

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 Синтез и биологическая активность ингибиторов ULK1/2

Обучающийся

Е.О. Мясков

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(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

Целью данной выпускной квалификационной работы является перепрофилирование известного лиганда тирозинкиназы EGFR, осимертиниба и позднего ингибитора аутофагии хлорохина. Новые производные могут стать потенциальными клиническими кандидатами для дуальной терапии рака, направленных на ингибирование ULK1/2 и снижение функциональности ферментов в лизосомах. Также, новые производные могут обладать улучшенными физико-химическими свойствами, что также повысит их эффективность.

В литературном обзоре описана биологическая роль аутофагии, строение белков ULK1/2, сравнение их аминокислотных последовательностей активных сайтов, сигнальные пути, в которых принимают участие данные изоформы. Описаны уже существующие ингибиторы ULK1/2, и направления в разработке новых скаффолдов.

В экспериментальной части описана структура дизайна исследования, методики синтеза исследуемых соединений, методики проведения биологических испытаний.

На основе проведенных испытаний было выявлено соединение-лидер, проявляющее наибольшую ингибирующую активность в отношении одной из изоформ ULK1/2.

Данная выпускная работа изложена на 69 страницах, включает в себя 28 рисунков, 12 схем химических реакций, 4 таблицы, список литературы состоит из 63 источников, включая зарубежные источники.

Abstract

The purpose of this final qualifying work is to repurpose the known EGFR tyrosine kinase ligand osimertinib and the late autophagy inhibitor chloroquine. The new derivatives may become potential clinical candidates for dual cancer therapy aimed at inhibiting ULK1/2 and reducing the functionality of enzymes in lysosomes. Also, new derivatives may have improved physicochemical properties, which will also increase their effectiveness.

The literature review describes the biological role of autophagy, the structure of ULK1/2 proteins, comparison of their amino acid sequences of active sites, signaling pathways in which these isoforms participate. Already existing ULK1/2 inhibitors and directions for the development of new scaffolds are described.

The experimental part describes the structure of the study design, methods for synthesizing the compounds under study, and methods for conducting biological tests.

Based on the results of biological tests, we obtained hit compound number 54, which exhibits inhibitory ability against one of the ULK1/2 isoforms.

This graduation work is presented on 69 pages, includes 28 figures, 12 chemical reaction diagrams, 4 tables, the bibliography consists of 63 sources, including foreign sources.

Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Биологическая роль аутофагии в жизни клетки	8
1.1.1 Микроаутофагия.....	9
1.1.2 Шаперон-опосредованная аутофагия	11
1.2 Сигнальный каскад активации аутофагии.....	13
1.3 Ингибиторы аутофагии, одобренные в клинической практике	15
1.4 Разработка ингибиторов ULK1/2	16
1.4.1 Производные 2,4-диаминопиримидина	20
1.4.2 Производные 3,5-диамино-1 <i>H</i> -индазола	24
1.4.3 Производные 1 <i>H</i> -индола	27
1.4.4 Производные хиназолин-2,4-диамина	29
2 Результаты и их обсуждение.....	35
2.1 Молекулярное моделирование	37
2.2 Синтез исследуемых соединений.....	49
2.3 Оценка биологической активности	51
3 Экспериментальная часть.....	55
3.1 Реагенты и оборудование.....	55
3.2 Синтез исходных соединений.....	55
3.3 Синтез целевых соединений	57
3.4 Биологические испытания.....	59
3.5 Компьютерное моделирование.....	61
Заключение	63
Список используемой литературы	64

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями.

Akt	альфа серин/треонин протеинкиназа,
AMPK	АМФ-активируемая протеинкиназа
Atg	белок, связанный с аутофагией
CMA	шаперон-опосредованная аутофагия
CQ	хлорохин
EC ₅₀	полумаксимальная эффективная концентрация
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
ERK	киназа, регулируемая внеклеточным сигналом
FDA	управление по контролю за продуктами и лекарствами
FIP200	ULK-взаимодействующий белок 200
HCQ	гидроксихлорохин
Hsp70	белок теплового шока 70
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования
LAMP-2A	лизосомально-ассоциированный мембранный белок 2A
LC3	убиквитин-подобный белок
mTOR	мишень рапамицина млекопитающих
PI3K	фосфатидилинозитол-3-киназа
SAR	соотношение структура-активность
TNBC	трижды негативный рак молочной железы
ULK1	Unc-51-подобная киназа 1
БП	болезнь Паркинсона

Введение

Гибель клеток может происходить посредством трех различных путей клеточного катаболизма, а именно апоптоза, аутофагии и некроза. Среди этих трех типов, аутофагия морфологически не подразумевает конденсацией хроматина, вместо этого данный процесс сопровождается образованием так называемые аутофагосомы (сферической структуры с двухслойной мембраной). Хотя апоптоз и аутофагия считаются двумя разными типами гибели клеток, часто активация данных процессов происходит одними и теми же белками. Например, различные молекулярные взаимодействия между апоптозом и аутофагией были исследованы в специфическом для апоптоза белке Beclin-1, семействе белков Bcl-2, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы, гомолог фосфатазы и тензина (PTEN), протеинкиназа B (Akt/PKB) и мишень рапамицина млекопитающих (mTOR). Следовательно, в определенных ситуациях многие сигнальные пути, регулирующие аутофагию, способны вызывать гибель клеток [1].

Недавние данные свидетельствуют о том, что аутофагия представляет собой регулируемую катаболическую структуру, позволяющую перерабатывать питательные вещества из поврежденных органелл и других клеточных компонентов посредством лизосомальной деградации. Этот механизм был связан с развитием различных патологических состояний, включая рак и неврологические расстройства; однако недавно обновленные исследования показали, что аутофагия играет двойную роль при раке, действуя как цитозащитный или цитотоксический механизм. Многочисленные доклинические и клинические исследования показали, что ингибирование аутофагии повышает эффективность противоопухолевых препаратов при различных злокачественных новообразованиях. Примером таких антагонистов, являются хлорохин и гидроксихлорохин, которые на данный момент разрешены в клинической практике, и применяются в

качестве комбинированной терапии, направленной на аутофагические процессы при раке [2].

Белки ULK1/2, ответственные за процесс сборки аутофагосом, являются единственными серин/треониновыми киназами в каноническом сигнальном каскаде и, тем самым, представляют собой потенциальные мишени при разработке лекарственных препаратов, нацеленных на ингибирование аутофагии [3].

Цель работы: поиск и синтез потенциальных ингибиторов ULK1/2, путем перепрофилирования ингибитора тирозинкиназы EGFR осимертиниба, а также оценка активности при помощи *in vitro* тестов.

Для достижения цели необходимо выполнить следующие задачи работы:

1. С помощью молекулярного моделирования провести стыковку исследуемых соединений в активный сайт мишеней ULK1/2, с целью оценки и сравнения способа связывания с нативным лигандом.

2. Провести синтез исходных 4-индол-2-ариламинопиримидинов и целевых соединений.

3. Оценить биологическую активность в отношении клеточных линий A549 и WI-26 VA4.

1 Литературный обзор

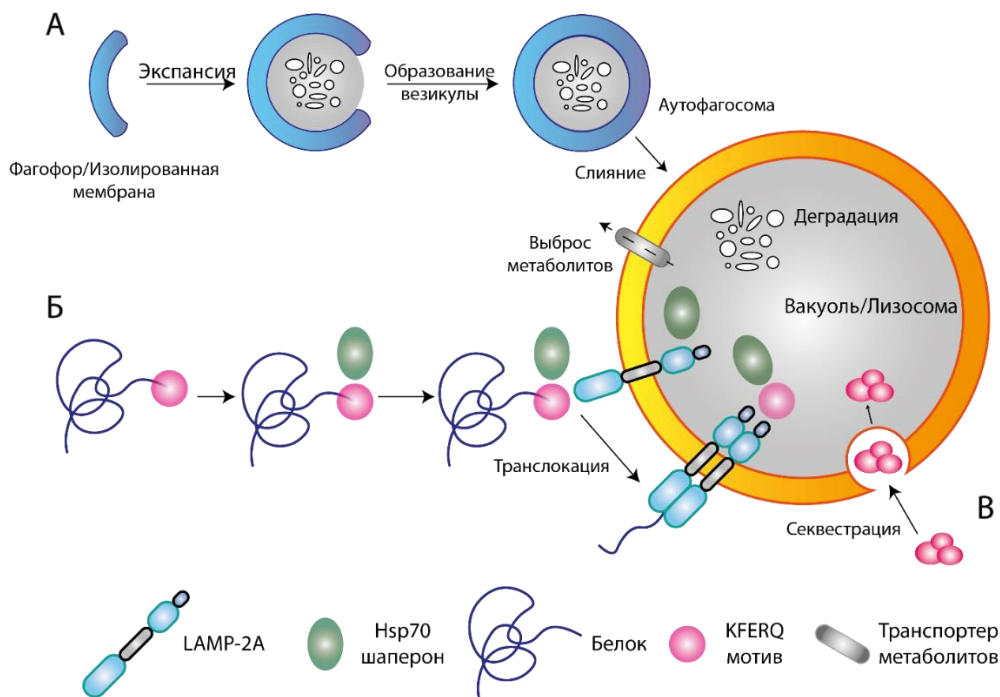
1.1 Биологическая роль аутофагии в жизни клетки

Макроаутофагия (далее именуемая аутофагией), часто понимается как деградирующий процесс клеток, но правильнее описывать её как путь рециркуляции веществ, чтобы подчеркнуть её важный вклад в физиологию клеток, который является центральным компонентом интегрированной реакции на стресс во всех эукариотических клетках [4]. Она обеспечивает деградацию поврежденных или устаревших органелл, долгоживущих макромолекул и белковых агрегатов, тем самым способствуя выживанию голодающих и подвергающихся стрессу клеток. Во время аутофагии фагофор поглощает груз, образуя везикулу с двойной мембраной, называемую аутофагосомой, которая затем сливается с лизосомой с образованием аутолизосомы, где поглощенный материал расщепляется, а образующие метаболиты рециркулируются в качестве источников энергии, либо как строительные блоки для синтеза новых макромолекул, как показано на рисунке 1 [5].

До сих пор были описаны три основных типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия (СМА) (рисунок 1). В этом разделе основное внимание будет уделено макроаутофагии, далее именуемой аутофагией [6].

Сравнивая многие раковые клетки со здоровыми, в случае первых, для них активация аутофагии, необходима для поддержания метаболизма, онкогенеза и устойчивости к терапии. Гиперактивация аутофагии характерна для опухолевых клеток, которая способствует их выживанию при стрессовой стимуляции, включая голодание, депривацию факторов роста, гипоксию, повреждающие стимулы и ингибирование протеасом. Также им требуется глутамин для поддержки митохондриального окислительного фосфорилирования и обеспечения метаболических промежуточных

продуктов, в то время как депривация глутамина и гипоксия возникают в опухолях, которые перерастают в существующую сосудистую сеть и ишемию [7].



А – Макроаутофагия; Б – Шаперон-опосредованная аутофагия; В – Микроаутофагия

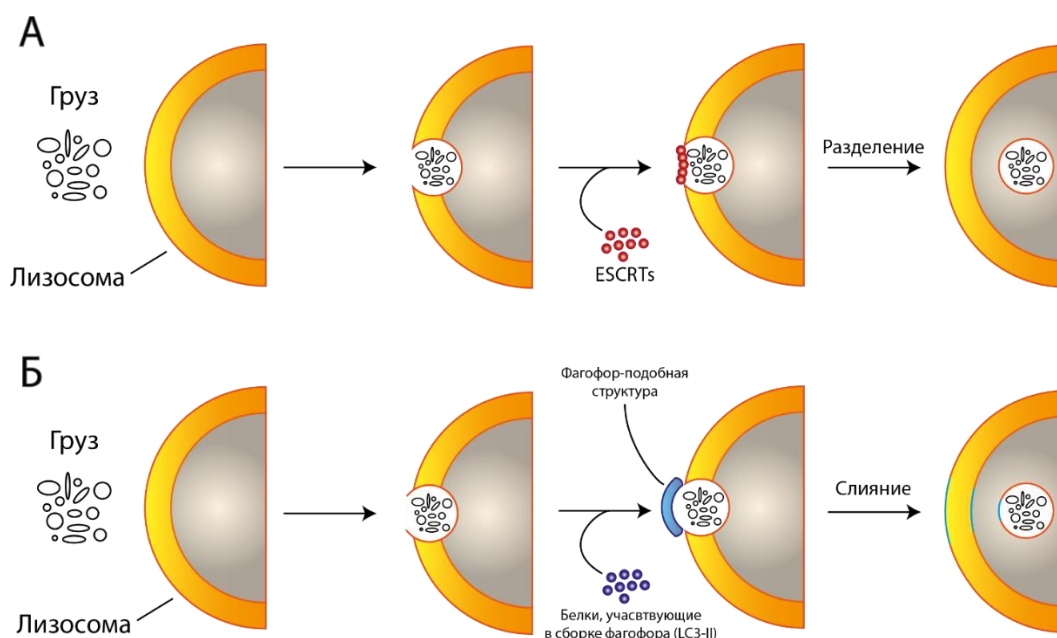
Рисунок 1 – Различные виды аутофагии [5]

1.1.1 Микроаутофагия

Микроаутофагия – это поглощение цитозольных соединений путем прямой инвагинации вакуолярной/лизосомальной мембраны, как показано на рисунке 2 [8]. Считается, что в этом типе цитоплазматическая секвестрация происходит за счет: (1) слияния лизосом с небольшими одностенными везикулами, (2) складок лизосомальной мембраны или (3) сочетание первого и второго фактора.

Этот процесс топологически эквивалентен инвагинации мембран при формировании мультивезикулярных тел и почкованию оболочечных вирусов. В случае микроаутофагии мембранные каналцы индуцируются при голодании [9]. Это динамичные и часто разветвленные структуры с резким

изломом вакуолярной мембраны в месте инвагинации. Поскольку просвет канальцев является продолжением цитоплазмы, отпочкование везикул от кончика канальцев приводит к образованию однослойных аутофагических телец, содержащих цитозоль.



А – Микроаутофагия типа расщепления; Б – Микроаутофагия типа слияния

Рисунок 2 – Изображение двух видов микроаутофагии

Эндосомальный сортирующий комплекс, необходимый для транспортной системы (ESCRT), первоначально был идентифицирован как участвующий в формировании внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярных телец. Комплекс ESCRT-0 связывается с убиквитинированными белками на эндосомальных мембранах и рекрутирует комплексы ESCRT-I и -II, вызывая сборку ESCRT-III, что способствует инвагинации, сужению и отторжению эндосомальных мембран. При микроаутофагии углеродное голодание после диауксического сдвига или инактивации TORC1 способствует рекрутированию ESCRT-0 на вакуолярные мембраны как показано на рисунке 2А. Второй механизм подобен слиянию аутофагосомы и лизосомы [10-11].

В свою очередь макроаутофагическая секвестрация контролируется аминокислотами, инсулином и глюкагоном, тогда как базальный процесс, по-видимому, подлежит только долгосрочной регуляции. Было показано [12], что у мышей деградация печеночных белков снижается в течение 48 часов голодания в связи с падением популяции вторичных лизосом, используемых в качестве маркера микроаутофагии. Сообщалось также, что белковый обмен снижается во время голодания в культивируемых фибробластах.

1.1.2 Шаперон-опосредованная аутофагия

Шаперон-опосредованная аутофагия (СМА) – это селективный процесс, при котором белки удаляются из цитозоля и доставляются в лизосомы для расщепления [13].

Субстраты для СМА определяются мотивом аминокислотной последовательности, называемым KFERQ; предполагается, что нацеливающая последовательность представляет собой глутамин (Q) на обоих концах, фланкированными гидрофобными группами фенилаланина (F), изолейцина (I), лейцина (L) или валина (V), кислотными остатками глутаминовой (E) и аспарагиновой кислотами (D), основными остатками аргинина (R), лизина (K) и второй гидрофобной или основной аминокислотной группой кислоты [14].

Данный механизм начинается с распознавания субстрата комплексом (рисунок 3) Hsc70 и других белков, посредством которого они образуют агрегат. Следующим шагом идет диффузия к гликопротеину лизосомальной мембраны LAMP-2A, который связывается с комплексом, после этого он разрушается, оставляя только свернутый белок, связанный с мембраной. Далее идет разворачивание белка с его транслокацией в лизосому и расщеплением, в котором участвуют лизосомальный шапероны Lys-hsp90, Lys-hsc70 и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) [15].

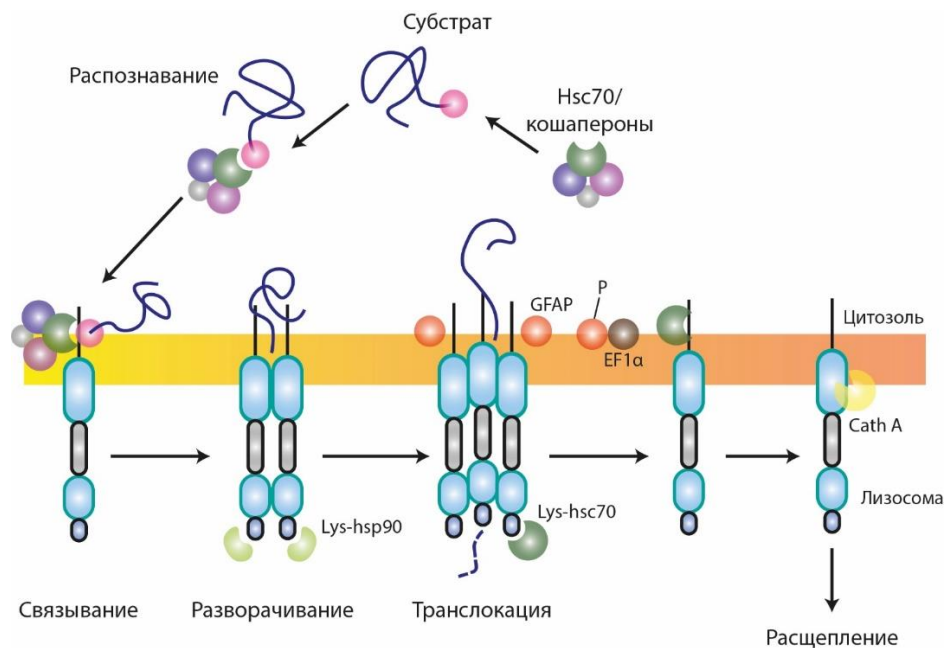


Рисунок 3 – Механизм шаперон-опосредованной аутофагии

Предполагается, что почти треть растворимых белков распознается этим путем, однако лишь незначительная часть этого протеома идентифицирована как субстраты СМА в раковых клетках. Дефекты в СМА были связаны с накоплением неправильно уложенных и патологических мутантных белков, вовлеченных в широкий спектр заболеваний человека, включая нейродегенеративные [16], метаболические нарушения [17], а также рак [18].

С этим же связано, что активность СМА резко снижается с возрастом, отчасти из-за изменений в лизосомном компартменте, которые делают LAMP-2A нестабильным. Исследования показали, что хроническая блокада СМА приводит к постоянной компенсаторной активации макроаутофагии даже в исходных условиях [19-21]. Также усиленная макроаутофагия была способна поддерживать нормальную скорость деградации белка и жизнеспособность клеток в нормальных условиях, но она не могла компенсировать отсутствие СМА при воздействии определенных стрессоров, таких как окислительные и прооксидантные условия или воздействие УФ,

где СМА – поврежденные клетки показали повышенную скорость гибели клеток за счет активации апоптоза [22, 23].

1.2 Сигнальный каскад активации аутофагии

При рассмотрении сигнального каскада активации аутофагии на рисунке 4, можно сделать вывод, что центральным звеном являются белковые комплексы, включающие в себя киназы ULK1/2, которые в свою очередь регулируются вышележащими комплексом mTORC1/2 и киназой AMPK [24].

