители, ионная сила, а также время и температура. Многие эксперименты в дизайне лекарственных соединений проводятся в условиях «кинетической растворимости». При открытии лекарств растворимость оказывает большое влияние на дозирование *in vivo* и кишечную абсорбцию. Хорошим значением растворимости лекарственных соединений является > 60 мкг/мл [38]. Технически растворимость определяется как концентрация соединения, находящегося в равновесии с избытком твердого вещества (насыщенного раствора) наиболее стабильной кристаллической структуры при определенных физико-химических условиях растворения.

Анализ можно проводить с умеренной производительностью, инкубируя избыток твердого вещества с буфером и перемешивания в течение некоторого времени, перед фильтрацией и количественным определением методом ВЭЖХ, который является наиболее чувствительным. Для

определения кинетической растворимости соединения вводятся в водные растворители, предварительно растворенные в органических растворителях, обычно в ДМСО, и очень быстро осаждаются [39].

1.4.3 Определение липофильности соединений

Липофильность является ключевым физико-химическим свойством, которое вносит вклад в ADMET-характеристики лекарств, тем самым оказывая влияние на их метаболизм и фармакокинетику, фармакодинамику и токсикологический профиль.

Экспериментально липофильность определяется как коэффициент распределения ($\log P$). $\log P$ – это молекулярный параметр, описывающий равновесие разделения неионизированного растворенного вещества между водой и несмешивающимся органическим растворителем. Данный параметр выражается в логарифмическом виде и вычисляется по формуле 2. Большие значения $\log P$ соответствуют большей липофильности. Точное и эффективное измерение липофильности является важным требованием при разработке лекарственных препаратов [40].

$$\log P = \log \frac{C_{oct}}{C_{wat}} \quad (2)$$

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

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

Наиболее популярным методом определения физико-химических свойств в дизайне лекарственных препаратов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Хроматографический анализ имеет два типа: нормально-фазовый и обращенно-фазовый, последний из которых принято использовать для определения липофильности [41].

Одним из наиболее популярных применений ОФ-ВЭЖХ является разделение гидрофобных полярных молекул от гидрофобных неполярных химических веществ. Успех данного метода зависит от тщательного выбора колонки, подвижной фазы, в большинстве случаев состоящей из воды и органического растворителя (ацетонитрил или метанол), а также

оборудования для детектирования. Для более эффективного разделения гидрофобных групп принято изменять пропорции растворителей [42].

Важным параметром для определения липофильности является время удерживания анализируемого вещества, из которого рассчитывается фактор удерживания k и его логарифм по формуле 3.

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

где t_R – время удерживания исследуемого вещества;

t_m – время удерживания несорбирующегося соединения.

1.4.4 Определение кишечной проницаемости

Линия клеток Сасо-2, полученная из карциномы толстой кишки человека, обычно используется для оценки проницаемости соединений в условиях *in vitro*. Аналитическая камера для проведения анализа схематично изображена на рисунке 10.

Клетки Сасо-2 представляют собой линию клеток эпителиального рака толстой кишки человека, используемую в качестве модели кишечной проницаемости лекарств или других соединений в организме человека. При культивировании в виде монослоя клетки Сасо-2 дифференцируются, образуя плотные соединения между клетками, что служит моделью парацеллюлярного перемещения соединений через монослой [43]. Кроме того, клетки Сасо-2 экспрессируют белки-транспортеры, белки эффлюкса и ферменты конъюгации II фазы для моделирования различных трансцеллюлярных путей, а также метаболической трансформации тестируемых веществ. Во многих отношениях монослой клеток Сасо-2 имитирует кишечный эпителий человека [44].

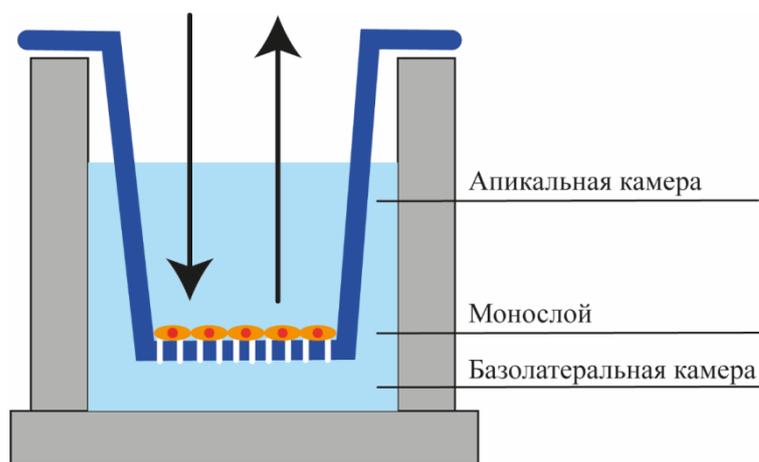


Рисунок 10 – Аналитическая камера для проведения анализа

Монослой клеток Сасо-2 обычно культивируются на полупроницаемых пластиковых подставках, которые могут быть установлены в лунки многолуночных культуральных планшетов. Испытуемые соединения добавляют либо к апикальной, либо к базолатеральной стороне монослоя. После инкубации в течение различных периодов времени аликвоты буфера в противоположных камерах берутся для определения концентрации тестируемых соединений и расчета P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости, рассчитываемый по формуле 4 [45].

$$P_{app} = \frac{V_r}{A \cdot C_0} \frac{dC}{dt} \quad (4)$$

где V_r – объем в акцепторной камере, мл;

dC/dt – скорость изменения концентрации лекарственного препарата в акцепторном отсеке, моль/с;

A – площадь поверхности клеточного слоя мембраны, см²;

C_0 – начальная концентрация лекарственного препарата в одной из частей до начала абсорбции, моль/л.