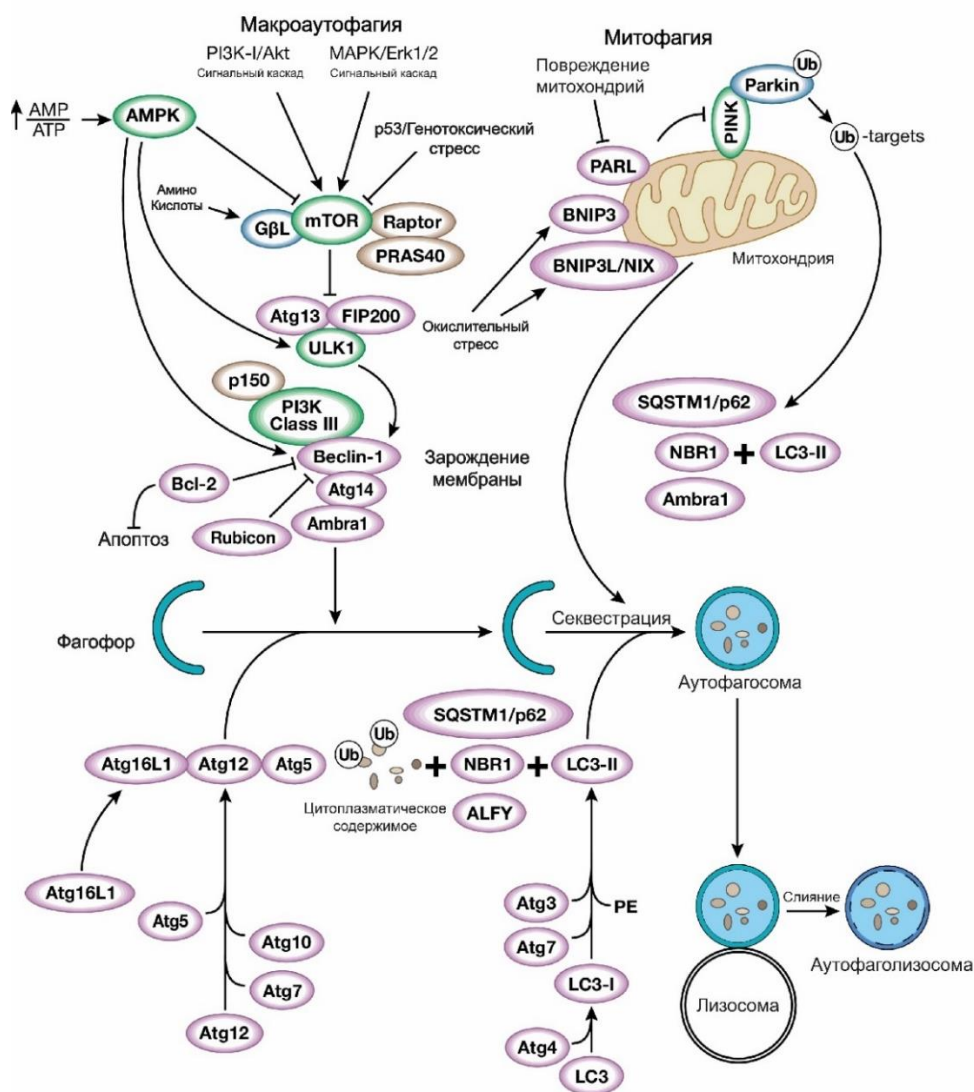


Рисунок 4 – Сигнальный каскад активации аутофагии

Белковый комплекс mTORC1, состоящий из 4 адапторных белков, работает как датчик АТФ и аминокислот, что позволяем ему сбалансировать доступность питательных веществ и рост клеток [25]. Было показано, что большинство сигналов, индуцирующих аутофагию, сходятся именно на уровне белковых комплексов mTOR (mTORC1 и mTORC2), которые координируют анаболические и катаболические процессы [26].

В свою очередь АМПК напрямую регулирует mTOR и, следовательно, способствует регуляции аутофагической активности. Более того, путь ERK/RSK [27], путь PI3K/АКТ, система аминокислотного сенсора RAG, а также гипоксия входят в число связанных с аутофагией путей. В нормальных условиях mTORC1 ограничивает аутофагическую активность за счет инактивации аутофагического комплекса ULK1/2. mTORC1-зависимое фосфорилирование ULK1 по участкам серина 637 и 757 в условиях, богатых питательными веществами, ингибирует активацию ULK1, нарушая его связывание с АМПК [28]. Однако при стрессе mTORC1 ингибируется, а комплекс ULK1/2 дефосфорилируется. Затем ULK1/2 фосфорилирует себя, Atg13 и FIP200 и активирует аутофагию путем фосфорилирования комплекса p150/PI3K/Bec1in-1, который в последствии организует сборку аутофагосомы [29, 30].

Как было сказано ранее, киназа АМПК в отличии от белкового комплекса mTORC1/2, способствует активации аутофагии. Ряд исследований подтвердил положительную регуляцию активности ULK1 посредством АМПК-зависимого фосфорилирования. Аминокислота серин 555 ULK1 является одним из основных сайтов АМПК-зависимого фосфорилирования. Кроме того, было идентифицировано несколько других сайтов АМПК-зависимого фосфорилирования, таких как серин 317, 467, 637, 777 и треонин 575 [31, 32].

Также было показано, что аминокислоты серин 317 и 777 регулируют киназную активность ULK1, а серин 467, 555 и треонин 574, отвечают за

регуляцию митохондриального гомеостаза во время голодания. S637 - это сайт, который фосфорилируют как mTORC1, так и AMPK [33].

Исходя из всего выше сказанного, можно сделать вывод, что UNC-51-подобная киназы 1/2 (ULK1/2), являются центральными иницирующими звеньями в каскаде аутофагии, которые могут рассматриваться как потенциальная мишени при разработке лекарственных препаратов для синергической терапии рака [34].

1.3 Ингибиторы аутофагии, одобренные в клинической практике

На сегодняшний день не существует FDA-одобренных ингибиторов ранней аутофагии или есть те, что проходят клинические испытания.

Например, хлорохин CQ (1) и гидроксихлорохин HCQ (2), производное CQ (рисунок 5), остаются единственными ингибиторами поздней аутофагии, одобренными FDA. Успешные клинические испытания показали, что CQ и особенно HCQ повышают потенциал комбинированной противораковой терапии за счет повышения чувствительности опухолевых клеток. Механизм их действия заключается в препятствии сливания аутофагосомы с лизосомой [35]. На данный момент существует множество аналогов хлорохина с меньшими значениями EC₅₀ [36].

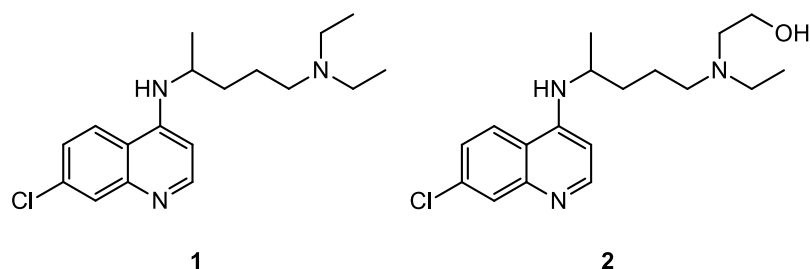


Рисунок 5 – Структурные формулы хлорохина и гидроксихлорохина

Механизм действия CQ очень прост, он свободно диффундирует через лизосомальную мембрану, а затем протонируется по одной или двум

аминогруппам и улавливается внутри в виде соли, которая уже не может уйти путем диффузии в цитозоль. Удаление свободных ионов водорода с помощью CQ увеличивает основность лизосомы и делает лизосомальные гидролазы и протеазы, которые зависят от низкого pH, нефункциональными. Нарушение лизосомальных ферментов, вызванных CQ, предотвращает деградацию поглощенных материалов, тем самым ингибируя финальную стадию завершения аутофагии. Следовательно, аутофагия больше не способствует выживанию клеток, а опухолевые клетки, обработанные CQ, становятся сенсibilизированными ко многим терапевтическим препаратам [37].

Было показано, что CQ эффективно снижает способность клеток трижды негативного рака молочной железы (TNBC) метастазировать *in vitro* и в модели ксенотрансплантата TNBC (*англ.* Triple Negative Breast Cancer). К тому же, CQ эффективно воздействует на раковые стволовые клетки (CSCs) посредством ингибирования аутофагии, структурных повреждений митохондрий и нарушения восстановления двухцепочечных разрывов ДНК. Такое комбинированное лечение значительно снижает экспрессию белков репарации ДНК в субпопуляциях CSCs, что приводит к снижению роста опухоли в ортотопических ксенотрансплантатах TNBC дикого типа [38, 39].

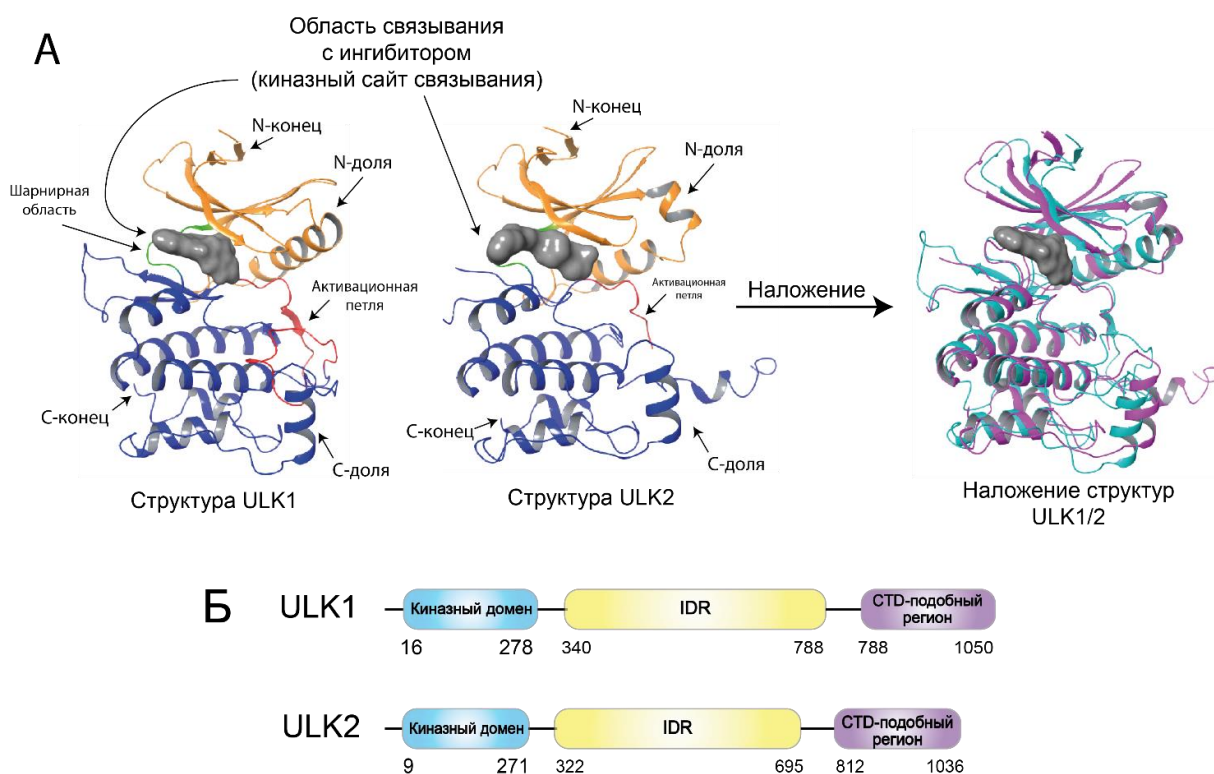
Из-за того, что CQ и его производные являются поздними ингибиторами аутофагии, ученые стали ориентироваться на вышележащие мишени ранней аутофагии, такие как ULK1/2.

1.4 Разработка ингибиторов ULK1/2

UNC 51-подобная киназа 1 (ULK1) и его изоформа ULK2 (рисунок 6), являются важными звеньями каскада аутофагии для поддержания жизнеспособности клеток и гомеостаза, как упоминалось ранее [40]. Данные белки имеют массу порядка 112 кДа, а разница их аминокислотной последовательности составляет 15 АК. Для ULK1/2 характерны следующие

домены: киназный, участок связывания с GABARAP и С-терминальный домен, опосредующий взаимодействие с SESN2. В этом разделе основное внимание будет уделено именно киназному домену [41].

Киназный домен белков имеет несколько областей, которые соответствуют классу киназ, это сайт связывания с АТФ, активационная петля, включающая в себя мотив DFG (аспарагиновая кислота, фенилаланин, глицин), на который нацелена большая часть ингибиторов, и шарнирная область.



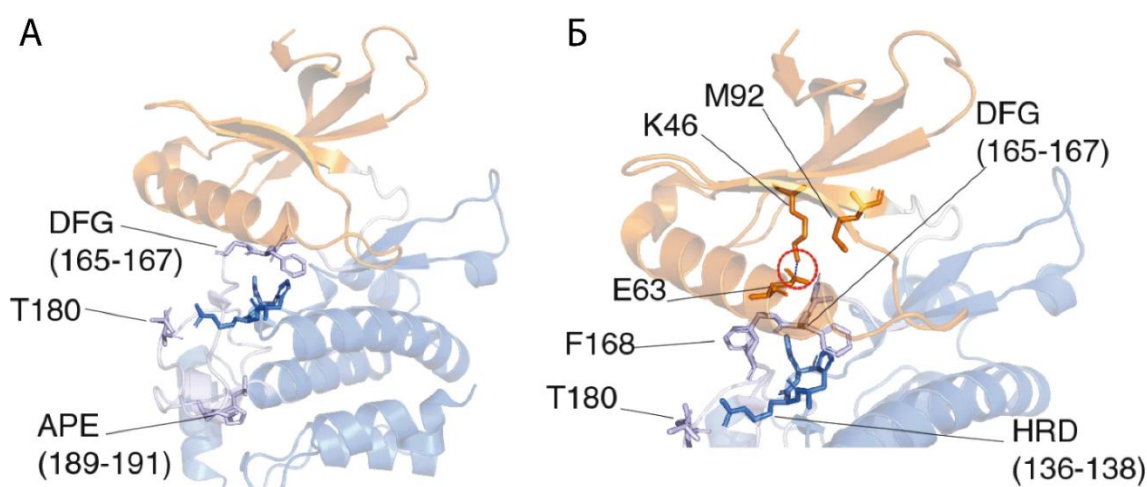
А – Структура киназных доменов ULK1 показана синим цветом [PDB ID: 6QAS], ULK2 фиолетовым [PDB ID: 6QAT]; Б – Домены ULK1/2

Рисунок 6 – Структура белков ULK1/2 и их доменов

Было показано, что петля активации ULK1 включает инвариантный киназный мотив DFG (Asp165-Phe166-Gly167) и простирается до мотива APE (Ala189-Pro190-Glu191) как показано на рисунке 7 [42].

Петля активации обычно образует щель для связывания субстрата, когда киназа находится в активной конформации «DFG-out», то есть

фосфорилированной по Thr180. Здесь, связанные субстраты образуют специфические взаимодействия с консервативным мотивом HRD (His136-Arg137-Asp138 в ULK1). Причем активное состояние обычно представляет собой солевой мостик между консервативным лизином в цепи $\beta 3$ (K46 в ULK1) и остатком глутамата (E63) в С-спирали, однако у ULK2 солевой мостик между K48 и E56 не образуется, так как расстояние между ними составляет порядка 20 Å [43].



А – T180, DFG (165–167) и APE (189–191) мотивы; Б – Солевой мостик, образующийся между лизином (K46) и E63 в N-доле показаны оранжевым цветом вместе с метионином-привратником (M92)

Рисунок 7 – Мотивы белков ULK1/2

Также как и многие киназы, ULK1/2 содержит привратник в активном сайте, которому соответствует Met92 в ULK1 и Met85 в ULK2. Было показано, что мутации остатков привратников в других киназах связаны с развитием химиотерапевтической резистентности.

Исходя из всего вышесказанного, можно сделать вывод, что ULK1/2 имеют не только схожие структуры укладки, но и одинаковые сайты. Если сравнить их аминокислотную последовательность киназных доменов, которые имеют одинаковое количество АК, схожесть составит 79% (рассчитано с помощью BLASTp), что указывает на сложность разработки

селективных ингибиторов, направленных на одну изоформу. На рисунке 8 изображены последовательности двух изоформ, где «+» – несовпадение, а буквы, выделенным красным цветом совпадение АК.

ULK1	1	FSRKDLIGHGAFVVFVKGRHREKHDLEVAVKNCINKNLAKSQTLGKEIKILKELKHENI	60
		+S++DL+GHGAFVVF+GRHR+K+D+EVA+K+INKKNL+KSQ+LLGKEIKILKEL+HENI	
ULK2	1	YSKRDLVGHGAFVVFGRHRQKTDWEVAIKSINKKNLSKSQILLGKEIKILKELQHENI	60
ULK1	61	VALYDFQEMANSVYLVMEYCNGGDLADYLHAMRTLSEDTIRLFLQQIAGAMRLLHSKGII	120
		VALYD+QE++NSV+LVMEYCNGGDLADYL+A++TLSEDTIR+FL+QIA+AMR+LHSGKII	
ULK2	61	VALYDVQELPNSVFLVMEYCNGGDLADYLQAKGTSEDTIRVFLHQIAAAMRILHSGKII	120
ULK1	121	HRDLKPQNILLSNPAGRRANPNSIRVKIADFGFARYLQSNMMAATLCGSPMYMAPEVIMS	180
		HRDLKPQNILLS++++R+++++IR+KIADFGFARYL+SNMMAATLCGSPMYMAPEVIMS	
ULK2	121	HRDLKPQNILLSYANRRKSSVSGIRIKIADFGFARYLHSNMMAATLCGSPMYMAPEVIMS	180
ULK1	181	QHYDYGKADLWSIGTIVYQCLTGKAPFQASSPQDLRLFYEKNKTLVPTIPRETSAPLRQLL	240
		QHYD+KADLWSIGT++YQCL+GK+PFQA+SPQDLR+FYEKN++L+P+IPRETS++L++LL	
ULK2	181	QHYDAKADLWSIGTVIYQCLVGKPPFQANSPQDLRMFYEKNRSLMPSIPRETSPLYANLL	240
ULK1	241	LALLQRNHKDRMDFEFFHHPFL	263
		L+LLQRN+KDRMDF++FF+HPFL	
ULK2	241	LGLLQRNQKDRMDFEAFSSHHPFL	263

Рисунок 8 – Аминокислотные последовательности ULK1/2, где «+» несовпадение, а буквы, выделенным красным цветом совпадение АК.

К сожалению, на данный момент не существует FDA-одобренных селективных ингибиторов ранней аутофагии по отношению к конкретным изоформам. Использование хлорохина и гидроксихлорохина, которые раскрывают потенциал ингибиторов в комбинированном лечении, не всегда проявляет положительный эффект. Исходя из этого встает вопрос о разработке новых и высокоэффективных ингибиторов ранней аутофагии, нацеленных на ULK1/2.

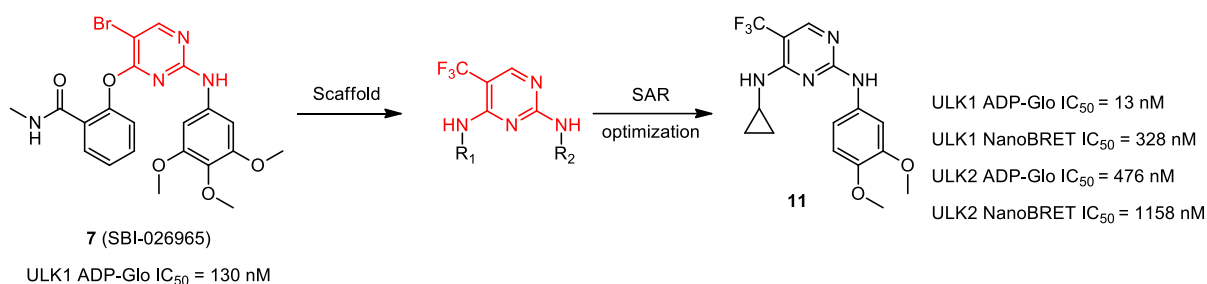
Решением данной проблемы может стать разработка соединений, которые будут связываться с консервативными АК киназного сайта ULK1/2, данный способ борьбы с данной проблемой, является одним из перспективных. Кроме того, создание массивных ингибиторов, которые дополнительно связываются вне сайта связывания АТФ, также остается отличным подходом.

Также важно провести дополнительные исследования по взаимодействию подобных соединений с другими биологическими мишенями в организме, чтобы избежать нежелательных побочных эффектов.

1.4.1 Производные 2,4-диаминопиримидина

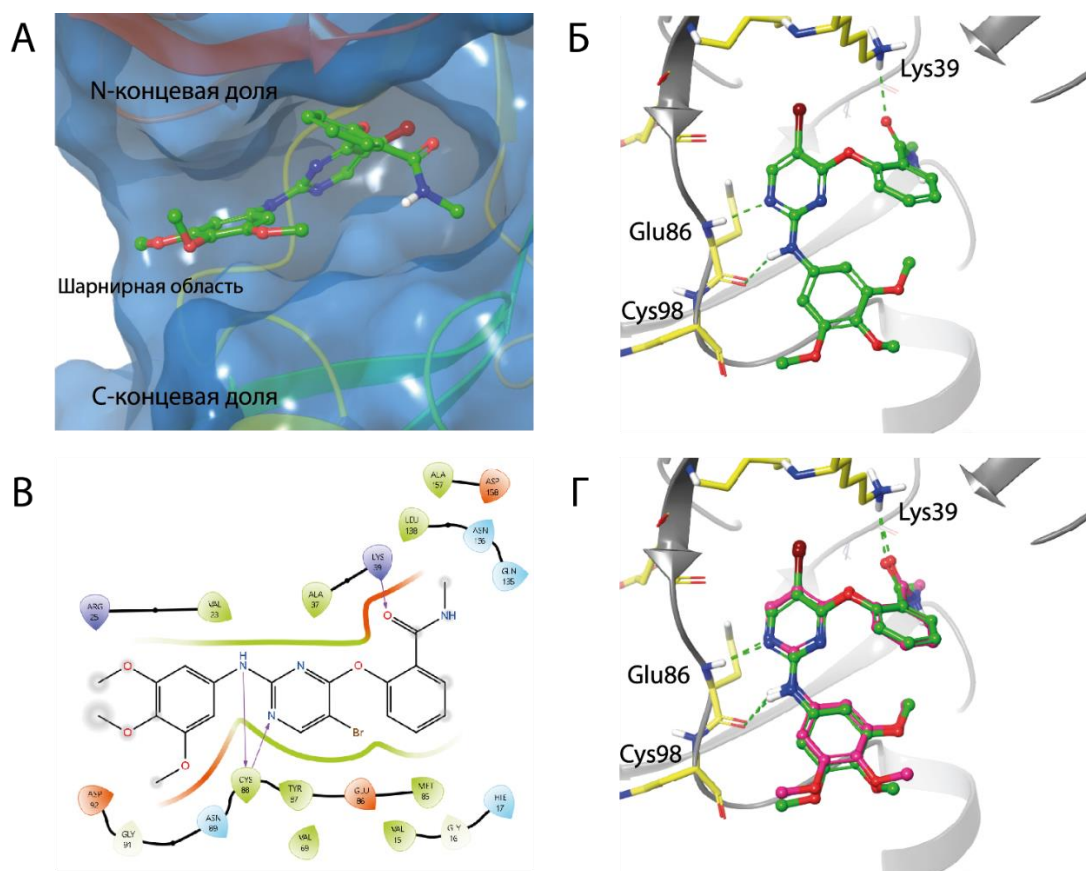
Авторы публикации [44], основываясь на структуре ULK2 и ранее разработанном ингибиторе **7**, создали аналог **11**, обладающий двойной специфичностью к ULK1/2 (схема 1). Их соединение занимает сайт связывания АТФ и значения IC_{50} измеренных с помощью NanoBRET составляют 328 нМ для ULK1 и 1158 нМ для ULK2.

Схема 1



Соединение **7** является ингибитором, разработанным в их прошлой публикации [3], под номером SBI-0206965 соответствовал размерам сайта связывания АТФ с высокой степенью конкурентного заполнения (рисунок 9А). Амидный заместитель *N*-метилбензамидного кольца простирается в сторону каталитических остатков петли DFG (рисунок 9Б). Триметоксифенильное кольцо располагалось вдоль шарнира в направлении области связывающего кармана, открытой для растворителя. Атом брома пиримидинового каркаса в свою очередь заполнил полость «заднего кармана» привратника Met85. Триметоксифенильное и пиримидинильное кольца SBI-0206965 имели почти компланарную геометрию, тогда как кольцо *N*-метилбензамида было повернуто на $\sim 6^\circ$ из плоскости. В целом,

SBI-0206965 принял режим связывания типа I, нацеленный на активную конформацию ULK1/2.



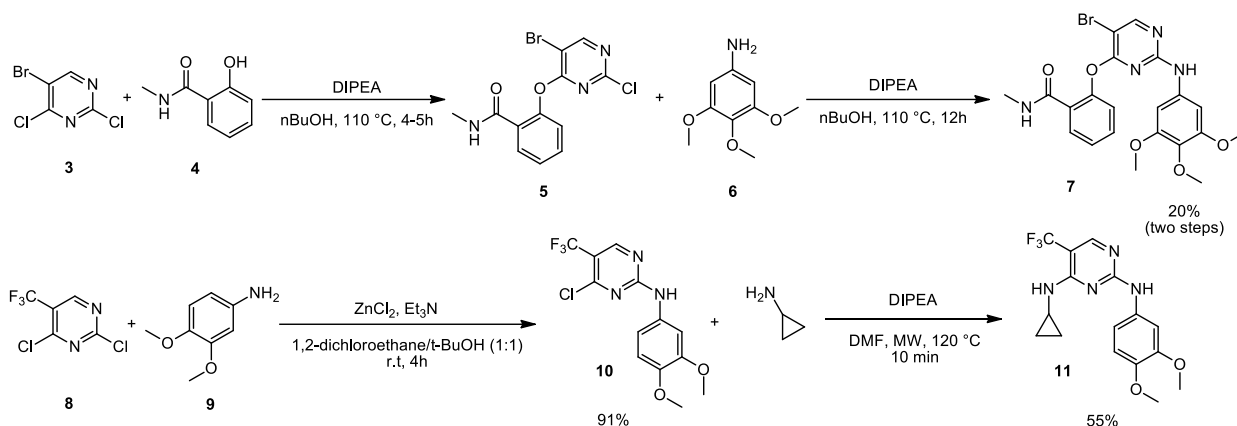
А – Кристаллическая структура SBI-0206965, связывающегося в шарнирной области киназного сайта ULK2 на расстоянии 2.7 Å [ID PDB: 6YID]; Б – SBI-0206965 (**7**) образует водородные связи с Cys98 в шарнирной области; В – Указаны подробные взаимодействия с шарнирной областью и Lys39; Г – *in silico* стыковка соединения **7** с кристаллической структурой ULK2 (зеленый цвет - нативная конформация, красный - получившиеся в ходе докинга)

Рисунок 9 - Кристаллическая структура киназного домена ULK2, связанного с соединением SBI-0206965 (**7**)

Все ингибиторы ULK1, представленные авторами, значительно снижали фосфорилирование VPS34 (на ~70-80%), при этом соединение **11** имело наибольший эффект (ингибирование ~90%). Обработка **7** снижала фосфорилирование Veslin-1 на ~30% по сравнению с контролем (ДМСО). Было показано, что **11** соединение обладало наиболее выраженным эффектом ингибирования фосфорилирования Veslin-1 примерно на 60%.

Также анализы пролиферации на клеточной культуре MDA-MB-468 подтвердили, что соединение **11** эффективно ингибирует рост клеток. Синтез соединения **7** и **11** представлен на схеме 2.

Схема 2



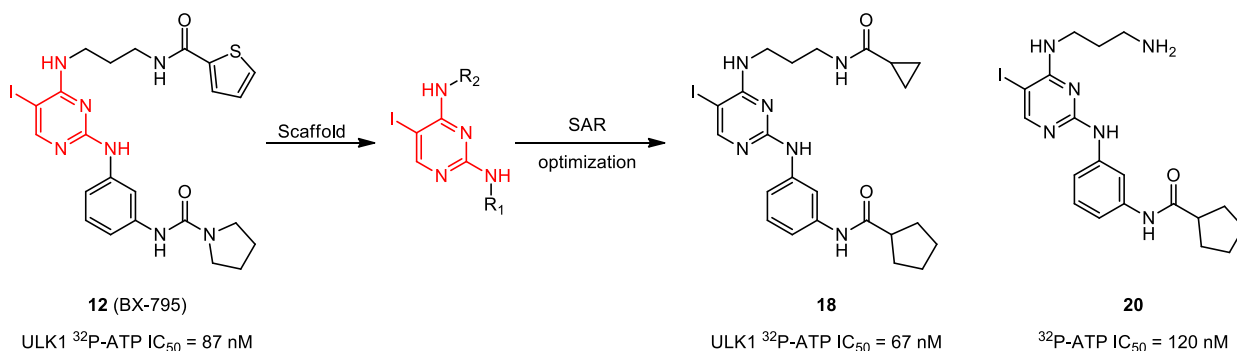
Соединение **10** получали реакцией нуклеофильного замещения по второму положению пиримидина в присутствии хлорида цинка и триэтиламина в мягких условиях. После соединения **10** так же подвергли реакции нуклеофильного замещения уже по 4-му положению в DMF при микроволновом нагреве в течении 10 минут с получением соединения **11**.

Другие авторы [45], также использовали диаминопиримидиновый скаффолд и получили два соединения **18** и **20** с наилучшими значениями IC_{50} чем предыдущие авторы (схема 3). Ингибиторы занимают активный киназный сайт ULK1 (рисунок 10), а значения для ULK1 $IC_{50} = 67$ нМ для **18** и $IC_{50} = 120$ нМ для **20**.

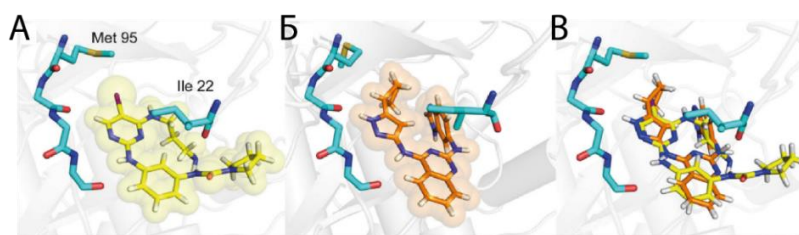
Их путь начался серии высокоэффективных ингибиторов активного центра на основе хиназолиндиамина, однако эти соединения не были селективными по отношению к ULK1. В попытках улучшить селективность по отношению к одной изоформе на аминокиназолиновом ядре не увенчались успехом. Поэтому они решили отойти от идеи использования данного гетероцикла и перешли на классический класс соединений, которые также

показали активность в их первоначальном скрининге, содержащие 2,4-диаминопиримидиновый каркас: **12** (BX-79523).

Схема 3



После SAR оптимизации соединения меньшего размера показали хорошую эффективность против ULK1, демонстрируя значения IC₅₀ около 100 нМ или выше, включая соединение **18**, которое было более эффективным, чем BX-795, против ULK1. Меньшее соединение **20** было не таким мощным, но существенно меньшим по размерам, чем BX-795, и идеально подходило для структурных исследований. Кроме того, соединение **20** продемонстрировало резко сниженную эффективность в отношении PDK1 и хорошую селективность по всему киному.

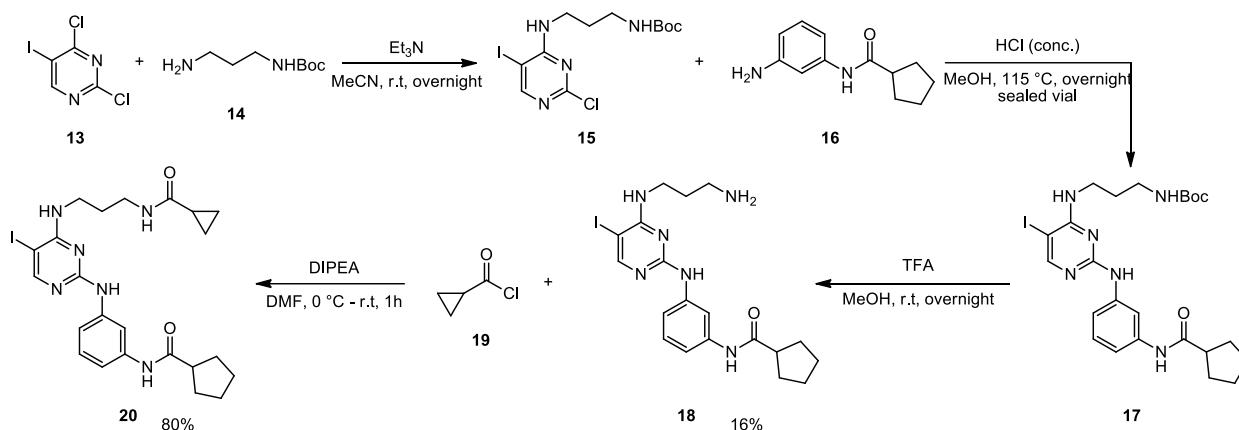


А – Структура соединения **20**, связанного с ULK1 [PDB ID: 4WNP]. Показаны ключевые боковые цепи (голубой), которые окружают соединение (показано желтым) в активном сайте; Б – Ранее сообщенная структура соединения **18**, связанного с ULK1; В – Наложение двух комплексов ингибиторов: показана киназа и боковые цепи комплекса соединения **20**

Рисунок 10 – Структура ULK1, связанного с ингибиторами

Соединение **15** получают реакцией нуклеофильного замещения из **13** и **14** соединения в ацетонитриле. После полученного соединение **15** взаимодействует с **16** в кислой среде путем протонирования имида пиридинового кольца для облегчения реакция нуклеофильного замещения во втором положении. Для снятия защитной группы (трет-бутоксикарбонильной) используют TFA и оставляют на всю ночь при комнатной температуре перемешиваться с получением соединения **18**, которое впоследствии реагирует с хлорангридидом **19** в присутствии основания Хюннига в DMF с получением соединения **20** (схема 4).

Схема 4



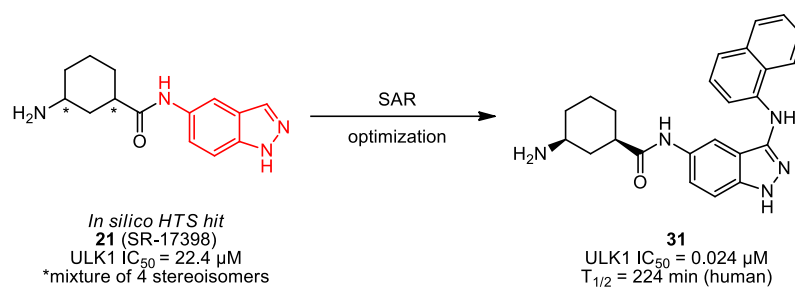
1.4.2 Производные 3,5-диамино-1H-индазола

Интересный структуру ингибитора ULK1 представили авторы публикации [46], используя *in silico* HTS подход и 650 тысяч соединений, они идентифицировали хит соединение **21**, где в качестве скаффолда выступал 1H-индол-5-амин (схема 5).

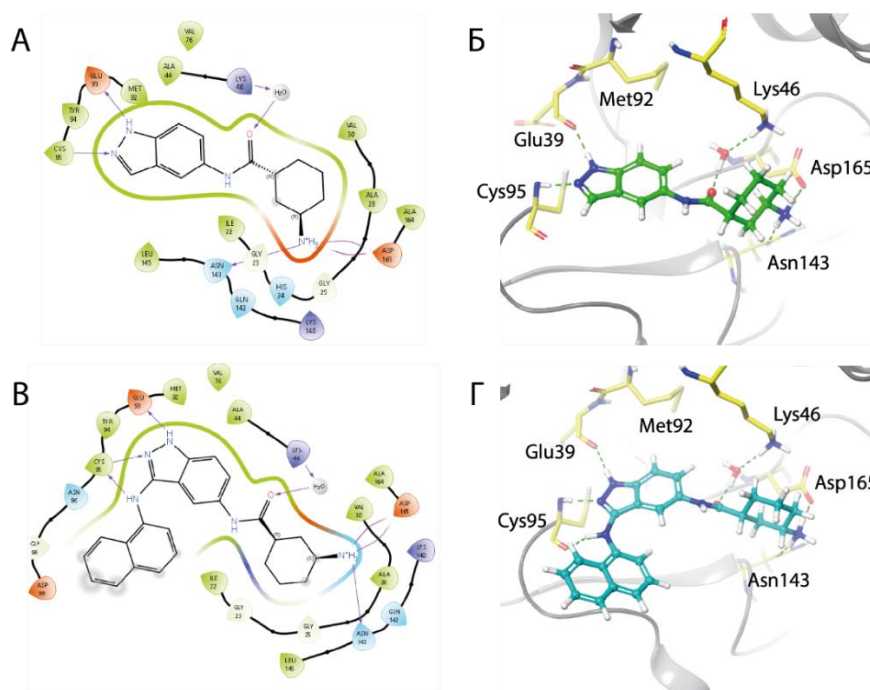
Модели стыковки авторов предсказывали, что амин в 3-ем положении **21** соединения будет взаимодействовать по средствам водородных связей с Cys95 в АТФ-связывающем домене. Вторая цель заключалась в модификации 3-аминоциклогексанового звена путем устранения

стереоцентров. Для достижения этой цели ученые исследовали положение стыковки различных структур, способных поддерживать два взаимодействия *H*-связей: одно с Lys46, а второе с Asn134 или проксимальным остатком.

Схема 5



Было показано, что соединение **21** связывается с шарнирной областью активного сайта ULK1, как показано на рисунке 11В.



А, Б - 2D диаграмма взаимодействия лиганда **21** (SR-17398), выбранного на основе анализа лучших кандидатов и лидирующее соединение **31**; В, Г - Докинг **21** и SAR-оптимизированного **31** в кристаллической структуре ULK1 [PDB ID: 4WNP]

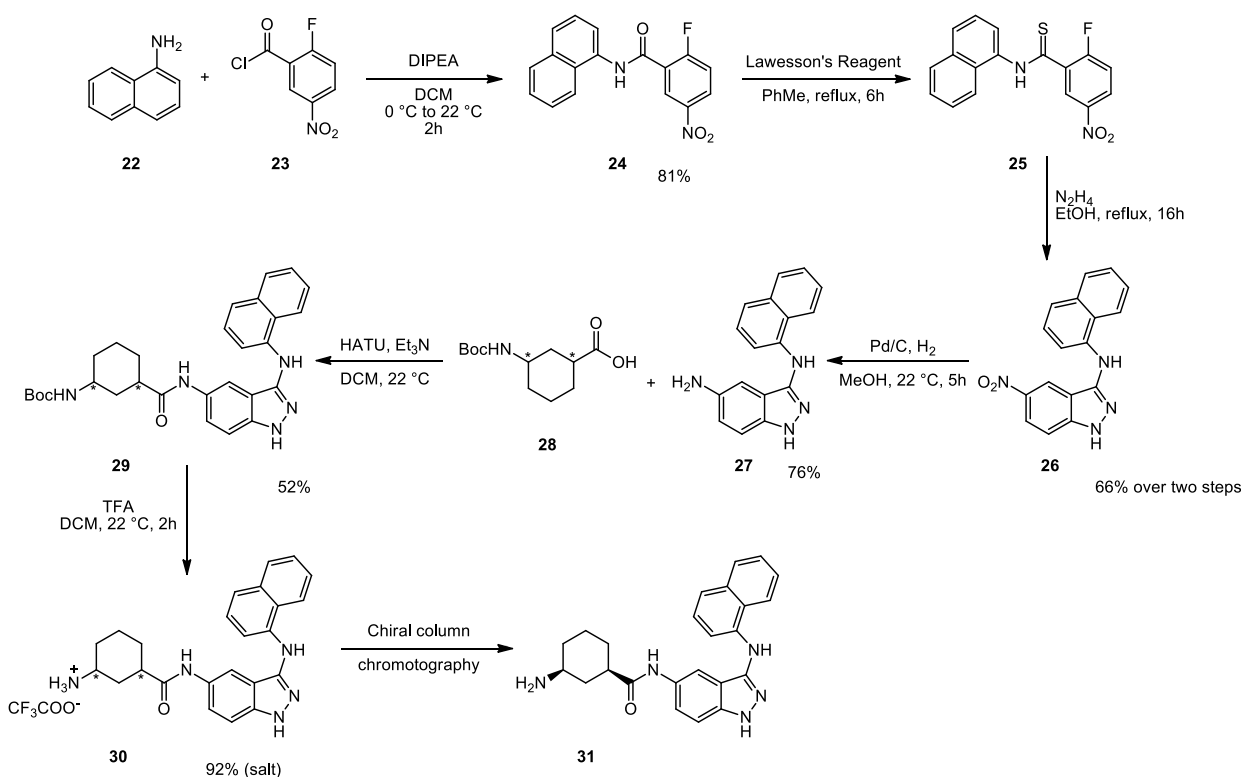
Рисунок 11 – Структуры соединений **21** и **31**, вместе с их режимами связывания

После проведенной SAR оптимизации лидирующее соединение **31** ингибировало ULK1 со значением $IC_{50} = 45$ нМ (значение IC_{50} измерено с помощью AlphaScreen). Оно показало превосходную стабильность в микросомах человека ($t_{1/2} = 224.6$ мин), крысы ($t_{1/2} = 178.4$ мин) и мыши ($t_{1/2} = 110.5$ мин), а также продемонстрировало незначительное ингибирование CYP P450 (1A2 = 31 %; 2C9 = -6 %; 2D6 = 20%; 3A4 = 15%; при концентрации в 10 мкМ).

Таким образом, авторы использовали комбинацию биохимических данных вместе с позами для стыковки, чтобы проверить гипотезу о структурных изменениях, способных улучшить ингибирующую активность ULK1 в этом ряду соединений.

Синтез соединения **31** представлен на схеме 6.

Схема 6



Соединение **24** получают путем амидирования исходных соединений **22** и **23** в присутствии основания Хюннига в течении 2 часов. После полученное соединение **24** вступает в реакцию с тионирующим агентом с получением продукта **25**, которое впоследствии реагирует с гидразином в этаноле при нагревании в течении 16 часов. **26** соединение получается путем нуклеофильного замещения фтора на гидразин и последующей циклизацией с тиаамидом с отщеплением сероводорода и последующей ароматизацией. После этого нитро группу **26** соединения восстанавливают водородом и палладиевым катализатором на углеводе с получение **27**. Последовательность реакции между **27** и **28** соединением, где используется активатор карбонильной группы NHTU с защищенным амином (исключая получение дизаменного продукта), дает продукт амидирования **29**. После полученного **29** соединение обрабатывают TFA, для снятия защитной группы Boc, получая продукт **30** (в виде соли) с почти количественным выходом.

Однако **30** соединение это смесь стереоизомеров, имеющая $IC_{50} = 11$ нМ. Для очистки смеси использовалась хиральная колончатая хроматография, с помощью которой получили **31** соединение (1R, 3S)-изомера.

1.4.3 Производные 1*H*-индола

Авторы публикации [47], разработали довольно простой ингибитор ULK1 (рисунок 12) по сравнению со структура предыдущих статей. Соединение **37** стало хитом путем виртуального скрининга на основе структуры из 600 вариантов. Соединение **37** связывается в киназном домене на наномолярном уровне $IC_{50} = 26.6$ нМ. Детальное изучение предсказанных сайтов связывания **37** с ULK1 показало, что **37** может образовывать H-связи с Lys46, Tyr94 и Asp165 ULK1.