2 Результаты и их обсуждения

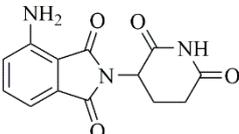
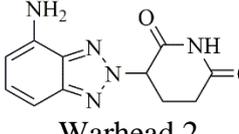
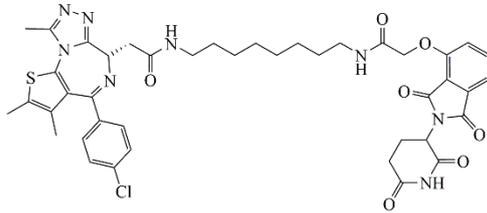
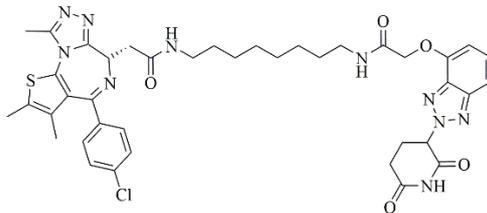
Основной целью фармацевтических исследований и разработок является обеспечение постоянного наличия новых химических молекулярных соединений, которые демонстрируют высокую терапевтическую эффективность при небольшом количестве или полном отсутствии побочных эффектов. Эффективность и токсичность лекарственного средства напрямую связана с фармакокинетическим профилем, который регулируется совокупностью ADME-свойств. Плохой профиль ADME-характеристик могут быть одной из основных причин прекращения разработки лекарств [46].

Скрининг ADME-свойств становится все более важным для выявления и оптимизации ведущих структур. Каждый процесс ADME может быть дополнительно оценён по определенным параметрам, например, абсорбция оценивается в основном по результатам растворимости и проницаемости мембран; распределение – по связыванию с белками, тканями и транспортерами; метаболизм – по метаболической стабильности в микросомах печени или печеночному клиренсу; выведение – по почечному клиренсу и скорости выведения с мочой [47].

В данной работе определены значения растворимости, липофильности, кишечной проницаемости и стабильности 4 соединений, которые являются биоизостерами талидомида и деградерами на их основе.

В качестве объекта исследования были взяты помалидомид, биоизостерный лиганд, молекула dBET6 и его бензотриазольный аналог PROTAC-B. Структуры веществ представлены в таблице 4. Для исследуемых соединений дополнительно был проведен расчет значений растворимости, липофильности и клеточной проницаемости с помощью алгоритма QikProp, интегрированного в ПО SchrodingerSuite. Значения, предсказанные *in silico*, также приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Структурные формулы исследуемых соединений

Название и структурная формула	Mol MW*	QPlogP _{0/w} *	QPlogS*	QPPCaco-2*
 Warhead 1 Помалидомид	273.25	0.297	-2.721	55.236
 Warhead 2 Помалидомид-В	245.24	0.072	-2.401	119.761
 PROTAC 1 dBET6	841.38	4.813	-8.723	3.951
 PROTAC 2 dBET6-В	813.37	5.532	-10.895	8.179

*Mol MW – молекулярная масса, Да; QPlogP_{0/w} - предсказанный коэффициент распределения октанол/вода; QPlogS – предсказанная растворимость в воде, моль/дм³; QPPCaco - Прогнозируемая кажущаяся проницаемость клеток Caco-2, нм/сек.

2.1 Определение концентрации исследуемых веществ

Концентрация является основным параметром для определения таких физико-химических свойств, как растворимость и кишечная проницаемость. Текущую концентрацию определяли методом ВЭЖХ, с использованием градуировочных графиков.

Градуировочный график строился как зависимость между известной концентрацией определяемого вещества от интегральной площади пика.

Данные зависимости были получены для разных по природе неподвижных фаз (октадецилсиликагель, амино-фаза) и могут использоваться в дальнейшем за контролем концентрации данных лигандов и PROTAS. Для объектов исследования, представленных в таблице 4, полученные градуировочные зависимости приведены в таблицах 5-8 и рисунках 11-14.

Таблица 5 – Зависимость интегральной площади пиков от концентрации помалидомида

Концентрация, [μM]	Площадь, [mAU·s]	Среднее значение площади, [mAU·s]
7.81	82	82±8.98
	81	
15.62	130	130±8.98
	129	
31.25	308	338±36.90
	332	
	360	
	352	
6.5	580	594±33.71
	596	
	607	
125	1363	1347±207.79
	1256	
	1421	
250	2728	2866±427.55
	2811	
	3059	
500	5250	5594±869.33
	5581	
	5950	

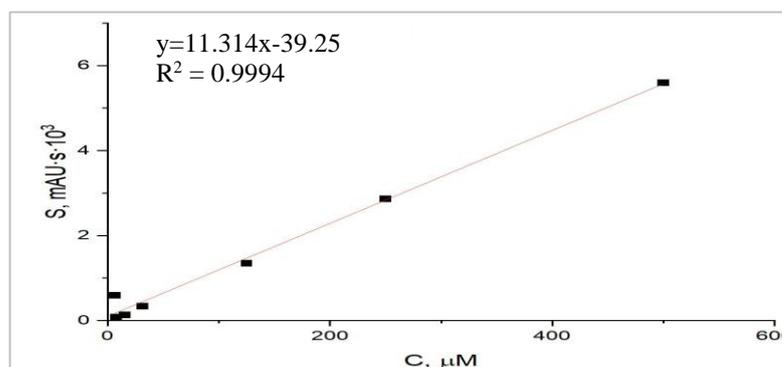


Рисунок 11 – Зависимость интегральной площади пика от известной концентрации помалидомида

Таблица 6 – Зависимость интегральной площади пиков от концентрации помалидомида-В

Концентрация, [μM]	Площадь, [mAU·s]	Среднее значение площади, [mAU·s]
167	879	857±279.38
	835	
333	1415	1408±31.84
	1377	
	1395	
	1408	
	1446	
500	2037	2059±69.39
	2011	
	2077	
	2110	
625	2598	2571±81.71
	2578	
	2496	
	2610	
1000	3957	3797±231.75
	3956	
	3586	
	3879	
	3605	
1670	6322	6484±407.74
	6345	
	6403	
	6865	