Более того, единственный известный функциональный гомолог ULK1 у млекопитающих ULK2, в этом анализе ингибировался почти так же хорошо, как и ULK1 с $IC_{50} = 70.9$ нМ. Оценка пролиферации, апоптоза и

ингибирования аутофагии (с помощью слитого GFP-LC3) проводилась на клетках НСС (клетки гепатоцеллюлярной карциномы).

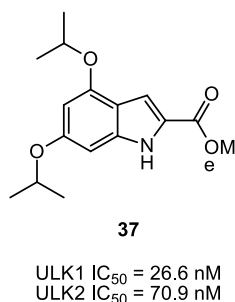
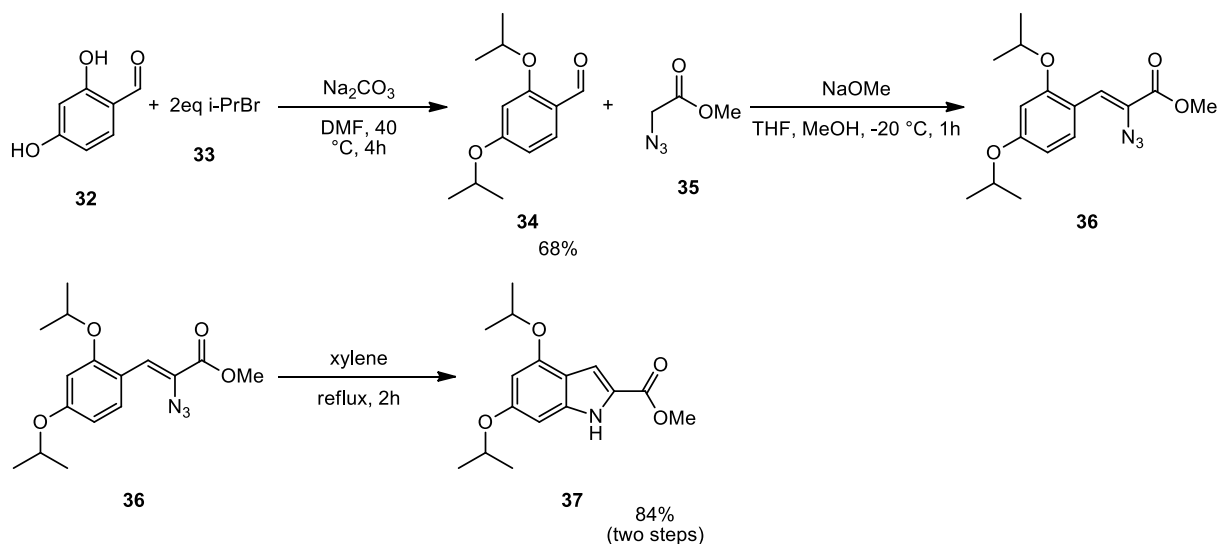


Рисунок 12 – Структура соединения хита **37** [47]

К тому же, **37** снижал активность клеточной инвазии клеток НерG2, первичных клеток НСС, свежесыведенных из опухолей пациента, и клеток Нер3В. Синтез соединения **37** представлен на схеме 7.

Схема 7



Соединение **34** получают реакцией Вильямсона путем образования алкоколята и последующим присоединением алкилгалогенида. После этого соединение **34** и **35** вступают в так называемую альдольно-критоновою

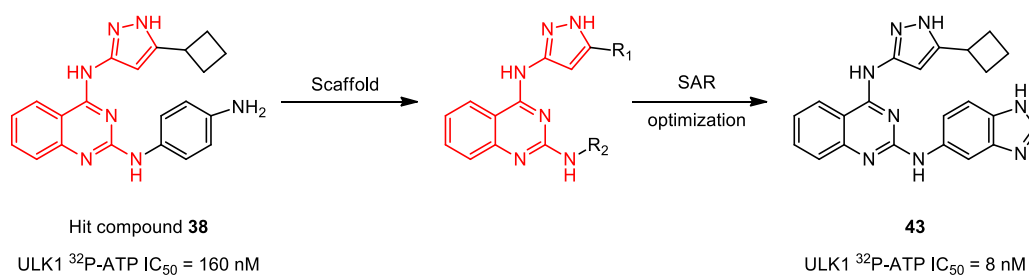
конденсацию с получением соединения **36**. Финальной стадией идет образование индольного гетероцикла путем нагревания **36** соединения в ксилоле в течении 2 часов, путем нагревание азидная группа распадается на свободны азот и образуется нитрен, имеющий как свободную р-орбиталь так и занятую, то есть проявляет электрофильные и нуклеофильные свойства. В этот момент карбен электрофильно присоединяется к бензольному кольцу (так как оно активировано двумя *i*PrO-группами) и после этого протонируется по азоту с образованием соединения **37**.

1.4.4 Производные хиназолин-2,4-диамина

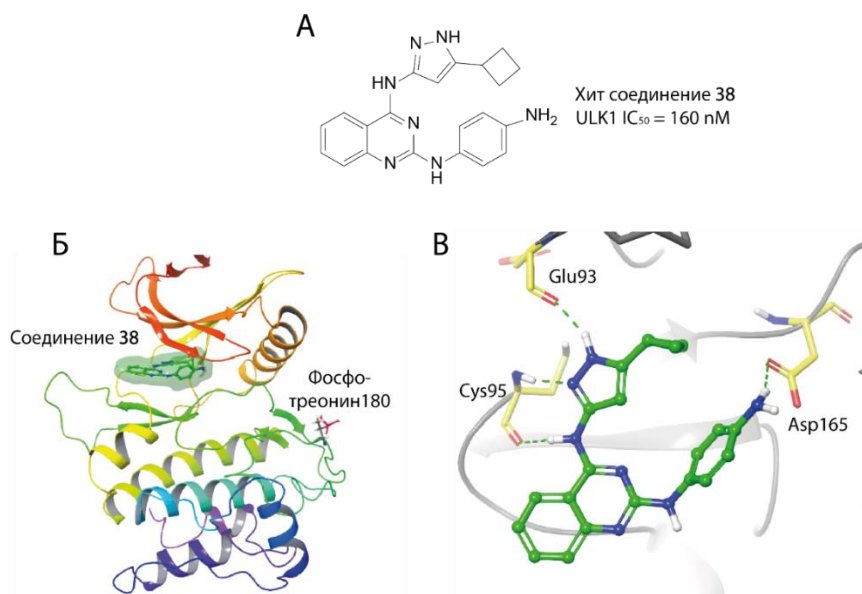
Авторы [48], проведя скрининг 764 соединений с помощью ³²P-АТФ радиоактивного метода оценки ингибирования, обнаружили хит, скаффолдом которого является хиназолин-2,4-диамин. Среди лучших совпадений, которые выявили авторы, были многочисленные пиразоламинохиназолины, примером которых является соединение **38** (схема 8), которое при повторном тестировании в дозозависимом анализе ингибировало ULK1 с IC₅₀ = 160 нМ.

Хиназолин окружен в положении 6 гидрофобной областью сайта и в положении 7 рядом боковых цепей партнера кристаллографической симметрии. В соответствии с этой стерической обструкцией ни одно соединение с заместителями в этих положениях не проявило какой-либо активности против ULK1 в их первоначальном скрининге ингибиторов. Из этого можно сделать вывод, что заместители, которые будут отвечать за селективность связывания с ULK1 должны находится во R₁ и R₂ положении (схема 8).

Схема 8



Соединение **38** связывается с сайтом связывания АТФ, образуя водородные связи между шарнирной областью и аминопиразольным ядром (рисунок 13В).



А – Структура хита, выявленного на скрининге; Б – Общая структура ULK1 [PDB ID: 4WNO]. Ключевые особенности: фосфорилированный треонин в петле активации, ингибиторе и междольковой петле; В – Соединение **38** в киназном домене ULK1 [PDB ID: 4WNO]. Ключевые остатки, контактирующие с ингибитором, помечены и показаны зеленым цветом

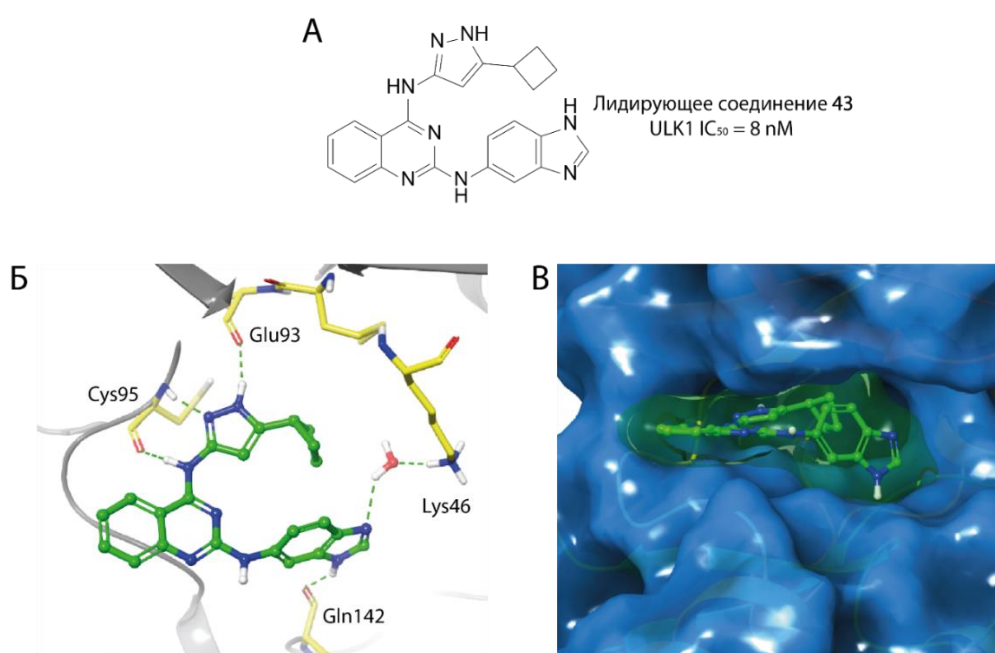
Рисунок 13 – Структура ULK1, связанного с низкомолекулярным ингибитором **38**

В первоначальных данных скрининга авторы заметили, что соединения с циклопропильным или циклобутильным кольцом в положении R₁ проявляло повышенную активность по отношению к ULK1/2, чем любое производное с циклопентаном.

Поэтому они использовали циклобутильную группу в положении R₁, чтобы максимизировать объем и воспользоваться преимуществом относительно гибкого остатка метионинового привратника. Сохраняя R₁ постоянным как циклобутильное кольцо, синтезировали ряд аналогов, различающихся по R₂. Ряд соединений продемонстрировал значительное

улучшение эффективности, что привело к лучшему ингибитору, соединению **43**. Кроме того, бензоимидазольный фрагмент образует водородные связи с Lys46 и Asn143 вблизи мотива DFG, в то время как заместитель циклобутила или циклопропила в случае **43** вписывается в карман, прилегающий к метионину-привратнику (рисунок 13В).

В активном сайте наибольшее изменение происходит с Gln142/Asp165 в DFG-мотиве (рисунок 14Б), боковая цепь которого прилегает к киназе, чтобы вместить более объемный бензимидазол. Молекула воды занимает место, ранее занимаемое аспарагиновой кислотой, и образует опосредованную водой водородную связь между бензимидазолом и Lys46. Также оказывается, что бензимидазол образует, вероятно, водородную связь с карбонилем основной цепи Gln142. Наконец, метионин-привратник отодвигается немного дальше назад в задний гидрофобный карман благодаря более объемному циклобутильному кольцу.



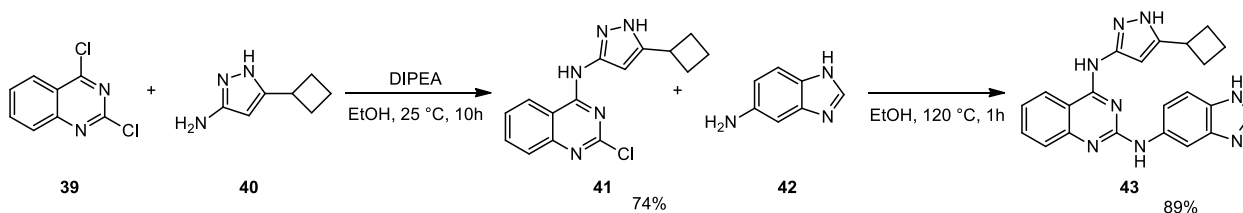
А - Структура соединения **43**; Б - Ключевые взаимодействия между ингибитором и белком включают упорядоченную молекулу воды, которая соединяет бензимидазол с каталитическим лизином [PDB ID: 4WNO]; В - Вид на поверхность **43**, связанного с ULK1. Соединение показано зеленым цветом с отрисовкой сферы

Рисунок 14 – Структура ULK1, связанного с соединением **43**

Также дифференциальная сканирующая флуориметрия подтвердила, что ингибитор резко стабилизировал фермент. Соединение **43** имеет $IC_{50} = 8$ нМ (^{32}P -АТФ метод) относительно ULK1. Синтез соединения **43** представлен на схеме 9.

Соединение **41** получают путем реакции нуклеофильного замещения по 4-му положению хиназолинового гетероцикла в мягких условиях в присутствии основания Хюннига и этанола в течении 10 часов. После этого, соединение **41** также вступает в реакцию нуклеофильного замещения уже по 2-му положению в более жестких условиях (120 °С) в течении 1 часа с получением **43** соединения с почти количественным выходом.

Схема 9



При рассмотрении соединений, которые являются ингибиторами ULK1/2 на рисунке 15, можно заметить так называемые фармакофорные группы [49-50] (признаки), определяющие их взаимное расположение в пространстве и обеспечивающие необходимые взаимодействия с мишенью. Примером такой группы может служить 2-аминопиримидиновый фрагмент, который содержит как ацептор, так и донор водородной связи (типичный киназный паттерн). Также наличие разветвленных участков указывает на их взаимодействие с другими ключевыми аминокислотами, которые увеличивают селективность относительно двух изоформ.

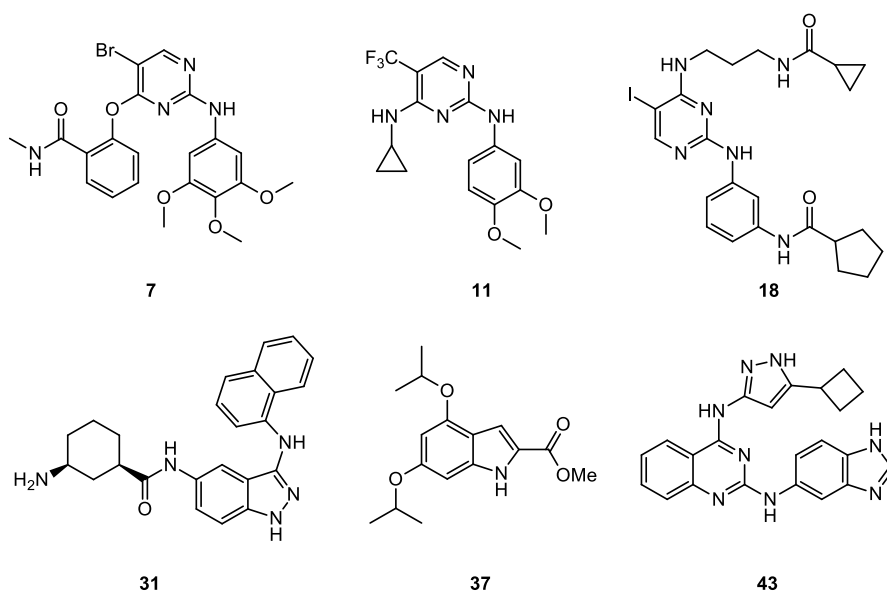


Рисунок 15 – Структуры рассмотренных ингибиторов ULK1/2

Проведя молекулярный докинг, на основе структуры ULK1 (PDB ID: 6WNP), и последующую генерацию фармакофорной гипотезы, получился следующий фармакофор (рисунок 16).

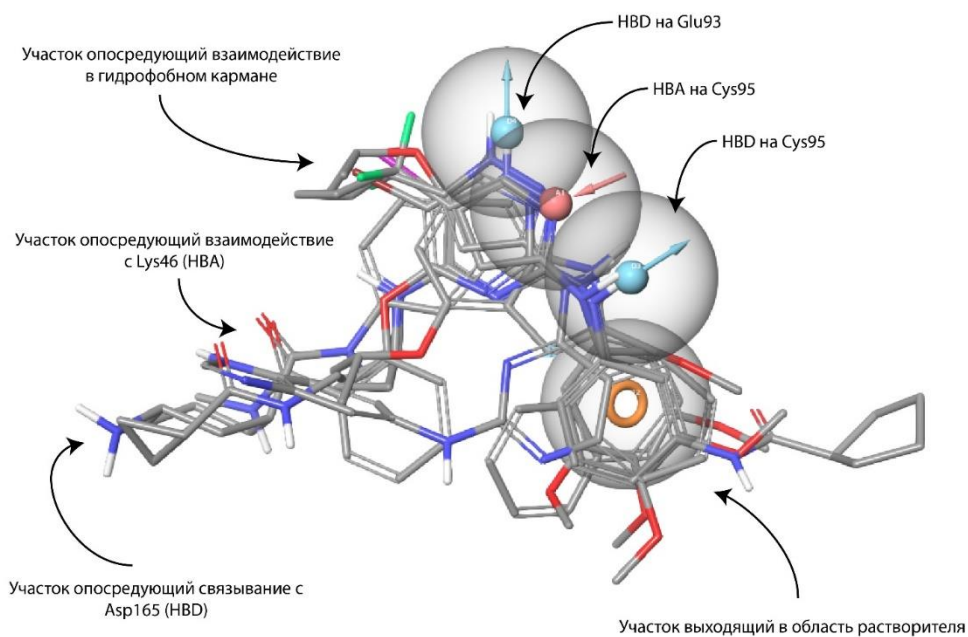


Рисунок 16 – Фармакофор, построенный на основе рассмотренных ингибиторов ULK1/2

Все рассмотренные соединения имеют ключевые взаимодействия с Glu93 и Cys95, находящимися в шарнирной области киназного домена. Эти аминокислоты играют важную роль в стабилизации структуры комплекса. Помимо этого, ULK1/2 имеют небольшой гидрофобный карман вблизи участка связывания с Met92 и участок, выходящий в область растворителя, что позволяет ингибиторам занять оптимальное положение для взаимодействия с активным центром. На рисунке 16 также можно увидеть уходящий влево участок, который также способен опосредовать водородные взаимодействия с Asp165 или Lys46. Эти взаимодействия могут дополнительно способствовать стабилизации комплекса и повышению эффективности ингибиторов.

Исходя из всего вышесказанного, можно сделать вывод, что все рассмотренные ингибиторы ULK1/2 имеют схожие фармакофорные признаки, а именно ключевые взаимодействия с шарнирной областью по Cys95/Glu93. Эти фармакофорные признаки включают не только непосредственные взаимодействия с аминокислотами, но и способность занимать гидрофобные карманы и образовывать водородные связи, что увеличивает их аффинность и специфичность к ULK1/2.

2 Результаты и их обсуждение

Аутофагия как катаболический процесс играет важную роль в выживаемости как здоровых, так и раковых клеток в условиях гипоксии и дефицита питательных веществ. Множество исследований показало, что нарушение в сигнальном каскаде или гиперактивация ULK1/2 может приводить к ряду онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Ингибирование аутофагии по средствам вышележащих мишеней ULK1/2, способствует повышению сенсibilизации раковых клеток к лекарственным препаратам, что является потенциальной стратегией в качестве синергической терапии рака.

Целью данной работы является поиск и синтез потенциальных ингибиторов ULK1/2, а также оценка их активности с помощью *in vitro* тестов.

Дизайном данной исследовательской работы является перепрофилирование известного лиганда тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) осимертиниба (рисунок 17) и хлорохина, ингибитора поздней аутофагии о котором говорилось ранее. В качестве скаффолда выступает типичный киназный паттерн в виде 2-аминопиримидина, в четвертом положении, которого находится N-метилиндольный фрагмент, данный хемотип встречается во множестве известных ингибиторов киназ, что обуславливает его мультитаргетность.

Второе же положение пиримидина будет занято анилином, четвертое положение которого будет модифицировано карбоксамидными группами, которые будут обуславливать сольубилизацию лиганда и его связывание в лизосомах.

На следующей этапе полученную библиотеку соединений, состоящую из восьми соединений, стыковали в активные сайты мишеней с целью оценки и сравнения способа связывания с нативными лигандами.