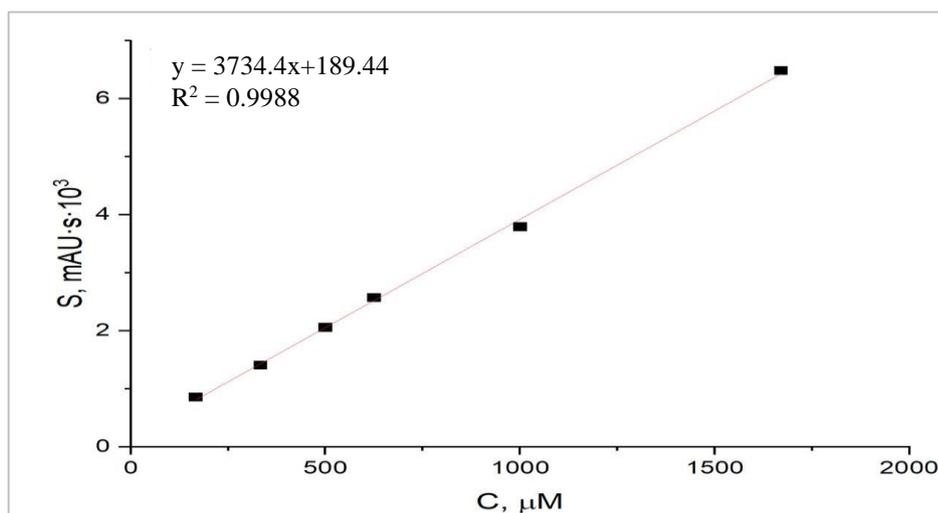


Рисунок 12 – Зависимость интегральной площади пика от известной концентрации помалидомида-В

Таблица 7 – Зависимость интегральной площади пиков от концентрации dBET6

Концентрация, [μM]	Площадь, [mAU·s]	Среднее значение площади, [mAU·s]
31.25	1640	1578±332.20
	1641	
	1755	
	1275	
62.50	2415	2408±167.57
	2540	
	2393	
	2283	
125	4683	4318±230.68
	4144	
	4161	
	4282	
250	7517	7266±634.98
	6688	
	7548	
	7309	
500	13398	13369±535.37
	12934	
	13389	
	13756	
1000	25946	26323±2583.99
	24728	
	26025	
	28592	

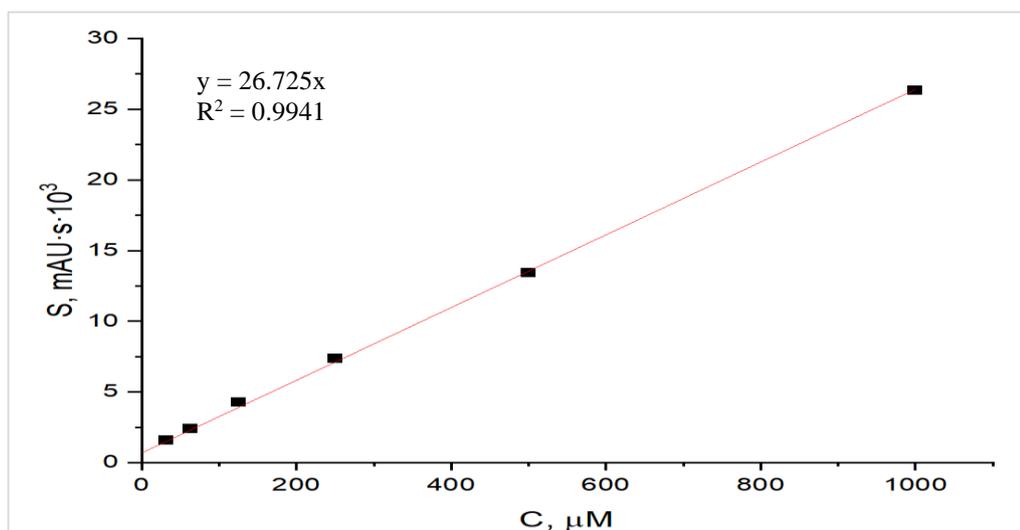


Рисунок 13 – Зависимость интегральной площади пика от известной концентрации dBET6

Таблица 8 - Зависимость интегральной площади пиков от концентрации dВЕТ6-В

Концентрация, [μM]	Площадь, [mAU·s]	Среднее значение площади, [mAU·s]
39.06	1807	1764±336.91
	1612	
	1873	
78.13	2177	2308±829.28
	2185	
	1822	
	3048	
156.25	4445	4748±1401.53
	5399	
	4399	
312.50	9442	9143±1021.49
	8674	
	9314	
625.00	18910	18469±829.06
	18785	
	18431	
	17748	
1250.00	38064	35668±9121.84
	37503	
	31438	
2500.00	63272	68068±13959.37
	66675	
	74256	

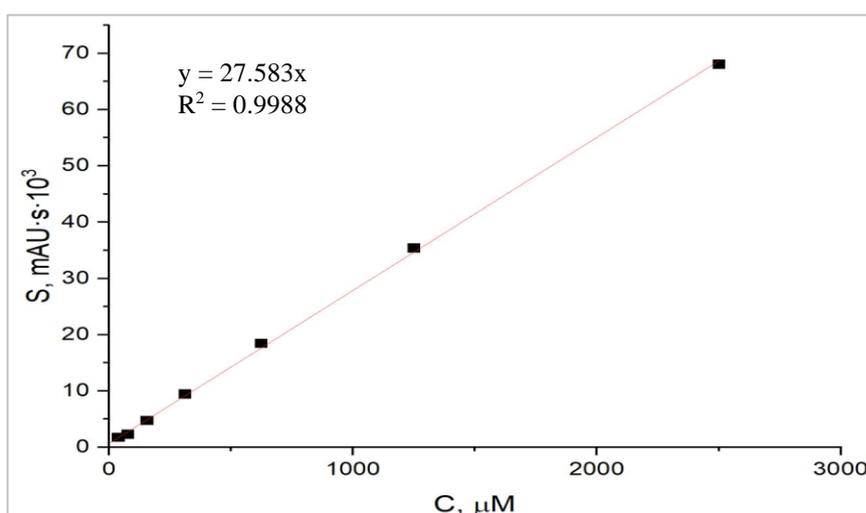


Рисунок 14 – Зависимость интегральной площади пиков от концентрации dВЕТ6-В

2.2 Определение липофильности веществ

Липофильность отражает сродство молекулы к водной или липофильной среде и может использоваться для прогнозирования способности молекул проникать через клеточные мембраны и связываться с белками, которые по своей природе в основном гидрофобны. Липофильность измеряют с помощью $\log P$, который определяется как логарифм концентрации растворенного вещества в октаноле по отношению к концентрации неионизированного растворенного вещества в воде [48].

Липофильность может быть оценена через параметр гидрофобности $\log P$. Метод обращённо-фазовой ВЭЖХ является наиболее популярным в настоящее время. Данный метод основывается на определении времени удерживания как стандартных соединений, так и исследуемых образцов. Используя времена удерживания стандартных веществ с уже известными показателями липофильности, было получено уравнение 5, которое связывает фактор удерживания с $\log P$:

$$\log P_{o/w} = 0.8879 \log k_0 + 0.6099 \quad (5)$$

где $\log P_{o/w}$ – логарифм коэффициента распределения вещества;

$\log k_0$ – логарифм фактора удерживания вещества.

Для исследуемых соединений были получены значения $\log k$ при различных соотношениях метанол-вода и построены графики зависимости $\log k$ от доли метанола в элюенте.

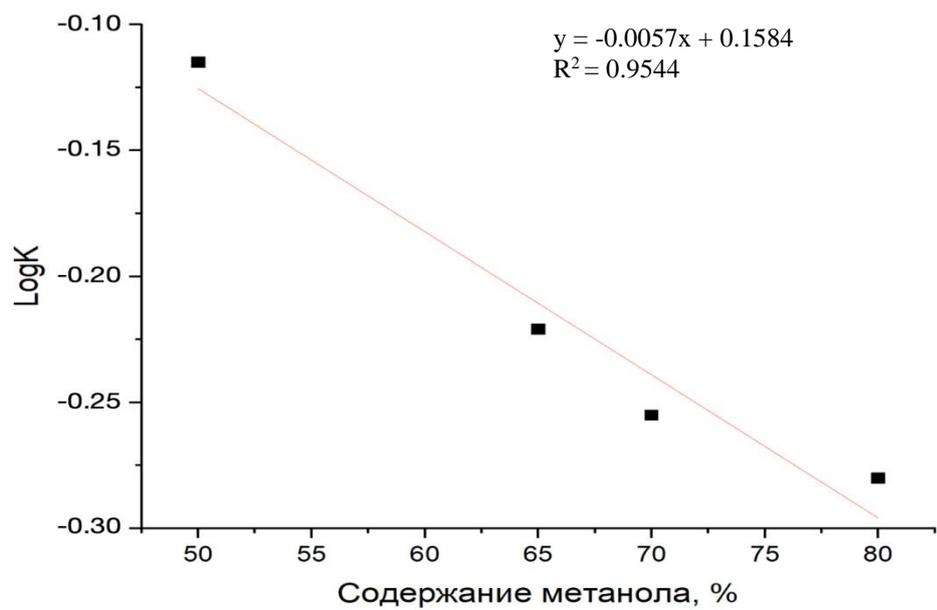


Рисунок 15 – Зависимость фактора удерживания помалидомида от доли метанола в составе подвижной фазы

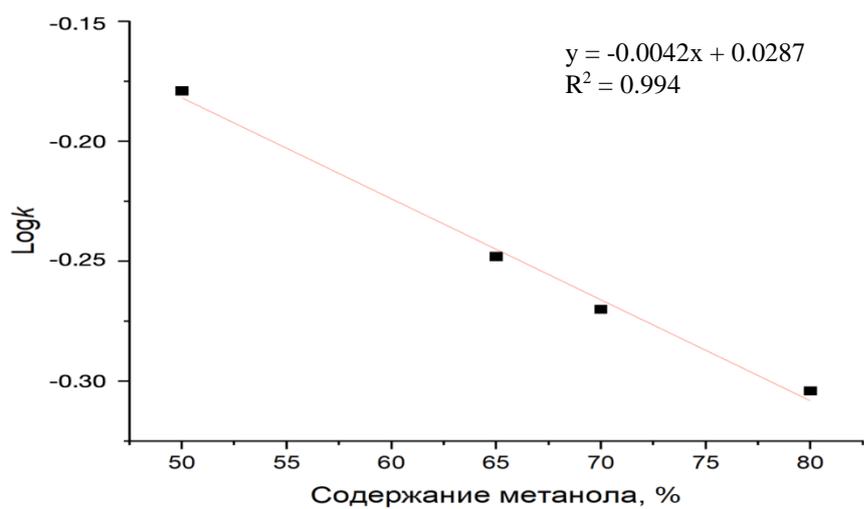


Рисунок 16 – Зависимость фактора удерживания помалидомида-В от доли метанола в составе подвижной фазы

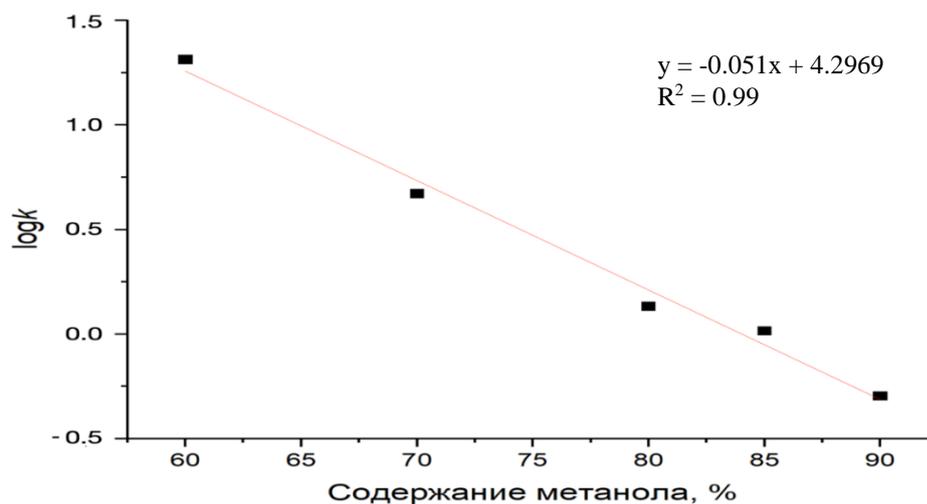


Рисунок 17 – Зависимость фактора удерживания dВЕТ6 от доли метанола в составе подвижной фазы