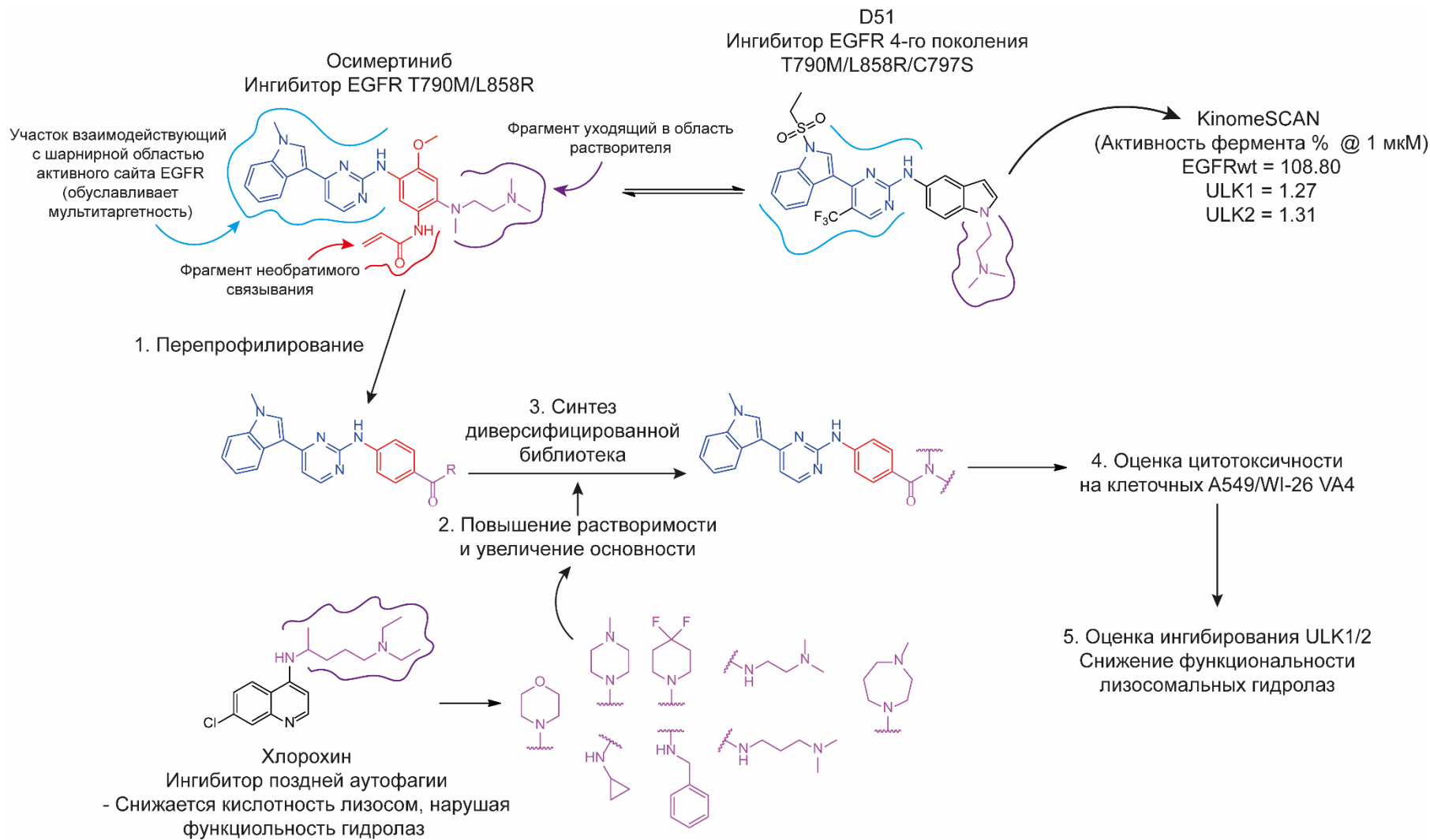


Рисунок 17 – Структура дизайна исследования

2.1 Молекулярное моделирование

Первоначально для всех исследуемых соединений были предсказаны значения ряда физико-химических свойств с помощью модулей QikProp [51] и Prime [52, 53]. В целом можно сказать, что все лиганды отвечают требованиям для перорально-биодоступных и проницаемых лекарств, изредка выходя за допустимые пределы. Кроме того, имеется некоторый запас для дальнейшей SAR-оптимизации (таблица 1)

Таблица 1– Физико-химические параметры исследуемых соединений

Номер соединения	MW, Да	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи	QProp _{o/w}	PSA, Å ²	MM-GBSA ΔG_{insert} , ккал/моль	Log _{Perm} RRCK
50 (RSF-169)	413.48	1.00	7.20	3.95	70.24	15.020	-5.24
51 (RSF-170)	426.52	1.00	7.50	3.94	67.027	14.920	-5.32
53 (RSF-172)	383.45	2.00	5.00	4.73	69.33	15.56	-5.21
54 (RSF-173)	433.51	2.00	5.00	5.87	68.86	14.98	-5.28
52 (RSF-171)	447.49	1.00	5.50	5.55	59.49	11.55	-5.12
55 (RSF-174)	440.55	1.00	7.50	4.34	64.24	16.71	-5.62
57 (RSF-176)	428.54	2.00	7.00	4.76	76.85	18.28	-5.75
56 (RSF-175)	414.51	2.00	7.00	4.43	75.24	18.24	-5.605

Так как одним из предполагаемых механизмов действия для исследуемых соединений является подавление аутофагии за счет ингибирования активности белков ULK1/2 – основных регуляторов данного клеточного процесса, нами было осуществлено *in silico* исследование, направленное на определение возможности связывания с этими мишенями.

Первоначально мы выполнили стыковку в активные сайты ULK1 (PDB ID: 6YID [48]) и ULK2 (PDB ID: 2WNP [44]) с помощью оригинального алгоритма Schrodinger IFD-MD (*англ.* Induced Fit Docking-Molecular

Dynamic) [54]. Это вычислительный подход к осуществлению индуцированного докинга, который включает в себя серию молекулярно-динамических симуляций, призванных оптимизировать геометрию и обеспечить более точный отбор генерируемых поз. Схематично рабочий процесс IFD-MD представлен на рисунке ниже (рисунок 18).

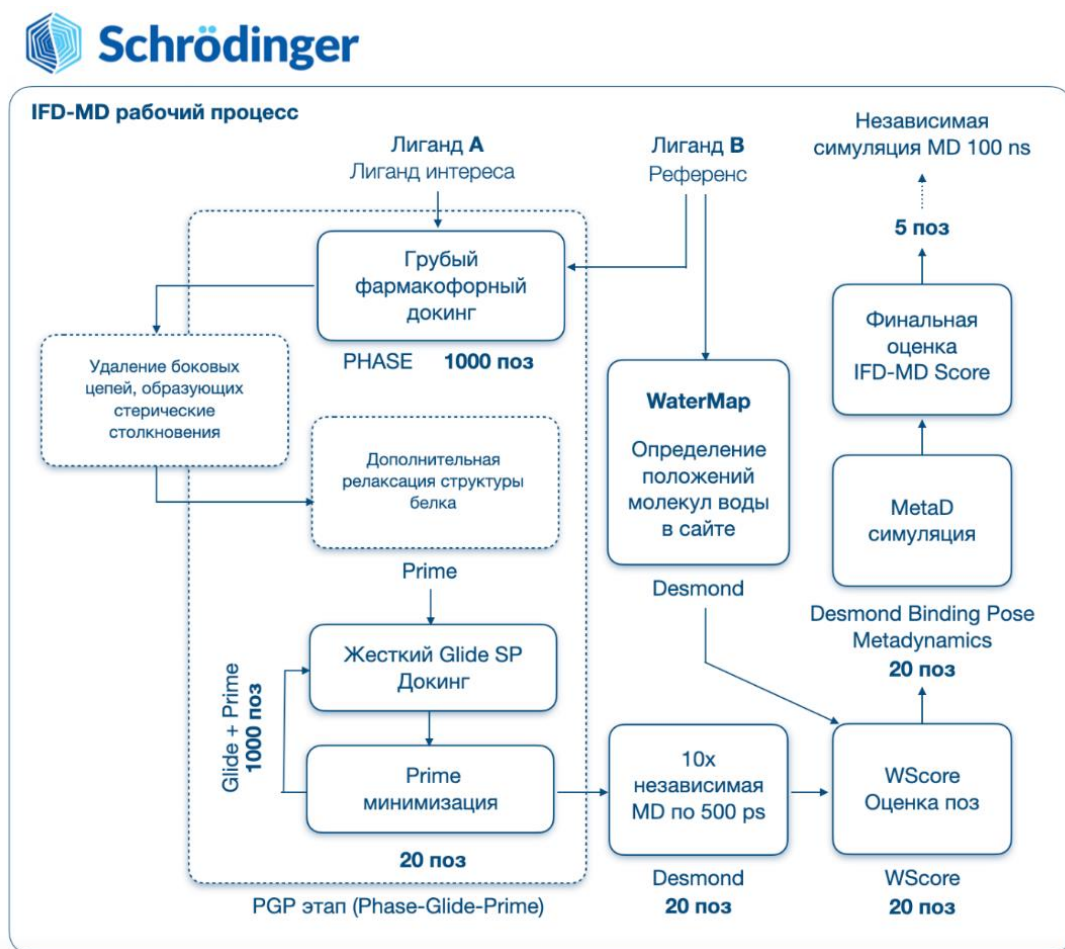


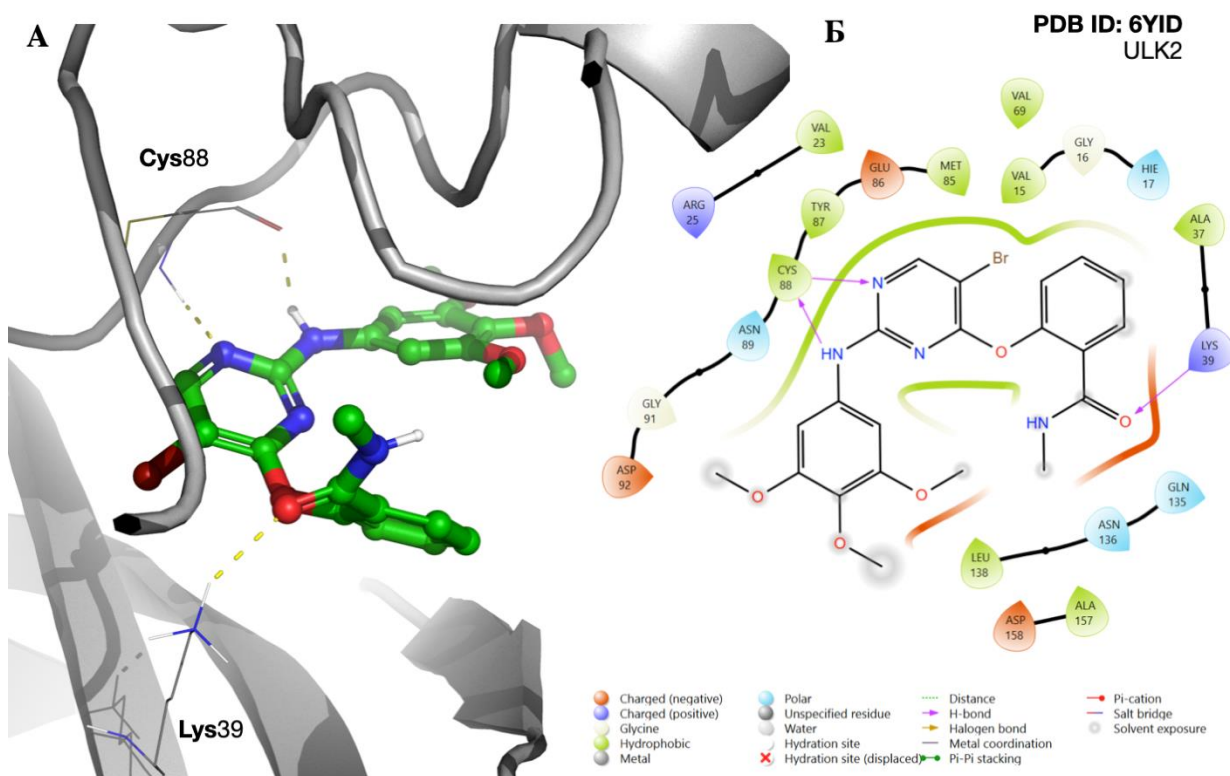
Рисунок 18 – Рабочий процесс IFD-MD

В качестве входных данных алгоритм требует подготовленный комплекс мишени интереса с лигандом (последний далее будет использоваться в качестве референса при осуществлении докинга), а также структуру той малой молекулы, которая должна быть пристыкована в сайт.

Вкратце, изначально проводится грубый фармакофорный докинг с использованием Phase [55], где генерируется библиотека конформеров

лиганда интереса и осуществляется наложение фармакофорных моделей на референсный лиганд. Из 1000 полученных таким образом поз выбираются лучшие по степени наложения фармакофоров, затем устраняются стерические конфликты и проводится релаксация структуры с помощью Prime [52, 53]. Сначала аминокислотные остатки оптимизируются в присутствии лиганда, после чего выполняется жесткая стыковка Glide SP [56] и предсказание конформаций боковых цепей *de novo*. Полученные позы затем оцениваются с использованием PGPScore (*англ.* Phase-Glide-Prime), который представляет собой линейную комбинацию Prime Energy, GlideScore и GlideEScore с соответствующими коэффициентами. Отобранные позы проходят через серию из десяти независимых симуляций молекулярной динамики по 500 пикосекунд каждая для устранения проблем в структуре комплекса и улучшения десольватации полярных и заряженных групп. В конце рассчитывается WScore [57], учитывающий термодинамические параметры воды из WaterMap [58]. Алгоритм IFD-MD анализирует симуляции и отбирает лучшие позы, а затем выполняется метадинамическая симуляция аналогично Binding Pose Metadynamics [59] для дополнительной оценки. О пяти лучших комплексах сообщается пользователю.

Структуры референсных комплексов были загружены из PDB и подготовлены так, как описано в экспериментальной части. Структуры и способы связывания нативных лигандов представлены на рисунке ниже (рисунок 19).

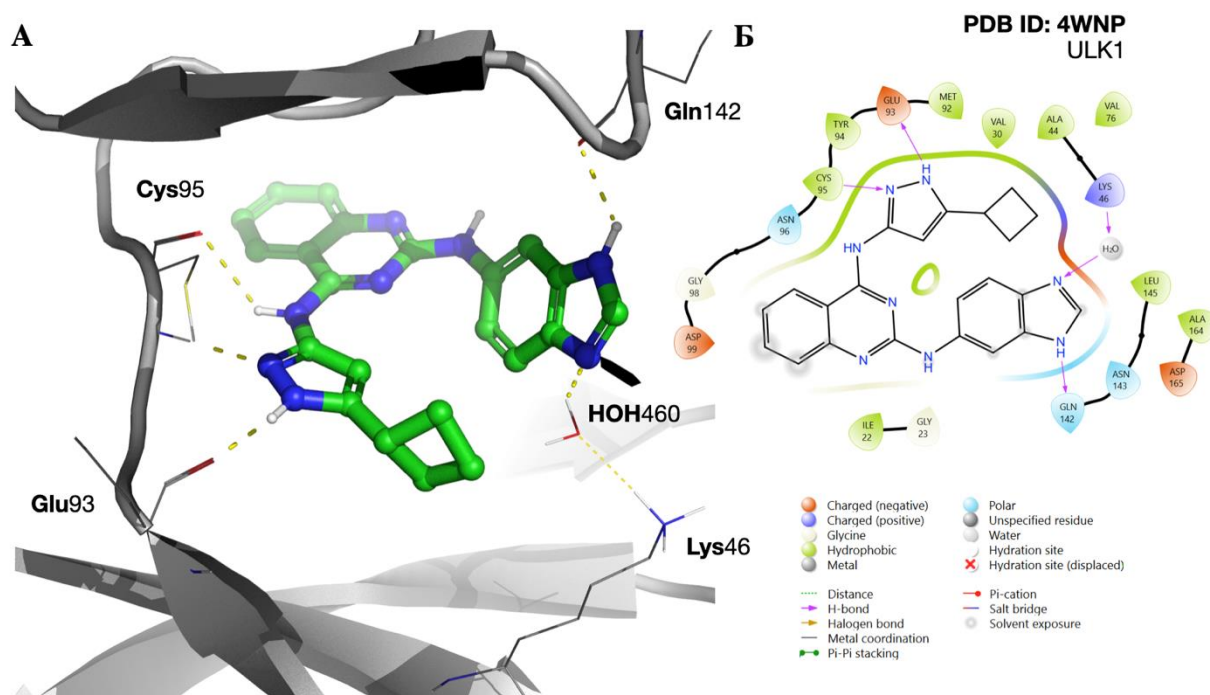


А – поза связывания кристаллического лиганда; Б – 2D-диаграмма способа связывания кристаллического лиганда

Рисунок 19 – Способ связывания кристаллического лиганда ULK2 (PDB ID: 6YID); желтый пунктир – водородные связи

Как можно увидеть, 2-аминопиримидиновый скаффолд обеспечивает образование ключевых водородных связей с остатком Cys88 в области шарнира, бром, находящийся в пятом положении гетероцикла, удачно оккупирует локальный гидрофобный карман, выстланный остатками Met86, Val15 и Val69, фенилацетамидный мотив взаимодействует с Lys39 на выходе из сайта, а триметоксифенильный фрагмент также простирается наружу, где может взаимодействовать с растворителем.

Схожим образом связывается и кристаллический лиганд ULK1 (PDB ID: 4WNP) (рисунок 20).

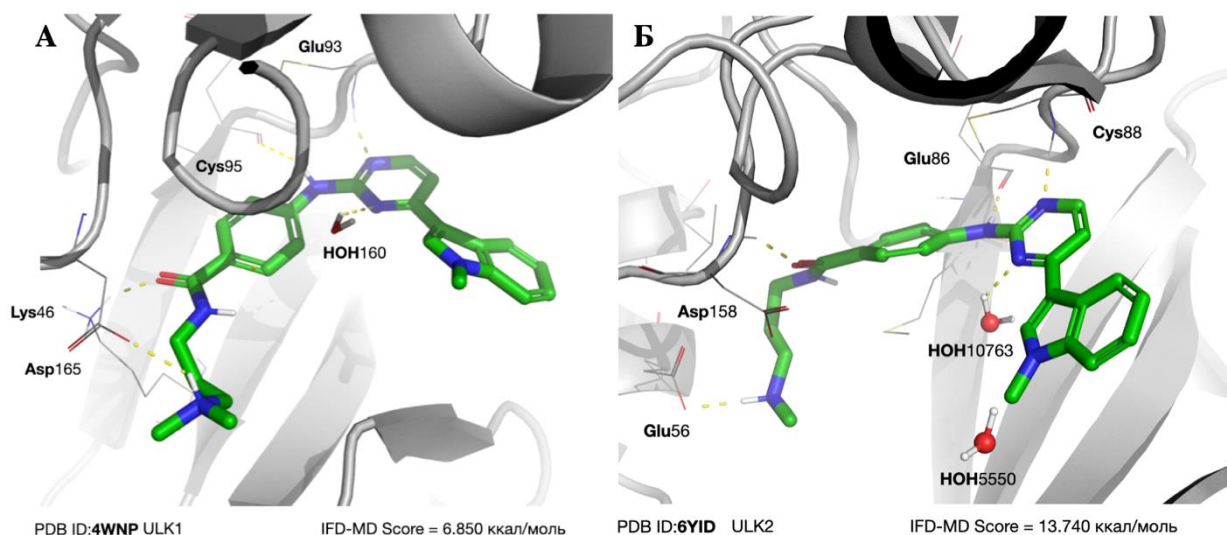


А – поза связывания кристаллического лиганда; Б – 2D-диаграмма способа связывания кристаллического лиганда

Рисунок 20– Способ связывания кристаллического лиганда ULK1 (PDB ID: 4WNP); желтый пунктир – водородные связи

В данном случае за связывание в шарнирном регионе с Cys95 и Glu93 отвечает пиразоламинный скаффолд, бензимидазол взаимодействует с Gln142 на выходе из сайта, где также реализует передачу водородной связи через молекулу воды на Lys46.

Итак, мы пристыковали соединение **176**, несущее *N,N*-диметилпропанаминный фрагмент, в активные сайты Unc-51-like киназ с помощью модуля IFD-MD. Полученные позы связывания показаны на рисунке ниже (рисунок 21).



А – способ связывания соединения **176** в сайте ULK1; Б – способ связывания соединения **176** в сайте ULK2

Рисунок 21 – Способы связывания соединения **176** в сайтах ULK1 и 2 по данным IFD-MD (позы №1); желтый пунктир – водородные связи

Во-первых, стоит отметить, что, по данным внутреннего скоринга IFD-MD, связывание соединения интереса в сайте ULK1 более выгодно, чем в сайте ULK2. Однако стоит учитывать тот факт, что на значение оценочной функции влияет степень соответствия связывающей позы геометрии референсного лиганда, а также сами авторы алгоритма не рекомендуют использовать IFD-MD Score для ранжирования структур малых молекул, вместо этого предлагая обращаться к таким методам, как, например, FEP (*англ.* Free Energy Perturbation) [60].

Во-вторых, можно говорить о схожем способе связывания **176** в сайтах обеих изоформ. Аминопиримидин взаимодействует с остатками шарнира, реализуя также связь с Glu. *N,N*-диметилпропанаминный фрагмент простирается в область растворителя, где демонстрирует образование водородных связей с Lys46, Asp165 и Asp158, Glu56 для ULK1 и ULK2, соответственно.