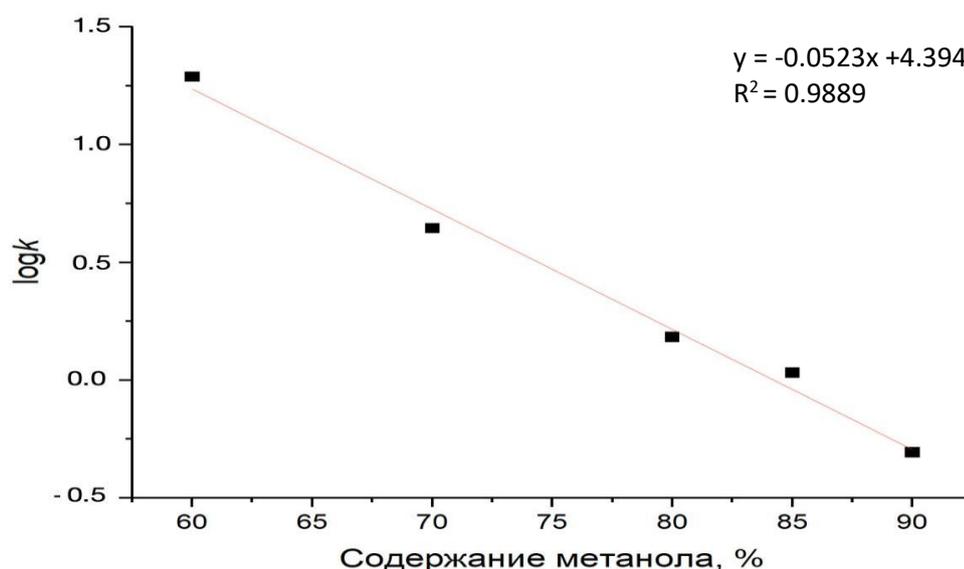


Рисунок 18 – Зависимость фактора удерживания dВЕТ6-В от доли метанола в составе подвижной фазы

По полученным экспериментальным данным были найдены значения $\log k_0$, путём экстраполяции на нулевое содержание метанола. Используя ранее выведенное уравнение зависимости логарифма коэффициента распределения $\log P$ от $\log k_0$ были рассчитаны значения липофильности для исследуемых соединений. Значения приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Экспериментальные данные полученные для исследуемых соединений

Исследуемое соединение	Log k_0	Log $P_{o/w}$
Помалидомид	0.16	0.75±0.01
Помалидомид-В	0.03	0.64±0.01
dBET6	4.30	4.43±0.08
dBET6-В	4.40	4.51±0.08

По результатам определения липофильности установлено, что warhead 2 (помалидомид-В) обладает меньшей липофильностью по сравнению с warhead 1 (помалидомид), что согласуется с расчетами *in silico*, однако, будучи встроенным в химерную молекулу PROTAC 2 (dBET6-В), демонстрирует более высокое значение липофильности по сравнению с PROTAC 2 (dBET6), что также согласуется с расчетами *in silico*.

Все полученные значения logP соответствуют правилу Липински, что позволяет рекомендовать исследуемые соединения для дальнейших исследований.

2.3 Определение кинетической растворимости

Растворимость лекарств в водных средах при физиологическом pH является жизненно важным фактором при открытии и разработке лекарств [49]. Низкая растворимость является причиной низкой биодоступности и высокой вариабельности фармакокинетики пероральных препаратов, что связано с недостаточной эффективностью [50]. С точки зрения фармацевтической науки низкая растворимость также повышает риск изменения растворимости полиморфов и требует использования технологий составления рецептур, таких как твердые дисперсии, нанокристаллы и солюбилизированные составы на основе липидов, которые являются эффективным рычагом воздействия при разработке лекарств.

Растворимость соединений определяют, как концентрацию в PBS, сравнивая начальную и конечную концентрацию, методом градуировочного графика.

Таблица 10 – Экспериментальные данные площади пиков для исследуемых соединения

Исследуемое соединение	Площадь, [mAU·s]	Среднее значение площади, [mAU·s]
Помалидомид	738.2	832.7±177.5
	795.2	
	994.5	
	803	
Помалидомид-В	895.4	869.6±28.2
	866.2	
	861.2	
	855.6	
dBET6	127.2	132.6±17.8
	135.2	
	121.1	
	147.0	
dBET6-В	152.5	161.1±9.2
	165.0	
	164.0	
	163.0	

Из градуировочных графиков, представленных на рисунках 15-18, можно вывести уравнение зависимости концентрации от среднего значения площади интегральных пиков для каждого вещества, формулы 6-9 в таблице 11.

Как следует из полученных данных растворимость биоизостерных аналогов warhead 2 (помалидомид-В) и PROTAC 2 (dBET6-В) выше, чем warhead 1(помалидомид) и PROTAC 1 (dBET6-В). Расчеты *in silico* в данном случае согласуются для молекул боеголовок/лигандов, но не отражают корректно тенденцию в изменении параметра растворимости для химерных молекул PROTAC, что еще раз подтверждает сложности, с которыми сталкиваются исследователи при расчете крупных молекул PROTAC.

Таблица 11 – Кинетическая растворимость исследуемых веществ

Вещество	Формула	Растворимость вещества, [μM]
Помалидомид	$C = \frac{S_{cp} + 39.25}{11.314}$ (6)	77.00±2.31
Помалидомид-В	$C = \frac{S_{cp} - 189.44}{3734.4}$ (7)	182.00±5.50
dВЕТ6	$C = \frac{S_{cp}}{26.725}$ (8)	4.96±0.67
dВЕТ6-В	$C = \frac{S_{cp}}{27.583}$ (9)	5.84±0.33

2.4 Определение кишечной проницаемости

Клеточная линия аденокарциномы человека Сасо-2 была выведена в 1974 году из толстой кишки человека. С тех пор данная клеточная линия широко используется в качестве системы *in vitro* в фармацевтических исследованиях. Клетки обладают многими функциональными и морфологическими свойствами энтероцитов кишечника человека. Они экспрессируют большую часть системы транспортеров питательных веществ и лекарственных препаратов, а также часть метаболических ферментов, которые экспрессируются в кишечном эпителии человека. Клеточная модель Сасо-2 является хорошо зарекомендовавшим себя инструментом для скрининга лекарственных средств, позволяющим изучить способность молекулы проникать сквозь эпителиальную мембрану кишечника, исследовать механизмы транспорта и прогнозировать пероральную абсорбцию, и заняла центральное место в доклинических оценках риска абсорбции у человека [51].

В данной работе получены величины коэффициентов кажущейся проницаемости для исследуемых соединений: помалидомид, помалидомид-В, dВЕТ6 и dВЕТ6-В, в различных направлениях транспорта. Для определения параметра использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Определение неизвестной концентрации проводилось методом градуировки. Зная концентрацию вещества в акцепторной камере после 90 минут от начала анализа, было вычислено значение P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости.

Расчет для помалидомида представлен в формулах 10 (апикальная часть) и 11 (базолатеральная часть).

$$P_{app\downarrow} = \frac{8.86 \times 4}{5400 \times 50 \times 4.52} = (29.05 \pm 0.87) \times 10^{-6} \text{ см/с} \quad (10)$$

$$P_{app\uparrow} = \frac{8.14 \times 4}{5400 \times 50 \times 4.52} = (26.68 \pm 0.80) \times 10^{-6} \text{ см/с} \quad (11)$$

Расчет для помалидомида-В представлен в формулах 12 (апикальная часть) и 13 (базолатеральная часть).

$$P_{app\downarrow} = \frac{8.80 \times 4}{5400 \times 50 \times 4.52} = (28.84 \pm 0.88) \times 10^{-6} \text{ см/с} \quad (12)$$

$$P_{app\uparrow} = \frac{8.166 \times 4}{5400 \times 50 \times 4.52} = (26.76 \pm 0.81) \times 10^{-6} \text{ см/с} \quad (13)$$

Расчет для dВЕТ6-В представлен в формулах 14 (апикальная часть) и 15 (базолатеральная часть).

$$P_{app\downarrow} = \frac{0.5776 \times 4}{5400 \times 20 \times 4.52} = (4.73 \pm 0.27) \times 10^{-6} \text{ см/с} \quad (14)$$

$$P_{app\uparrow} = \frac{0.3655 \times 4}{5400 \times 20 \times 4.52} = (2.99 \pm 0.17) \times 10^{-6} \text{ см/с} \quad (15)$$

Для dВЕТ6 в указанных условиях хроматографического эксперимента определение концентрации для расчета клеточной проницаемости оказалось невозможным.

Таким образом, как следует из экспериментальных данных, проницаемость исследуемых молекул из апикальной части в

базолатеральную выше, чем из базолатеральной в апикальную. Кишечная проницаемость помалидомида сопоставима с проницаемостью его биоизостерного аналога. Полученные значения для помалидомида, кроме того, хорошо согласуются со значением кишечной проницаемости, определенной в работе [20] – 24.9 ± 2 нм/с. Данные полученные методами *in silico* превышают эти значения практически в 2 раза. Расчет также предсказывает повышение проницаемости при замене фталимидного фрагмента на бензотриазольный. Однако, как видно из полученных нами экспериментальных данных, кишечная проницаемость для этих двух соединений имеет практически равные значения. Расчетные значения для молекулы dВЕТ6-В (8.18 нм/с) также в 1.7 раза завышены по сравнению с экспериментом (4.73 нм/с).

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Реагенты использовались коммерчески доступные, без дополнительной очистки.

- Метанол для ОФ ВЭЖХ, 99.9%;
- Ацетонитрил для ОФ ВЭЖХ, 99.9%;
- Фосфатный буфер, рН 2.25;
- Нитрит натрия, х.ч.;
- Питательная среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) с дополнением фетальной бычьей сыворотки FBS (20%), пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и амфотерицина В (2 мкг/мл);
- TrypLe Express Gibco;
- Фосфатный буферный раствор (PBS), рН 7.4;
- Диметилсульфоксид (DMSO), питательная среда Rpmi-1640 при добавлении 20% фетальной бычьей сывороткой (FBS);
- Клеточная линия Сасо-2 (АТСС);
- Вода дистиллированная;
- Жидкостный хроматограф фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC;
- Колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (100x4.6 мм) с размером частиц 5 мкм;
- Колонка хроматографическая Phenomenex Luna 3u C18 (150x4.60 мм) с размером частиц 3 мкм;
- Ламинарный шкаф II класса защиты SafeFast Elite;
- Инвертированный микроскоп ZEISS Primovert;
- Микрошприц Agilent объёмом 50 мкл;
- Механический дозатор на 300 мкл Eppendorf Research Plus;

- Механический дозатор на 1000 мкл Eppendorf;
- Центрифуга для микропробирок Eppendorf;
- Шейкер-инкубатор Biosan;
- Культуральный флакон на 150 см² Eppendorf;
- Пробирка 1.5 мл Eppendorf;
- Подвешенная вставка для клеточных культур из поликарбонатной мембраны с размером пор 0.4 мкм и площадью поверхности 4.52 см², используемая в 6-луночном планшете SPLInsert;
- Серологические пипетки на 5 мл и 10 мл Eppendorf;
- Наконечники на 300 мкл и 1000 мкл Vertex;
- 96-луночный планшет Eppendorf.

Исследуемые соединения были предоставлены лабораторией синтеза биологически активных малых молекул кафедры медицинской химии института СПбГУ.

3.2 Методика проведения эксперимента определение липофильности

Исследования проводились на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220 Infinity LC с использованием хроматографической колонки Zorbax Eclipse Plus C18 размером 4.6×100 мм и частицами сорбента размером 5 мкм. В качестве подвижной фазы применялась смесь метанола и воды в различных пропорциях: 80 : 20, 70 : 30, 65 : 35, 60 : 40, 50 : 50 (об. %). Для расчета коэффициентов удерживания *k* объектов исследования в качестве несорбирующегося вещества использовался нитрит натрия.

Эксперименты проводили при комнатной температуре, при этом скорость потока элюента составляет 1 мл/мин. Детектирование проводили с использованием УФ-детектора при длинах волн 383 нм для помалидомида,

326 нм для бензотриазольного биоизостера талидомида и 257 нм для dBET6 и dBET6-B.

Далее определяли фактор удерживания, который был рассчитан по формуле:

$$\log k = \log \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) \quad (16)$$

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. Экспериментальные данные приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Рассчитанные величины логарифма фактора удерживания для исследуемых соединений при различных соотношениях метанол-вода.

Исследуемое соединение	Значение $\log k$						
	90:10	85:15	80:20	70:30	65:35	60:40	50:50
Пом	-	-	-0.280	-0.255	-0.221	-	-0.115
Пом-B	-	-	-0.304	-0.270	-0.248	-	-0.179
dBET6	-0.306	0.003	0.184	0.646	-	1.288	-
dBET6-B	-0.295	0.016	0.133	0.672	-	1.313	-

3.3 Методика проведения эксперимента клеточной проницаемости

Определение концентрации исследуемых соединений проводили на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220 Infinity LC с хроматографической колонкой Phenomenex Luna 3u C18 150×4.60 мм, размер частиц сорбента 3 мкм. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода в соотношении 80:20 об.%.