На основе полученных поз были подготовлены грид-боксы, и все остальные соединения библиотеки подверглись стыковке с помощью Glide XP [61] с дополнительным расчетом свободной энергии связывания с использованием энергетической модели Prime [56] по методу MM-GBSA. Молекулы воды были удалены перед генерацией сетки потенциалов и докинг. Дополнительно в расчет были включены также нативные лиганды. Результаты стыковки в структуру ULK2 представлены в таблице ниже (таблица 2).

Таблица 2– Результаты докинга (ULK2, PDB ID: 6YID)

Номер соединения	XP GScore, ккал/моль	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль
57 (RSF-176)	-9.481	-62.22
56 (RSF-175)	-9.321	-56.06
54 (RSF-173)	-9.035	-59.48
53 (RSF-172)	-9.010	-56.00
55 (RSF-174)	-8.519	-52.17
51 (RSF-170)	-6.983	-41.01
Нативный	-6.409	-34.52
52 (RSF-171)	-6.370	-34.24
50 (RSF-169)	-3.964	-33.05

Как можно увидеть из представленных данных, большая часть исследуемых соединений показала скоринг лучше, чем у референсного лиганда.

На рисунке ниже показаны способы связывания двух лигандов-лидеров — **175** и **176**. Хочется обратить внимание на схожесть ориентации *N*-фениламинопиримидинового фрагмента исследуемых соединений и

нативного ингибитора. Разницу в значениях как Glide XP GScore, так и свободной энергии связывания во многом можно объяснить более полной степени оккупации сайта за счет удачной ориентации *N,N*-диметилпропанаминового и *N,N*-диметилэтанаминового мотивов для **176** и **175**, соответственно. Наконец, анализ способов связывания наталкивает на соображения для дальнейшей SAR-оптимизации – **пятое положение пиримидина может стать удачной точкой для введения в структуру различных неполярных заместителей**, которые, подобно брому в нативном лиганде, смогут удачно занимать гидрофобную полость (рисунок 22).

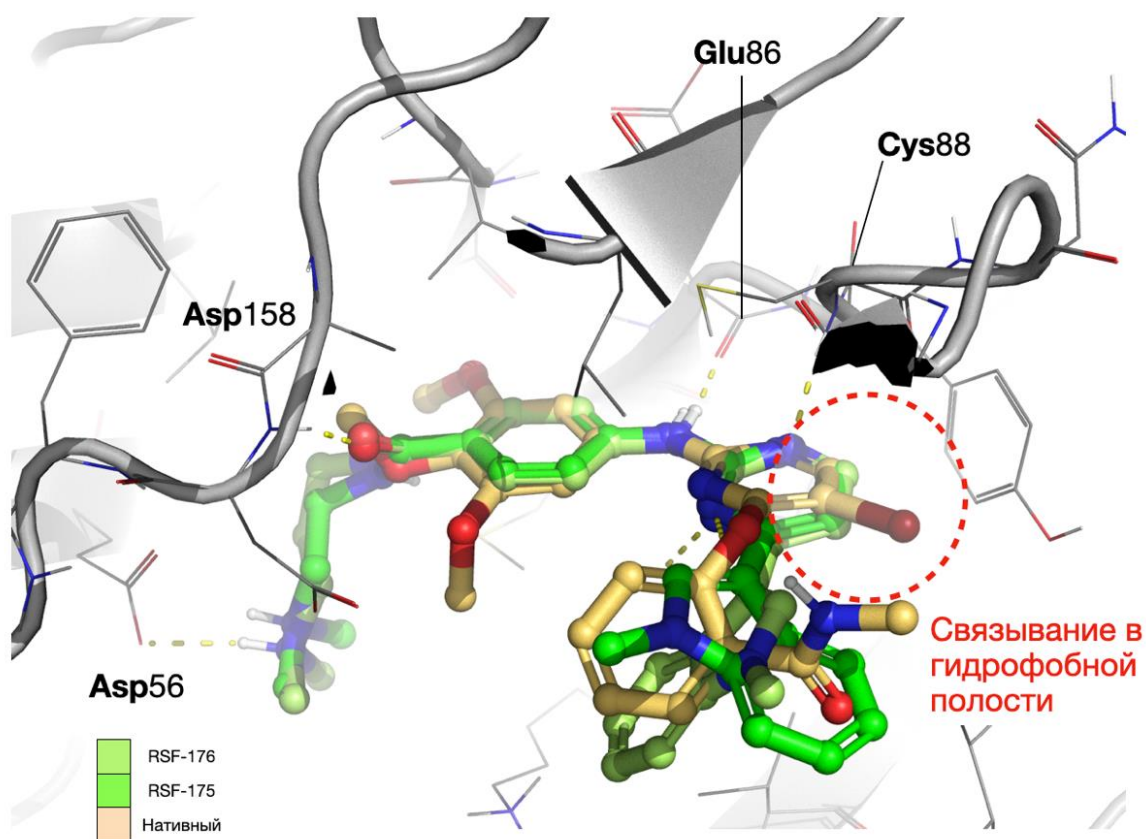


Рисунок 22 – Способы связывания соединений **175**, **176** и нативного лиганда в сайте ULK2; желтый пунктир — водородные связи

Соединения **172** и **173** реализуют все необходимые взаимодействия в области шарнира, дополнительно демонстрируя наличие водородной связи

между карбонилем фениламидного фрагмента и остатком Asp158 (рисунок 23).

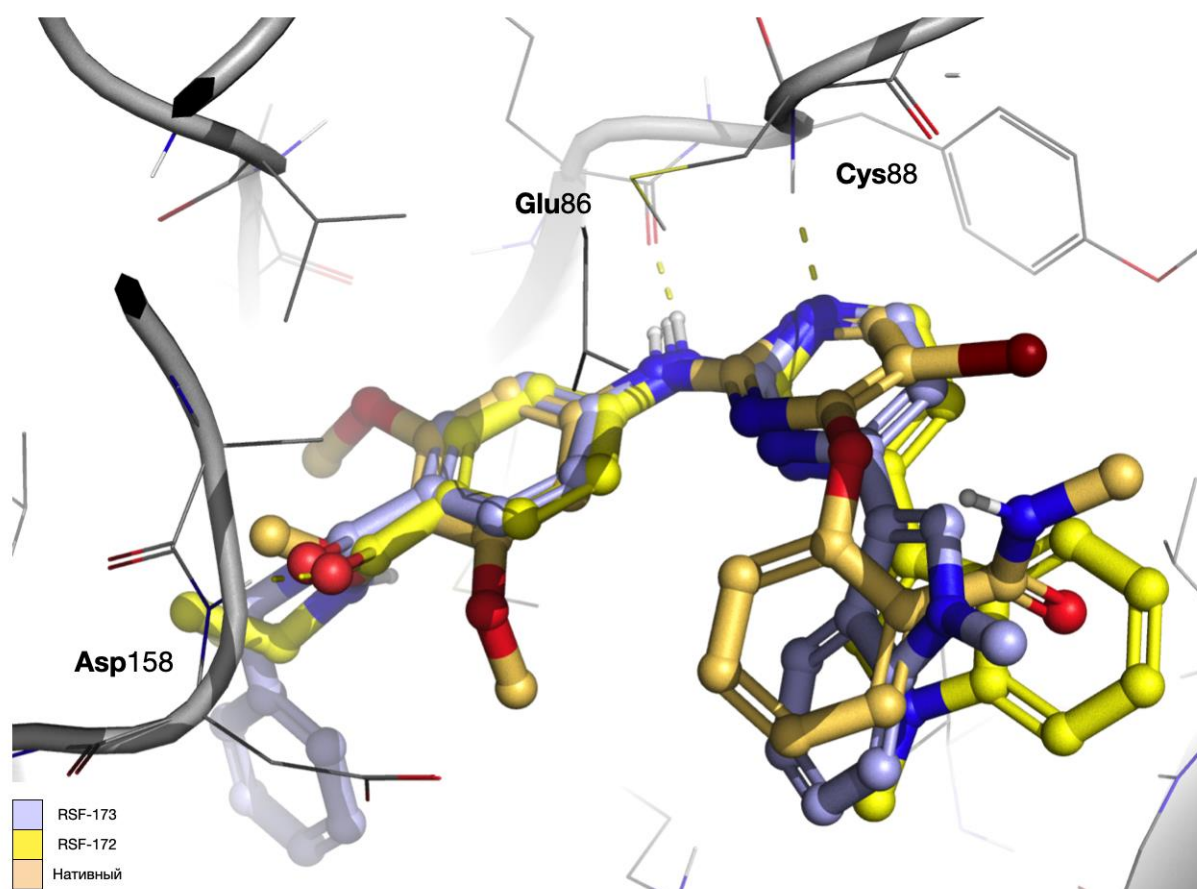
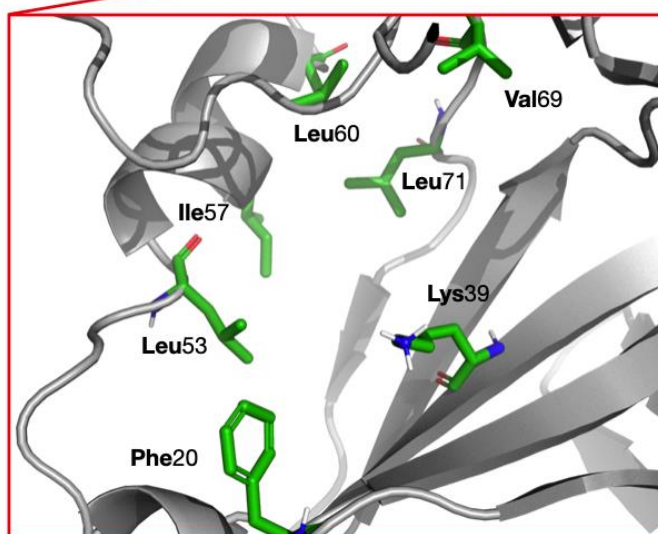
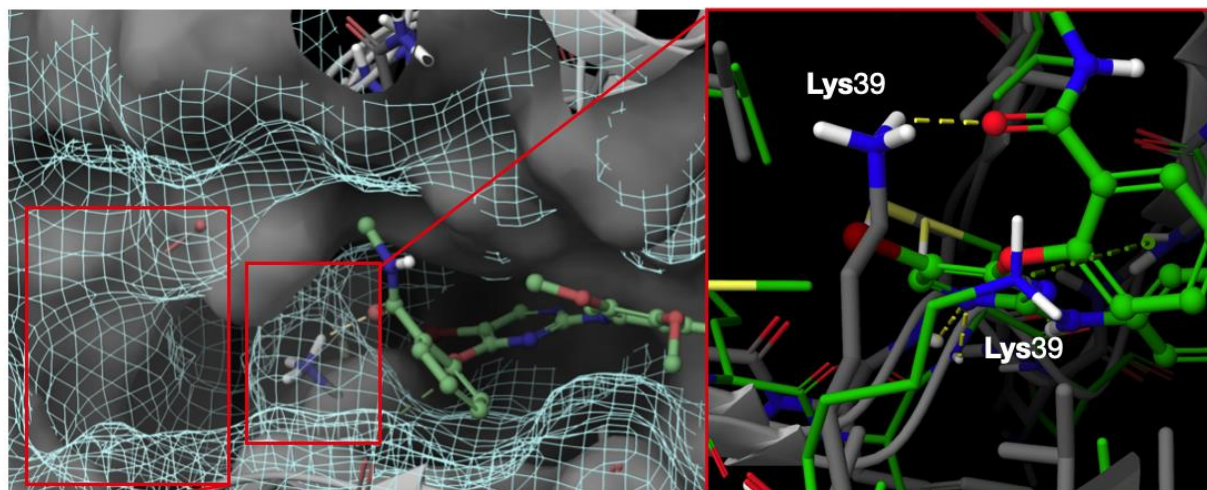


Рисунок 23 – Способы связывания соединений **172**, **173** и нативного лиганда в сайте ULK2; желтый пунктир – водородные связи

Также была обнаружена следующая интересная особенность – в ходе молекулярно-динамической симуляции, которая выполнялась в ходе реализации IFD-MD протокола для соединения **176**, форма сайта изменилась. Как показано на рисунке ниже, боковая цепь Lys39 претерпевает движение, открывая доступ к небольшому карману, выстланному остатками Phe20, Leu53, Ile57, Leu60, Val69 и Leu71, в котором можно выгодно расположить функциональные группы лигандов. Насколько нам известно, на момент написания работы, ни один ингибитор ULK не реализует такой паттерн связывания (рисунок 24).

Голубой — 6YID X-RAY; Серый — 6YID после IFD-MD



Открывшаяся полость

Зеленый — 6YID после IFD-MD
Серый — 6YID X-RAY

Рисунок 24 – Открывшаяся гидрофобная полость в сайте ULK2 (PDB ID: 6YID)

Именно в эту полость ориентируют свои гомопиперазиновый и пиперазиновый заместители соединения **174** и **170**, соответственно, в остальном повторяя особенности связывания описанных выше структур (рисунок 25).

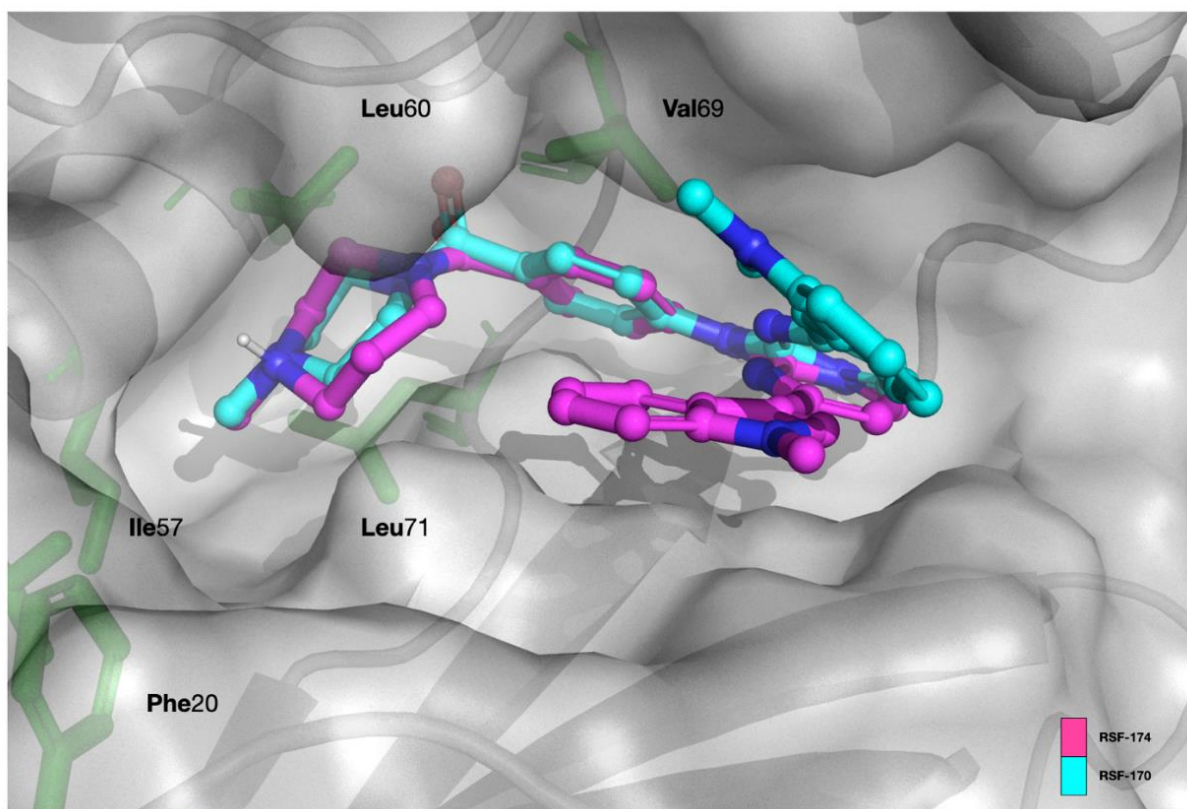


Рисунок 25 – Способы связывания соединений **170** и **174** в сайте ULK2

Аналогично был получен грид-бокс и проведен молекулярный докинг структур исследуемых соединений в активный сайт ULK1. Полученные результаты представлены в таблице ниже. Как можно увидеть, значения Glide Score позволяют говорить о том, что лидирующие позиции все также занимают соединения **175** и **176**, однако ранжирование по свободной энергии связывания приводит к структуре **174** (таблица 3)

Таблица 3 – Результаты докинга (ULK1, PDB ID: 4WNP)

Номер соединения	XP GScore, ккал/моль	ММ-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль
57 (RSF-176)	-8.010	-42.17
56 (RSF-175)	-7.902	-41.20
51 (RSF-170)	-7.521	-39.55

Продолжение таблицы 3

Номер соединения	XP GScore, ккал/моль	ММ-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль
52 (RSF-171)	-7.483	-38.58
Нативный	-7.370	-34.06
55 (RSF-174)	-6.850	-47.42
50 (RSF-169)	-6.789	-43.76
53 (RSF-172)	-6.570	-45.98
54 (RSF-173)	-6.483	-45.61

Не погружаясь в подробное обсуждение способов связывания лигандов в сайте ULK1, отметим, что все закономерности, озвученные ранее касательно ULK2, справедливы и в данном случае. В конце стоит также сказать, что, ориентируясь на полученные значения скоринга, сделать однозначные выводы о возможной селективности среди изоформ Unc-51-like киназы для исследуемых соединений сложно (рисунок 26).

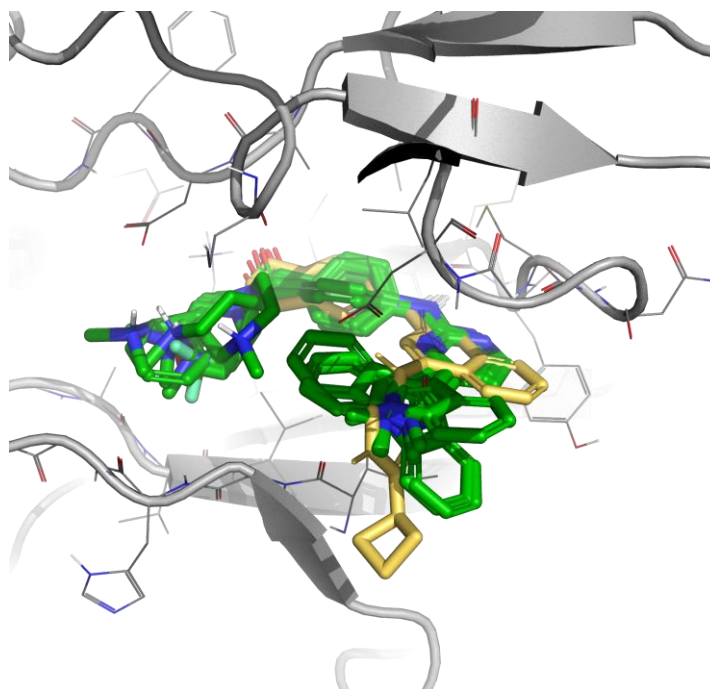


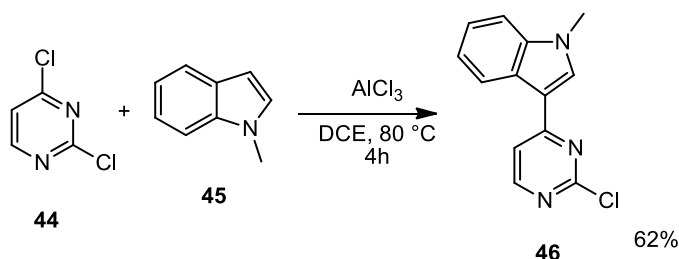
Рисунок 26 – Способы связывания исследуемых соединений (показаны зелеными) и нативного лиганда (желтый) в сайте ULK1 (PDB ID:4WNP)

2.2 Синтез исследуемых соединений

В данном разделе приводится полное описание синтетических процедур, направленных на получение диверсифицированной библиотеки ингибиторов ULK1/2 для дальнейших *in vitro* исследований.

В качестве исходного соединений выступал 4-*N*-метилиндол-2-хлорпиримидин, который был получен реакцией электрофильного замещения под действием AlCl_3 в DCE в течении 4 часов кипячения с соответствующим выходом представленным на схеме 10 [62].

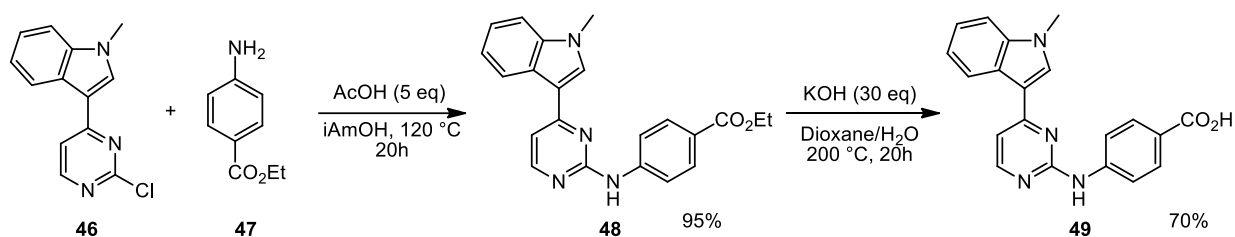
Схема 10



Второй этап включал в себя реакцию нуклеофильного замещения хлора пиримидинового кольца этиловыми эфиром 4-аминобензойной кислоты. К сожалению, в литературе не было приведено примеров получения данных гетероциклических систем, за исключением аминов с акцепторными группами. В этом случае реакция должна была проходить в присутствии рTSA (1.2 экв.), 1,4-диоксана при 105 °C в течении 4 часов с выпадением осадка, который впоследствии отфильтровывается. С донорными заместителями данная методика не работала, возможно это связано с тем, что получающиеся 4-индол-2-ариламинопиримидины получались в виде солей и растворялись в диоксане. После того, как была проведена оптимизация условий реакции, полученный 4-индол-2-хлорпиримидин **46** вводили в реакцию нуклеофильного замещения с амином **47** в изоамиловом спирте при

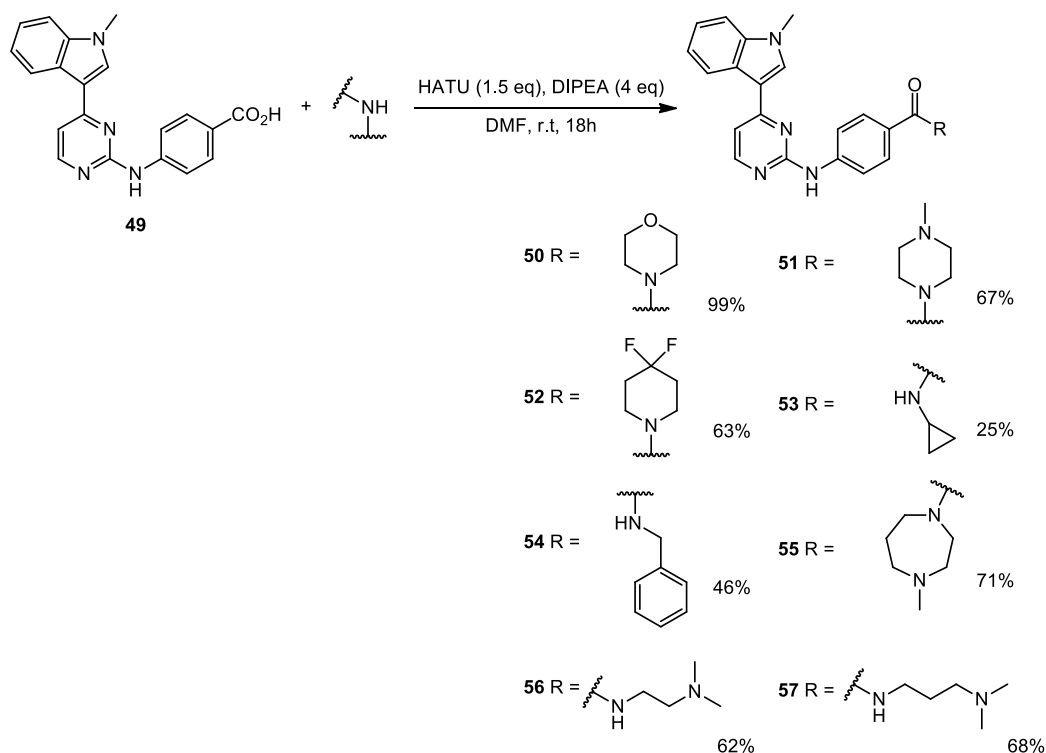
120-150 °С. Смесь кипятили 20 часов. Добавляли 20 мл МТВЕ и отфильтровывали с получением продукта **48**, выхода представлены на схеме 11.

Схема 11



На следующем этапе полученный эфир **48** подвергали гидролизу в жестких условиях в течении 20 часов кипячения. После остывания, упаривали растворитель, полученную калиевую соль переосаждали кислотой и отфильтровали, выход продукта **49** представлен на схеме 11.

Закрывающий этап включал в себя реакцию амидирования 4-(4-(*N*-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил)аминобензойной кислоты, с получением диверсифицированной библиотеки из 8 соединений. Полученную кислоту вводили в реакцию с соответствующими аминами в диметилформамиде. В качестве активатора карбоксильной группы выступал HATU (англ. Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium), и основание Хюннига (DIPEA). Смесь оставляли на 18 часов при комнатной температуре, после экстрагировали и выделяли с помощью DCVC (англ. Dry Column Vacuum Chromatography) с получением продуктов **53-60** с выходами указанными на схеме 12.



На первой стадии происходит депротонирование кислоты с получением соответствующей соли. Затем карбоксилат ион нуклеофильно замещает бензотриазол, образуя изомочевину, которая впоследствии замещается на легко уходящую группу VtO^- . После этого амин нуклеофильно присоединяется к сложноэфирной группе, образуя промежуточный комплекс, который стабилизируется иминовым азотом 7-азобензотриазольного фрагмента. Далее этот комплекс разрушается, с получением желаемого амида.

Структура целевых соединений и их чистота была подтверждена спектрами ЯМР ^1H и ВЭЖХ.

2.3 Оценка биологической активности

Оценка ингибирующей способности целевых соединений была проведена при помощи МТТ-теста на клеточных линиях A549 и WI-26 VA4. Графики зависимости доза-эффект представлены на рисунке 27.

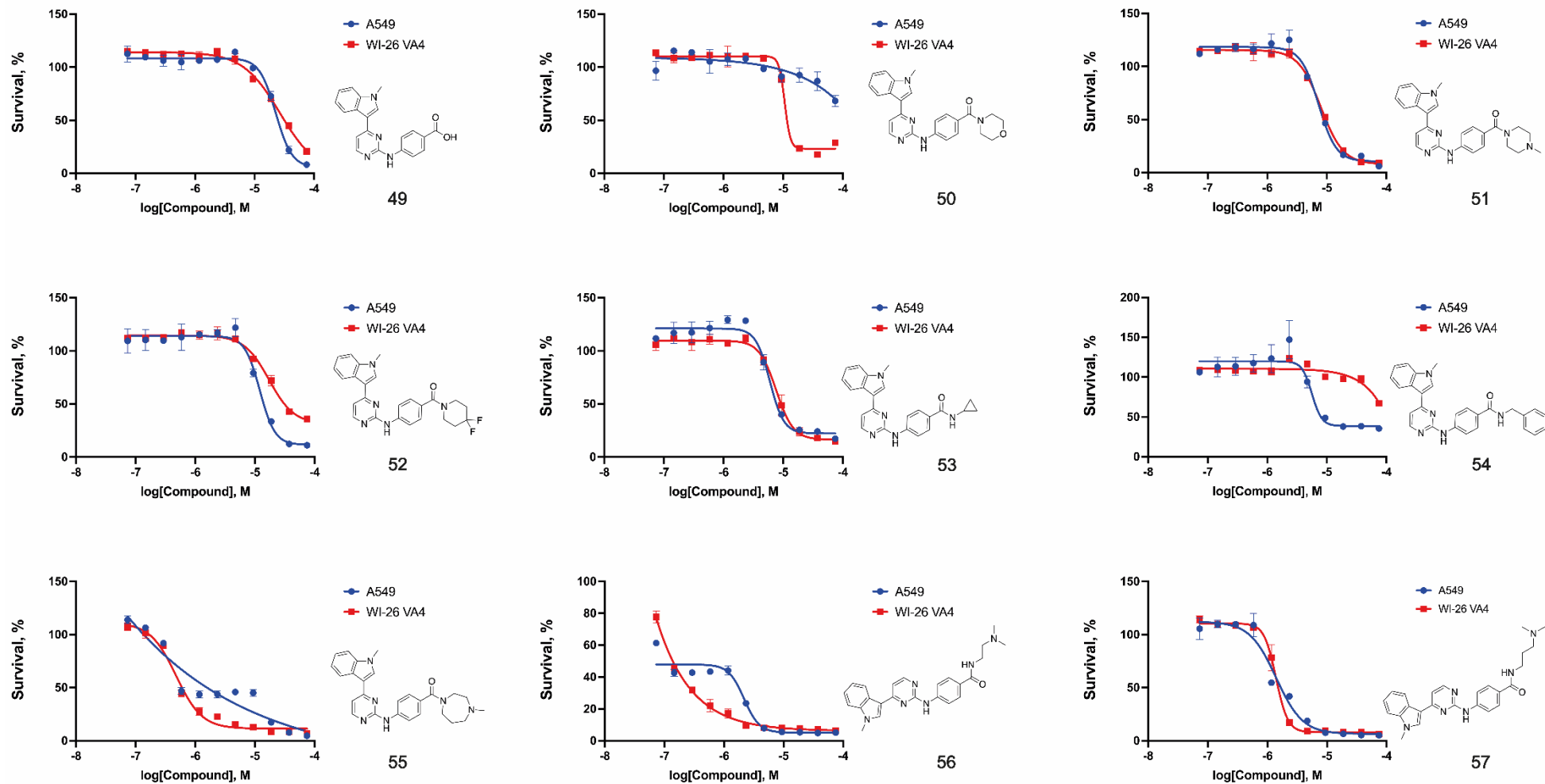










Рисунок 27 – Оценка биологической активности целевых соединений **49-57**, синим и красным цветом показаны клеточные линии A549 и WI-26 VA4

При раститровке 75 мкМ соединений **49-57** и последующей оценки выживаемости, были выявлены три соединения **54**, **55**, **56**, которые проявляют наибольшую активность по отношению к одной из клеточных линий (таблица 4).

Таблица 4 – Значения IC₅₀ целевых соединений, полученных МТТ-тестом

Номер соединения	R	IC ₅₀ (нМ/л)		Селективность (WI-26 VA4/A549)
		A549	WI-26 VA4	
49	-OH	22630	26680	1.18
50		>75000	10630	0.14
51		7245	7923	1.1
52		12060	17200	1.43
53		5969	7638	1.28
54		5602	>75000	13.4
55		304	477	1.57
56		378	н. о	н. о
57		1406	1395	0.99

A549 – клеточная линия аденокарциномы человека, альвеолярные базальные эпителиальные клетки; WI-26 VA4 - представляет собой трансформированное вирусом SV40 производное WI-26, линии диплоидных фибробластов человека из эмбриональной легочной ткани.

Интересно, что все соединения за исключением **54**, который содержит бензиламинный фрагмент, проявляют выраженный цитотоксический

эффект. В то время как **54** обладает антипролиферативным эффектом и широким терапевтическим окном в отношении клеточных линий A549 и WI-26 VA4.

Для определения IC_{50} соединений **54-56** была проведена титровка 1 мкМ (рисунок 28).

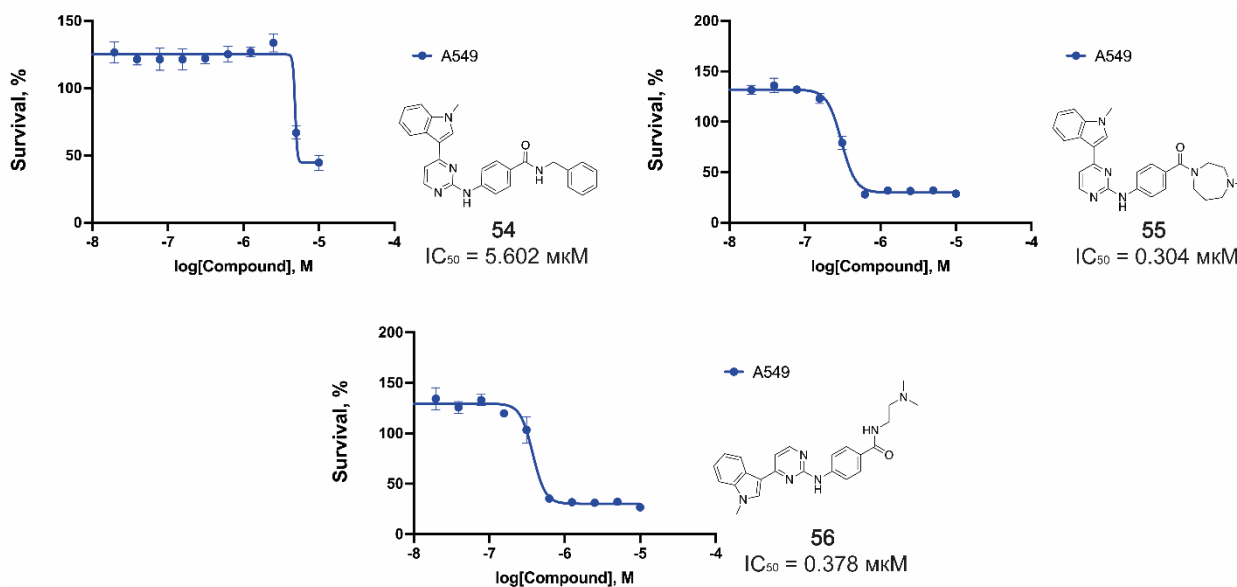


Рисунок 28 – Графики доза-эффект для потенциальных хитов 54-56

Также можно заметить, что **55** соединение отличается **56** на 0.074 мкМ, это связано с так называемым энтропийным фактором. При связывании лиганда с мишенью, происходит уменьшение степеней свободы, что способствует понижению аффинности. Если сравнить, амидные фрагменты **55** и **56**, то окажется, что степеней свободы в случае второго соединения больше. Это ведет к тому, что $\Delta S_{55} > \Delta S_{56}$ и $\Delta G_{55} < \Delta G_{56}$.

Подводя итоги, можно сказать, что в ходе исследования было идентифицировано три потенциальных хит соединения, обладающие наибольшей ингибирующей активностью в отношении клеточных линий A549 и WI26 VA-4.

3 Экспериментальная часть

3.1 Реагенты и оборудование

Контроль за ходом реакций синтеза исследуемых соединений осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии с использованием пластинок с закрепленным слоем марки «Силуфол». Проявление пятен (обнаружение веществ) проводили в концентрированном растворе перманганата калия.

Контроль за ходом реакций и чистоту полученных соединений оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на хроматографе «Agilent1220м» с спектрофотометрическим детектором. Колонка ZORBAX C-18/NH-2, элюент MeCN:H₂O 8:2, скорость потока элюента 1 мл/мин. Обработка данных проводилась в программе OpenLab (фирма – Agilent).

Спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на приборе Bruker Avance (400 МГц соответственно) в ДМСО-d₆, внутренний стандарт ТМС.

Температуры плавления определяли при помощи нагревательного столика Voetius.

Все реагенты и растворители были приобретены из коммерческих источников и использовались без предварительной очистки.

3.2 Синтез исходных соединений

3.2.1 Синтез исходного 4-индол-2-хлорпиримидина

Синтез 3-(2-хлорпиримидин-4-ил)-1-метил-1H-индола (46)

В грушевидную колбу, снабженную обратным холодильником, внесли исходный 2,4-дихлопиримидин (14.9 г, 100 ммоль), AlCl₃ (13.9 г, 104 ммоль), растворили в 200 мл DCE и оставили перемешиваться на 20 минут. По истечении времени по каплям добавили N-метилиндол (13.15 г, 100 ммоль).

Реакционную смесь кипятили при 80 °С в течении 4 часов. Остужали до комнатной температуры, разбавляли 400 мл воды и 120 мл метанола и проводили фильтрацию с промывкой 300 мл холодного MeOH. Выход: 15.1 г, 62%, бледно-желтый порошок, т. пл. 201-202 °С [199-200 °С]. R_f 0.33 (Hexane:EtOAc 50:50). ВЭЖХ (C-18, 336 нм, t_{уд} 2.916) (100%).

3.2.2 Синтез этилового эфира карбоновой кислоты

Синтез этилового эфира 4-(4-(N-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил)аминобензойной кислоты (48)

К раствору 2-хлорпиримидин (1 г, 4.1 ммоль), амин (677 мг, 4.1 ммоль), в 20 мл iAmOH добавили уксусную кислоту (1.231 г, 20.5 ммоль) и оставили в термостате при 120-150 °С на 20 часов. После остывания, смесь разбивали 20 мл МТВЕ и оставили в морозильнике на 30 минут. Выпавший осадок отфильтровали и промыли 50-100 мл холодного эфира. Выход: 1.449 г, 95%, желтый порошок, т. пл. 138-140 °С. R_f 0.38 (DCM:MeOH 98:2). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 3.040) (100%).

3.2.3 Синтез кислоты

Синтез 4-(4-(N-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил)аминобензойной кислоты (49)

В грушевидную колбу внесли этиловый эфир бензойной кислоты (1 г, 2.69 ммоль) и растворили его в 32 мл диоксана-1,4. После добавили КОН (4.53 г, 80.7 ммоль), предварительно растворенного в 18 мл воды, и оставили кипятиться при 200 °С на 20 часов. Упарили азеотроп с получением калиевой соли, которую переосаждали кислотой. Выход: 645 мг, 70%, серый порошок, т. пл. 283-285 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.70 (с, 1H), 8.64 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 8.40 (д, J = 5.4 Гц, 1H), 8.33 (с, 1H), 7.98 – 7.86 (м, 4H), 7.54 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.33 – 7.16 (м, 3H), 3.90 (с, 3H). R_f 0.70 (DCM:MeOH 95:5 + 1% AcOH). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 3.040) (100%).

3.3 Синтез целевых соединений

3.3.1 Синтез амидов

Типовая методика синтеза

К раствору кислоты (200 мг, 0.58 ммоль) и НАТУ (331 мг, 0.87 ммоль) в DMF добавили DIPEA (300 мг, 2.32 ммоль) и оставили на 1 час. После добавили амин (55.6 мг, 0.638 ммоль) и оставили при комнатной температуре на 18 часов. Реакционную смесь экстрагировали 70 мл воды и 3x100 мл BRINE. Полученный органический слой упарили под вакуумом.

Синтез (4-((4-(1-метил-1H-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)фенил) (морфолино)метанон (50)

Выход: 297 мг, 99%, бежево-коричневый порошок, т. пл. 279-280 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.68 (с, 1H), 8.63 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 8.42 – 8.29 (м, 2H), 7.94 (д, J = 8.6 Гц, 2H), 7.55 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.40 (д, J = 8.5 Гц, 2H), 7.34 – 7.12 (м, 3H), 3.90 (с, 3H), 3.70 – 3.44 (м, 8H). R_f 0.50 (DCM:MeOH 95:5 + 1% AcOH). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 2.668) (99%).

Синтез (4-((4-(1-метил-1H-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)фенил) (4-метилпиперазин-1-ил)метанон (51)

Выход: 200 мг, 67%, порошок кирпичного цвета, т. пл. 114-115 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.65 (с, 1H), 8.62 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 8.38 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 8.33 (с, 1H), 7.99 – 7.86 (м, 2H), 7.63 – 7.50 (м, 1H), 7.44 – 7.35 (м, 2H), 7.34 – 7.13 (м, 3H), 3.90 (с, 3H), 3.53 (с, 4H), 2.34 (д, J = 5.1 Гц, 4H), 2.21 (с, 3H). R_f 0.10 (DCM:MeOH 95:5 + 1% AcOH). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 2.536) (100%).

Синтез (4,4-дифторпиперидин-1-ил)(4-((4-(1-метил-1H-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)фенил)метанон (52)

Очищали при помощи DCVC, элюент DCM:EtOAc (0-50%)

Выход: 163 мг, 63%, белый порошок, т. пл. 234-235 °С. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д. (J, Гц):. R_f 0.33 (DCM:EtOAc 1:1). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 2.548) (100%).

Синтез N-циклопропил-4-((4-(1-метил-1H-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензамид (53)

Очищали при помощи DCVC, элюент DCM:EtOAc (0-50%)

Выход: 55 мг, 25%, желто-белый порошок, т. пл. °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.68 (с, 1H), 8.63 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 8.40 (д, J = 5.4 Гц, 1H), 8.33 (с, 1H), 8.24 (д, J = 4.1 Гц, 1H), 7.93 (д, J = 8.4 Гц, 2H), 7.81 (д, J = 8.4 Гц, 2H), 7.56 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.27 (тд, J = 12.9, 7.5 Гц, 3H), 3.90 (с, 3H), 2.85 (дк, J = 7.5, 3.7 Гц, 1H), 0.81 – 0.45 (м, 4H). R_f 0.21 (DCM:EtOAc 1:1). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 2.640) (100%).

Синтез N-бензил-4-((4-(1-метил-1H-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензамид (54)

Очищали при помощи DCVC, элюент DCM:EtOAc (0-50%)

Выход: 117 мг, 46%, желто-белый порошок, т. пл. 205-206 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.72 (с, 1H), 8.87 (т, J = 6.0 Гц, 1H), 8.64 (д, J = 7.8 Гц, 1H), 8.40 (д, J = 5.4 Гц, 1H), 8.33 (с, 1H), 8.05 – 7.81 (м, 4H), 7.55 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.43 – 7.16 (м, 8H), 4.51 (д, J = 5.9 Гц, 2H), 3.90 (с, 3H). R_f 0.35 (DCM:EtOAc 1:1). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 2.498) (100%).

Синтез (4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)(4-((4-(1-метил-1H-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)фенил)метанон (55)

Очищали при помощи DCVC, элюент DCM:MeOH (0-10% + 0.1% Me₂EtN)

Выход: 182 мг, 71%, желтые кристаллы, т. пл. 125-127 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.62 (с, 1H), 8.62 (д, J = 7.9 Гц, 1H), 8.38 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 8.32 (с, 1H), 8.01 – 7.82 (м, 2H), 7.55 (д, J = 8.1 Гц, 1H), 7.37 (д, J = 8.2 Гц, 2H), 7.33 – 7.12 (м, 3H), 3.90 (с, 3H), 3.77 – 3.21 (м, 6H), 2.64 (д, J = 48.7 Гц, 4H), 2.42 – 2.20 (м, 3H). R_f 0.24 (DCM:MeOH 90:10 + 1% TEA). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 3.257) (98%).