Экспериментальные исследования проводили при комнатной температуре, расход элюента составил 1 мл/мин. Детектирование проводили при разных длинах волн для каждого вещества, что соответствует длинам

волн максимумов поглощения соответствующих соединений. Концентрация каждого исследуемого образца определялась методом градуировочного графика.

Для выполнения анализа питательная среда была заменена буфером для анализа проницаемости, который представлял собой солевой раствор Хэнкса с добавлением 92.70 мг $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 мг Mg_2Cl_2 , 900 мг глюкозы и 2133 мг MES. Общий объем раствора 500 мл.

Для определения проницаемости из апикальной в базолатеральную часть 1 мл образца добавляли в апикальную часть, а 4 мл буфера в базолатеральную часть камеры, наоборот, для определения проницаемости из базолатеральной в апикальную часть камеры. Исходная концентрация молекул PROTAC 20 μM , а боеголовок 50 μM . Клетки инкубировали в атмосфере 5% CO_2 . По окончании инкубации из апикальной и базолатеральной части были взяты образцы и перенесены в пробирки, после центрифугировали для дальнейшего определения концентрации методом ОФ-ВЭЖХ.

3.4 Методика проведения эксперимента кинетической растворимости

В фосфатный буфер PBS добавляли исследуемые соединения с концентрацией 10 mM для достижения конечной концентрации 200 μM , pH=7.4. Пробу помещали в термошейкер на 4 часа, по истечении времени пробы убирали и давали постоять 30 минут при комнатной температуре. Далее пробы фильтровали при помощи шприцевого фильтра из политетрафторэтилена с диаметром пор 0.45 микрон. Анализ проводили методом ОФ-ВЭЖХ, концентрацию определяли методом градуировочного графика.

Заключение

В работе определены растворимость, липофильность и кишечная проницаемость помалидомида, dBET6 и их бензотриазольных аналогов (помалидомида-В и ВТ-PROTAC).

Показано, что биоизостерная замена фталимидного фрагмента бензотриазольным приводит к повышению растворимости как для молекул-лигандов – 77.00 мкМ у помалидомида и 182.00 мкМ у его биоизостера, так и для молекул PROTAC – 4.96 мкМ у dBet6 против 5.84 мкМ для его биоизостерного аналога.

Липофильность в молекуле-боеголовке с бензотриазольным фрагментом ($\log P = 0.64$) уменьшается по сравнению помалидомидом ($\log P = 0.75$), что согласуется с расчетами *in silico*, однако, будучи встроенной в химерную молекулу PROTAC 2 (dBET6-В), демонстрирует более высокое значение липофильности ($\log P = 5.84$) по сравнению с dBET6 ($\log P = 4.96$), что также согласуется с расчетами *in silico*.

Кишечная проницаемость, согласно экспериментальным данным для молекул-боеголовок практически сопоставима и находится в пределах 28-29 нм/с (из апикальной в базолатеральную часть), что также согласуется с экспериментальными данными [20] для помалидомида, но практически в два раза ниже рассчитанных *in silico* значений.

Таким образом, биоизостерная замена фталимидного фрагмента на бензотриазольный в исследованных молекулах приводит к увеличению растворимости, понижению липофильности для молекул-боеголовок и практически не изменяет кишечную проницаемость соединений.

Список используемой литературы

1. Zhang Y. Targeted protein degradation mechanisms / Y. Zhang, C. Loh, J. Chen et al. // *Drug Discovery Today: Technologies*. – 2019. – Vol. 31. – P. 53-60.
2. Dong G. Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery / G. Dong, Y. Ding, S. He et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2021. – Vol. 64, № 15. – P. 10606-10620.
3. PROTAC: A promising technology for cancer treatment / X. Zhou, R. Dong, J-Y. Zhang et al. // *European journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol. 203. – P. 112539.
4. Wu Y. Developing PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) for hematologic malignancies / Y. Wu, J. Zhang, X. Zhu et al. // *Cancer Letters*. – 2022. – Vol. 544. – P. 215808.
5. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy / X. Li, W. Pu, Q. Zheng et al. // *Molecular cancer*. – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 99.
6. Li X. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy / X. Li, Y. Song // *Journal of hematology & oncology*. – 2020. – Vol. 13. – P.1-14.
7. Crews C. M. Inducing protein degradation as a therapeutic strategy / C. M. Crews, G. Georg, S. Wang // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61, № 2. – P. 403-404.
8. Neklesa T. K. Targeted protein degradation by PROTACs / T. K. Neklesa, J. D. Winkler, C. M. Crews // *Pharmacology & therapeutics*. – 2017. – Vol. 174. – P. 138-144.
9. Optimising proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) for oral drug delivery: a drug metabolism and pharmacokinetics perspective / A. Pike, B. Williamson, S. Harlfinger et al. // *Drug Discovery Today*. – 2020. – Vol. 25, № 10. – P. 1793-1800.
10. Lipinski C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings /

C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy et al. // *Advanced drug delivery reviews*. – 1997. – Vol. 23, № 1-3. – P. 3-25.

11. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges / S. Zeng, W. Huang, X. Zheng et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 210. – P. 112981.

12. Alabi S. Novel mechanisms of molecular glue-induced protein degradation / S. Alabi // *Biochemistry*. – 2021. – Vol. 60, № 31. – P. 2371-2373.

13. Dong G. Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery / G. Dong, Y. Ding, S. He et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2021. – Vol. 64, № 15. – P. 10606-10620.

14. Yan J. Discovery of Highly Potent CRBN Ligands and Insight into Their Binding Mode through Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations / J. Yan, Z. Zheng // *ChemMedChem*. – 2023. – Vol. 18, № 5. – P. 202200573.

15. Genome-wide screening reveals a role for subcellular localization of CRBN in the anti-myeloma activity of pomalidomide / S. Tateno, M. Iida, S. Fujii et al. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 4012.