Синтез *N*-(2-(диметиламино)этил)-4-((4-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензамид (**56**)

Очищали при помощи DCVC, элюент DCM:MeOH (0-10% + 0.1% Me₂EtN)

Выход: 149 мг, 62%, оранжевый порошок, т. пл. 190-193 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.71 (с, 1H), 8.64 (д, J = 7.8 Гц, 1H), 8.40 (д, J = 5.3 Гц, 1H), 8.33 (с, 1H), 8.28 (т, J = 5.7 Гц, 1H), 7.95 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.85 (д, J = 8.8 Гц, 2H), 7.55 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.41 – 7.11 (м, 3H), 3.90 (с, 3H), 3.41 (к, J = 6.4 Гц, 2H), 2.63 – 2.49 (м, 2H), 2.29 (с, 6H). R_f 0.31 (DCM:MeOH 90:10 + 1% TEA). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 3.115) (99%).

Синтез *N*-(3-(диметиламино)пропил)-4-((4-(1-метил-1*H*-индол-3-ил)пиримидин-2-ил)амино)бензамид (**57**)

Очищали при помощи DCVC, элюент DCM:MeOH (0-10% + 0.1% Me₂EtN)

Выход: 169 мг, 68%, белые кристаллы, т. пл. 135-137 °С. ЯМР ¹H (400 МГц, DMSO-d⁶) δ, м. д. (J, Гц): δ 9.71 (с, 1H), 8.64 (д, J = 7.8 Гц, 1H), 8.43 (дд, J = 23.4, 5.5 Гц, 2H), 8.34 (с, 1H), 8.07 – 7.78 (м, 4H), 7.55 (д, J = 8.0 Гц, 1H), 7.38 – 7.16 (м, 3H), 3.90 (с, 3H), 3.32 (к, J = 6.5 Гц, 2H), 2.65 (т, J = 7.4 Гц, 2H), 2.42 (с, 6H), 1.79 (п, J = 7.0 Гц, 2H). R_f 0.23 (DCM:MeOH 90:10 + 1% TEA). ВЭЖХ (NH-2, 261 нм, t_{уд} 3.674) (100%).

3.4 Биологические испытания

3.4.1 Культивирование клеточных линий

Культивирование клеточной линии A549

Клеточная линия A549 была получена из ATCC. Клетки A549 поддерживали в питательной среде F-12K Medium с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 мМ). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95 % воздуха/ 5 % CO₂ при 37 °С.

Субконфлюэнтный монослой в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере (PBS) и трижды промывали полной питательной средой F-12K Medium. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

Культивирование клеточной линии WI-26 VA4

Клеточная линия WI-26 VA4 была получена из ATCC. Клетки A549 поддерживали в питательной среде EMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина (100 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 mM). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95 % воздуха/ 5 % CO₂ при 37 °C. Субконфлюэнтный монослой в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере (PBS) и трижды промывали полной питательной средой EMEM. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

3.4.2 Оценка жизнеспособности при помощи МТТ-теста

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток определяли с помощью колориметрического теста МТТ. Подготовка клеток к МТТ включала в себя процесс трипсинизации и подсчета клеток. Все исследуемые клетки разбавляли питательной средой до 5x10³ клеток/лунку в прозрачном 96-луночном планшете (Eppendorf). Через 24 ч клетки обрабатывали исследуемыми соединениями по отдельности в различных концентрациях и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Далее клетки обрабатывали 40 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение 4 часов при тех же условиях. Затем содержимое лунок удаляли и добавляли DMSO (150 мкМ) для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность каждой лунки определяли при 560 нм на планшетном ридере Promega. Полученные данные обрабатывались в приложении GraphPad Prism для анализа и визуализации результатов в виде графиков.

3.5 Компьютерное моделирование

Все расчеты в рамках выполненной выпускной квалификационной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2024-1 на рабочей станции на рабочей станции, снабженной 64 процессорами AMD Ерус 7513 (тактовая частота 2.6 ГГц) и двумя графическими картами NVIDIA GA102GL (RTX A5000), под управлением ОС Ubuntu 22.04.

3.5.1 Подготовка белков

Трехмерные структуры ULK1 (PDB ID: 4WNP [48]) и ULK2 (PDB ID: 6YID [44]) были загружены из Protein Data Bank. Подготовка белков проводилась с помощью модуля Protein Preparation Workflow [Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments]. Там, где это было необходимо, были добавлены отсутствующие атомы в боковых цепях, уточнены некоторые порядки связей, предсказаны состояния протонирования для гетероатомов с помощью алгоритма Epik [Epik: A software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules] $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$, а также были добавлены атомы водорода, отсутствующие петли достроены. Комплекс был подвергнут этапу минимизации, все молекулы воды удалены. Затем структуры были дополнительно проверены с помощью модуля Protein Reliability Report — для проведения дальнейших вычислений в обоих комплексах выбраны цепи А.

3.5.2 Подготовка лигандов

Структуры исследуемых соединений были созданы с использованием модуля 2D-Sketcher, подготовлены с помощью LigPrep [Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments], хиральность определялась на основании 3D-представления, состояния протонирования гетероатомов определялись с помощью алгоритма Epik [Epik: A software program for pKa prediction and protonation state

generation for drug-like molecules] $pH = 7.4 \pm 0.2$. Значения физико-химических свойств были рассчитаны с помощью QikProp [51] и Prime [52].

3.5.3 IFD-MD

Рабочий процесс Induced Fit Docking-Molecular Dynamics [54] запускался с использованием графического интерфейса модуля IFD-MD, представленного в Maestro. В качестве шаблона были выбраны подготовленные комплексы ULK1 и ULK2, а структура соединения **176** – в качестве лиганда для стыковки. Сам расчет производился в режиме нековалентной (noncovalent) стыковки, дополнительно было произведено уточнение силового поля OPLS [63]. Значения остальных параметров запуска были оставлены по умолчанию и не изменялись.

3.5.4 Молекулярный докинг и расчет свободной энергии связывания ММ-GBSA

Грид-боксы были рассчитаны с помощью модуля Receptor Grid Generation. Область стыковки определялась как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с центром масс нативного лиганда. Параметры масштабирования радиусов Ван-дер-Ваальса и отсечки значений частичных зарядов были установлены по умолчанию и не изменялись. Дополнительно были указаны остатки, с которыми нативный лиганд образовывал водородные связи. Всем тиольным или гидроксильным группам аминокислот сайта было позволено вращение.

Структуры всех исследуемых соединений, а также кристаллических лигандов были подвергнуты гибкой стыковке с помощью модуля Ligand Docking в режиме точности Glide XP [61]. Дополнительно с помощью модуля Prime [52] на основе полученных поз был проведен расчет свободной энергии связывания методом ММ-GBSA, все параметры устанавливались по умолчанию и не изменялись.

Заключение

В ходе дизайна исследования, которое основывалось на перепрофилировании лиганда тирозинкиназы EGFR осимертиниба в сочетании с ингибитором поздней аутофагии хлорохином, был идентифицирован основной скаффолд, обеспечивающий ключевые взаимодействия с шарнирной областью сайта мишеней ULK1/2, а также фрагмент, понижающий функциональность лизосомальных гидролаз, путем удержания в лизосомах в виде соли.

Диверсифицированная библиотека, состоящая из 8 соединений, была получена путем амидирования 4-(4-(*N*-метилиндол-3-ил)пиримидин-2-ил)аминобензойной кислоты аминами, содержащими сольбилизирующие группы. Структура и чистота целевых соединений были подтверждены спектрами ЯМР ¹H и ВЭЖХ.

Оценка жизнеспособности проводилась при помощи МТТ-теста на клеточных линиях A549, WI-26 VA4. Полученные кривые доза-эффект, позволили идентифицировать соединения хиты **54**, **55** и **56**. В случае первого лиганда, проявляется выраженный антипролиферативный эффект с терапевтическим окном в отношении двух клеточных линий, что открывает возможность к оптимизации бензиламинового фрагмента с целью увеличения эффективности. Соединения **55** и **56**, имеющие наибольшую ингибирующую способность, проявляют выраженный цитотоксический эффект в отношении обеих линий с узким или вовсе отсутствующим терапевтическим окном.

Полученные хиты **54-56**, имеющие наименьшие значения концентрации полумаксимального ингибирования на клеточных линиях A549/WI-26 VA4, являются потенциальными ингибиторами EGFR. Дальнейшие исследования направлены на оценку биологической активности по отношению к ULK1/2.

Список используемой литературы

1. Anticancer Effect of Korean Red Ginseng via Autophagy-and Apoptosis-Mediated Cell Death / K.A. Kang, C.W. Yao, M.J. Piao et al // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14, № 17. – P. 3558-3561.
2. von Muhlinen N. Methods to measure autophagy in cancer metabolism / von Muhlinen N // *Cancer Metabolism: Methods and Protocols*. – 2019. – P. 149-173.
3. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates / D.F. Egan, M.G.H. Chun, M. Vamos et al. // *Molecular cell*. – 2015. – Vol. 59, № 2. – P. 285-297.
4. DNA-dependent protein kinase regulates lysosomal AMP-dependent protein kinase activation and autophagy / P. Puustinen, A. Keldsbo, E. Corcelle-Termeau et al. // *Autophagy*. – 2020. – Vol. 16, № 10. – P. 1871-1888.
5. Boya P. Emerging regulation and functions of autophagy / P. Boya, F. Reggiori, P. Codogno // *Nature cell biology*. – 2013. – Vol. 15, № 7. – P. 713-720.
6. Okamoto K. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy / K. Okamoto, N. Kondo-Okamoto, Y. Ohsumi // *Developmental cell*. – 2009. – Vol. 17, № 1. – P. 87-97.
7. Phosphoglycerate kinase 1 phosphorylates Beclin1 to induce autophagy / X. Qian, X. Li, Q. Cai et al. // *Molecular cell*. – 2017. – Vol. 65, № 5. – P. 917-931.
8. Uttenweiler A. Microautophagic vacuole invagination requires calmodulin in a Ca²⁺-independent function / A. Uttenweiler, H. Schwarz, A. Mayer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 39. – P. 33289-33297.
9. Kunz J. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro / J.B. Kunz, H. Schwarz, A. Mayer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 11. – P. 9987-9996.

10. Morshed S. ESCRT machinery plays a role in microautophagy in yeast / S. Morshed, M.N. Tasnin, T. Ushimaru // BMC Molecular and Cell Biology. – 2020. – Vol. 21, № 1. – P. 1-10.

11. STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes / Y. Kuchitsu, K. Mukai, R. Uematsu et al. // Nature Cell Biology. – 2023. – Vol. 25, № 3. – P. 453-466.

12. Mortimore G.E. Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation / G.E. Mortimore, B.R. Lardeux, C.E. Adams // Journal of Biological Chemistry. – 1988. – Vol. 263, № 5. – P. 2506-2512.

13. Chaperone-mediated autophagy sustains haematopoietic stem-cell function / S. Dong, Q. Wang, A. Diaz et al. // Nature. – 2021. – Vol. 591, № 7848. – P. 117-123.

14. Effects of small molecules on chaperone-mediated autophagy / P.F. Finn, N.T. Mesires, M. Vine et al. // Autophagy. – 2005. – Vol. 1, № 3. – P. 141-145.

15. Phosphorylation of ULK1 affects autophagosome fusion and links chaperone-mediated autophagy to macroautophagy / C. Wang, H. Wang, D. Zhang et al. // Nature communications. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 3492-3499.

16. Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats / M. Xilouri, O.R. Brekk, A. Polissidis et al. // Autophagy. – 2016. – Vol. 12, № 11. – P. 2230-2247.

17. Schneider J.L. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation / J.L. Schneider, Y. Suh, A.M. Cuervo // Cell metabolism. – 2014. – Vol. 20, № 3. – P. 417-432.

18. Targetome analysis of chaperone-mediated autophagy in cancer cells / Y. Hao, M. Kacal, A.T. Ouchida et al. // Autophagy. – 2019. – Vol. 15, № 9. – P. 1558-1571.

19. Cuervo A.M. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy / A.M. Cuervo, J.F. Dice // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, № 40. – P. 31505-31513.

20. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age / R. Kiffin, S. Kaushik, M. Zeng et al. // *Journal of cell science*. – 2007. – Vol. 120, № 5. – P. 782-791.

21. Early cellular changes after blockage of chaperone-mediated autophagy / A.C. Massey, A. Follenzi, R. Kiffin et al. // *Autophagy*. – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 442-456.

22. SKA2 regulated hyperactive secretory autophagy drives neuroinflammation-induced neurodegeneration / J. Hartmann, T. Bajaj, J. Otten et al. // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 2635-2639.

23. Loss of WIPI4 in neurodegeneration causes autophagy-independent ferroptosis / Y. Zhu, M. Fujimaki, L. Snape et al. // *Nature Cell Biology*. – 2024. – P. 1-10.

24. Autophagy regulates the maturation of hematopoietic precursors in the embryo / Y. Liu, L. Shi, Y. Chen et al. // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 2255-2258.

25. p27 controls Ragulator and mTOR activity in amino acid-deprived cells to regulate the autophagy-lysosomal pathway and coordinate cell cycle and cell growth / A. Nowosad, P. Jeannot, C. Callot et al. // *Nature Cell Biology*. – 2021. – Vol. 23, № 9. – P. 1048-1048.

26. ULK1 O-GlcNAcylation is crucial for activating VPS34 via ATG14L during autophagy initiation / K.E. Pyo, C. R. Kim, M. Lee et al. // *Cell reports*. – 2018. – Vol. 25, № 10. – P. 2878-2890.

27. The interplay of mitophagy, autophagy, and apoptosis in cisplatin-induced kidney injury: involvement of ERK signaling pathway / I. Suman, L. Simic, G.C. Juresic et al. // *Cell Death Discovery*. – 2024. – Vol. 10, № 1. – P. 98-105.

28. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy / N. Hosokawa, T. Hara, T. Kaizuka et al. // *Molecular biology of the cell*. – 2009. – Vol. 20, № 7. – P. 1981-1991.

29. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1 / A.M.J. Sanchez, A. Csibi, A. Raibon et al. // *Journal of cellular biochemistry*. – 2012. – Vol. 113, № 2. – P. 695-710.

30. Sabatini D.M. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth / D.M. Sabatini // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114, № 45. – P. 11818-11825.

31. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy / D.F. Egan, D.B. Shackelford, M.M. Mihaylova et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 331, № 6016. – P. 456-461.

32. Resveratrol protects osteocytes against oxidative stress in ovariectomized rats through AMPK/JNK1-dependent pathway leading to promotion of autophagy and inhibition of apoptosis / L. Wei, S. Chai, C. Yue et al. // *Cell Death Discovery*. – 2023. – Vol. 9, № 1 – P. 16-20.

33. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1/ J. Kim, M. Kundu, B. Viollet et al. // *Nature cell biology*. – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 132-141.

34. Discovery of small-molecule compounds and natural products against Parkinson's disease: Pathological mechanism and structural modification / Z. Zhong, X. He, J. Ge et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 237. – P. 114378-114383.

35. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion / M. Mauthe, I. Orhon, C. Rocchi et al. // *Autophagy*. – 2018. – Vol. 14, № 8. – P. 1435-1455.

36. Discovery of the polyamine conjugate with benzo[cd] indol-2(1*H*)-one as a lysosome-targeted antimetastatic agent / J. Li, R. Tian, C. Ge et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 61, № 15. – P. 6814-6829.

37. Synthesis of improved lysomotropic autophagy inhibitors / T. Wang, M.L. Goodall, P. Gonzales et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 58, № 7. – P. 3025-3035.

38. The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair / D.H. Liang, D.S. Choi, J.E. Ensor et al. // *Cancer letters*. – 2016. – Vol. 376, № 2. – P. 249-258.

39. Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis / Y.C. Lin, J.F. Lin, S.I. Wen et al. // *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. – 2017. – Vol. 33, № 5. – P. 215-223.

40. The clinicopathological significance and potential function of ULK1 in colon cancer / P. Lv, Z. Wu, L. Lai et al. // *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. – 2023. – P. 1-14.

41. Small-molecule activator of UNC-51-like kinase 1 (ULK1) that induces cytoprotective autophagy for Parkinson's disease treatment / L. Ouyang, L. Zhang, S. Zhang et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 61, № 7. – P. 2776-2792.

42. Conservation of structure, function and inhibitor binding in UNC-51-like kinase 1 and 2 (ULK1/2) / A. Chaikuad, S.E. Koschade, A. Stolz et al. // *Biochemical Journal*. – 2019. – Vol. 476, № 5. – P. 875-887.

43. Kumar M. A pan-cancer assessment of alterations of the kinase domain of ULK1, an upstream regulator of autophagy / M. Kumar, E. Papaleo // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 14874-14878.

44. Design, synthesis, and characterization of an orally active dual-specific ULK1/2 autophagy inhibitor that synergizes with the PARP inhibitor olaparib for the treatment of triple-negative breast cancer / H. Ren, N.A. Bakas, M. Vamos et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol. 63, № 23. – P. 14609-14625.

45. Lazarus M.B. Discovery and structure of a new inhibitor scaffold of the autophagy initiating kinase ULK1 / M.B. Lazarus, K.M. Shokat // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2015. – Vol. 23, № 17. – P. 5483-5488.

46. In silico HTS and structure-based optimization of indazole-derived ULK1 inhibitors / S.D. Wood, W. Grant, I. Adrados et al. // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2017. – Vol. 8, № 12. – P. 1258-1263.

47. The role of the key autophagy kinase ULK1 in hepatocellular carcinoma and its validation as a treatment target / S.T. Xue, K. Li, Y. Gao et al. // *Autophagy*. – 2020. – Vol. 16, № 10. – P. 1823-1837.

48. Lazarus M.B. Structure of the human autophagy initiating kinase ULK1 in complex with potent inhibitors / M.B. Lazarus, C.J. Novotny, K.M. Shokat // *ACS chemical biology*. – 2015. – Vol. 10, № 1. – P. 257-261.

49. Computer aided drug design (CADD): from ligand-based methods to structure-based approaches / S. Maji, S.K. Pattanayak, A. Sen et al. // *Elsevier*. – 2022. – P. 157-179.

50. Chackalamannil S. *Comprehensive medicinal chemistry III* / S. Chackalamannil, D. Rotella, S. Ward // *Elsevier*. – 2017. – P. 266-267.

51. Jorgensen W. Prediction of drug solubility from structure / W.L. Jorgense, E.M. Duffy // *Advanced drug delivery reviews*. – 2002. – Vol. 54, № 3. – P. 355-366.

52. База знаний Schrödinger, статья о Prime MM/GBSA. URL: <https://www.schrodinger.com/kb/1647/> (дата обращения: 3.12.2023)

53. The VSGB 2.0 model: A next generation energy model for high resolution protein structure modeling / J. Li, R. Abel, K. Zhu et al. // *PROTEINS: Structure, function, and bioinformatics*. — 2011. — Vol. 79, № 10. — P. 2794-2812.

54. Reliable and accurate solution to the induced fit docking problem for protein–ligand binding / E. B. Miller, R. B. Murphy, D. Sindhikara et al. // *Journal of Chemical Theory and Computation*. – 2021. – Vol. 17, № 4. – P. 2630-2639

55. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results / S.L. Dixon, A.M. Smondyrev, E.H. Knoll et al. // Journal of computer-aided molecular design. – 2006. – Vol. 20. – P. 647-671.

56. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy / R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy et al. // Journal of medicinal chemistry. – 2004. – Vol. 47, № 7. – P. 1739-1749.

57. WScore: a flexible and accurate treatment of explicit water molecules in ligand–receptor docking / R. B. Murphy, M. P. Repasky, J. R. Greenwood et al. // Journal of medicinal chemistry. – 2016. – Vol. 59, № 9. – P. 4364-4384.

58. Cappel D. Calculating water thermodynamics in the binding site of proteins–applications of WaterMap to drug discovery / D. Cappel, W. Sherman, T. Beuming // Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 17, № 23. – P. 2586-2598

59. Exploring ligand stability in protein crystal structures using binding pose metadynamics / L. Fusani, D.S. Palmer, D.O. Somers et al. // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2020. – T. 60. – № 3. – C. 1528-1539.

60. Enhancing hit discovery in virtual screening through accurate calculation of absolute protein-ligand binding free energies / W. Chen, D. Cui, S.V. Jerome et al. – 2022.

61. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes / R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky et al. //Journal of medicinal chemistry. – 2006. – Vol. 49, № 21. – P. 6177-6196.

62. Design, synthesis and structure-activity relationship studies of 4-indole-2-arylamino pyrimidine derivatives as anti-inflammatory agents for acute lung injury / T. Chen, Y. Wei, G. Zhu et al. // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 225, № 21. – P. 113766-113769.

63. OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space / C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi et al. // Journal of chemical theory and computation. – 2021. – Vol. 17, № 7. – P. 4291-4300.