16. Molecular architecture and assembly of the DDB1–CUL4A ubiquitin ligase machinery / S. Angers, T. Li, X. Yi et al. // *Nature*. – 2006. – Vol. 443, № 7111. – P. 590-593.

17. Kumar V. Thalidomide treatment modulates macrophage pro-inflammatory function and cytokine levels in *Klebsiella pneumoniae* B5055 induced pneumonia in BALB/c mice / V. Kumar, K. Harjai, S. Chhibber et al. // *International immunopharmacology*. – 2010. – Vol. 10, № 7. – P. 777-783.

18. Park I. Novel molecular mechanism of lenalidomide in myeloid malignancies independent of deletion of chromosome 5q / I. Park, T. M. Phan, J. Fang // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, № 20. – P. 5084.

19. John L. B. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity / L. B. John, A. C. Ward // *Molecular immunology*. – 2011. – Vol. 48, № 9-10. – P. 1272-1278.

20. Kong N. R. Physicochemistry of Cereblon modulating drugs determines pharmacokinetics and disposition / N. R. Kong, H. Liu, J. Che et al. // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2021. – Vol. 12, № 11. – P. 1861-1865.
21. Replacing the phthalimide core in thalidomide with benzotriazole / M. Krasavin, A. Bubyrev, A. Kazantsev et al. // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2022. – Vol. 37, № 1. – P. 527-530.
22. Han X. Strategies for the discovery of oral PROTAC degraders aimed at cancer therapy / X. Han, Y. Sun // Cell Reports Physical Science. – 2022. – Vol. 3, № 10.
23. 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 // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2019. – Vol. 29, № 13. – P. 1555-1564.
24. Designing soluble PROTACs: strategies and preliminary guidelines / D. García Jiménez, M. R. Sebastiano, M. Vallaro et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2022. – Vol. 65, № 19. – P. 12639-12649.
25. Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization / L. Di, E. H. Kerns. – Academic press, 2015. – 549 p.
26. Extended pharmacodynamic responses observed upon PROTAC-mediated degradation of RIPK2 / A. Mares, A. H. Miah, I. E. D. Smith et al. // Communications biology. – 2020. – Vol. 3, № 1. – P. 1-13.
27. Shultz M. D. Two decades under the influence of the rule of five and the changing properties of approved oral drugs: miniperspective / M. D. Shultz // Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 62, № 4. – P. 1701-1714.
28. Understanding and improving the membrane permeability of VH032-based PROTACs / V. G. Klein, C. E. Townsend, A. Testa et al. // ACS medicinal chemistry letters. – 2020. – Vol. 11, № 9. – P. 1732-1738.

29. Amide-to-ester substitution as a strategy for optimizing PROTAC permeability and cellular activity / V. G. Klein, A. G. Bond, C. Craigon et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2021. – Vol. 64, № 24. – P. 18082-18101.

30. Solution conformations shed light on PROTAC cell permeability / Y. Atilaw, V. Poongavanam, C. S. Nilsson et al. // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 12, № 1. – P. 107-114.

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

32. PROTACs: current trends in protein degradation by proteolysis-targeting chimeras / J. Madan, V. K. Ahuja, K. Dua et al. // *BioDrugs*. – 2022. – Vol.36. – P. 609-62.

33. 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. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 61, № 2. – P. 462-481.

34. Understanding the metabolism of proteolysis targeting chimeras (PROTACs): the next step toward pharmaceutical applications / L. Goracci, J. Desantis, A. Valeri et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 63, № 20. – P. 11615-11638.

35. Di L. Solution stability-plasma, gastrointestinal, bioassay / L. Di, E. H. Kerns // *Current drug metabolism*. – 2008. – Vol. 9, № 9. – P. 860-868.

36. Di L. Stability challenges in drug discovery / L. Di, E. H. Kerns // *Chemistry & Biodiversity*. – 2009. – Vol. 6, № 11. – P. 1875-1886.

37. A review on solubility enhancement technique for pharmaceutical drugs / V. B. Borgaonkar, C. M. Jain, A. R. Jaiswal et al. // *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. – 2024. – Vol. 26, № 2. – P. 239-253.

38. Hoelke B. Comparison of nephelometric, UV-spectroscopic, and HPLC methods for high-throughput determination of aqueous drug solubility in microtiter

plates / B. Hoelke, S. Gieringer, M. Arlt et al. // *Analytical chemistry*. – 2009. – Vol. 81, № 8. – P. 3165-3172.

39. Kerns E. H. In vitro solubility assays in drug discovery / E. H. Kerns, L. Di, G. T. Carter // *Current drug metabolism*. – 2008. – Vol. 9, № 9. – P. 879-885.

40. Arnott J. A. The influence of lipophilicity in drug discovery and design / J. A. Arnott, S. L. Planey // *Expert opinion on drug discovery*. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 863-875.

41. Benhaim D. Characterization of Ascentis RP-Amide column: Lipophilicity measurement and linear solvation energy relationships / D. Benhaim, E. Grushka // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217, № 1. – P. 65-74.

42. Badkhal A. V. Stability Indicating RP-HPLC Method Development and Validation for the Estimation of Remogliflozin Etabonate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form / A. V. Badkhal, T. V. Bhatkar, N. S. Bhajipale // *International Journal of Pharmaceutical Research*. – 2020. – Vol.12, № 4. – P.1-7.

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

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

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

46. ADMET profiling in drug discovery and development: perspectives of in silico, in vitro and integrated approaches / N. E. H. Daoud, P. Borah, P. K. Deb et al. // *Current Drug Metabolism*. – 2021. – Vol. 22, № 7. – P. 503-522.

47. Ferreira L. L. G. ADMET modeling approaches in drug discovery / L. L. G. Ferreira, A. D. Andricopulo // *Drug discovery today*. – 2019. – Vol. 24, № 5. – P. 1157-1165.

48. Lobo S. Is there enough focus on lipophilicity in drug discovery? / S. Lobo // Expert opinion on drug discovery. – 2020. – Vol. 15, № 3. – P. 261-263.

49. Lipinski C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy et al. // Advanced drug delivery reviews. – 1997. – Vol. 23, № 1-3. – P. 3-25.

50. Di L. Bridging solubility between drug discovery and development / L. Di, P. V. Fish, T. Mano // Drug discovery today. – 2012. – Vol. 17, № 9-10. – P. 486-495.