

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 Определение липофильности новых лигандов цереброна

Обучающийся

К.В. Намадова

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

к.х.н., О.Б. Григорьева

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

## Аннотация

Целью данной работы является экспериментальное определение липофильности лигандов цереблona как одной из ключевых характеристик при скрининге новых активных субстанций.

Дипломная работа состоит из следующих логически взаимосвязанных частей: обзор литературы, методология эксперимента, анализ результатов и сравнение теоретических и экспериментальных данных.

В литературном обзоре рассмотрены значимость производных глутаридамида в качестве объектов исследования лигандов цереблona и роль липофильности как одного из важнейших параметров при оценке биологически активных веществ. Освещены основные методы экспериментального определения липофильности в химических исследованиях.

В аналитической части исследования был проведен анализ экспериментальных данных и их сравнение с результатами, полученными методом *in silico*. В рамках исследования также была проведена оценка взаимосвязи между параметрами LE, LLE, IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub> и липофильностью изучаемых соединений.

В экспериментальной части работы представлена методика определения коэффициента распределения с использованием ОФ-ВЭЖХ, а также проведен расчет факторов удерживания для изучаемых соединений.

Изучение результатов, полученных как экспериментальными, так и теоретическими методами, а также анализ взаимосвязи между параметрами LE, LLE, IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub> и липофильностью, позволили сделать вывод о возможности предсказания липофильности с помощью специализированных программ. Однако для обеспечения надежности рекомендуется использовать экспериментальные методы.

Данная дипломная работа изложена на 67 страницах, включает 8 рисунков, 4 таблицы и 2 приложения.

## Abstract

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

The graduation work consists of an introduction, three chapters, 18 figures, 4 tables, a conclusion, the list of 45 references including foreign sources and appendices.

The aim of this work is the experimental determination of the lipophilicity of cereblon ligands as a key characteristic in screening new active substances.

The object of the graduation work is glutarimide derivatives, which are considered as potential new ligands for cereblon.

The graduation project is divided into several logically connected parts: a literature review, the experimental methodology, the analysis of results, and the comparison of theoretical and experimental data.

The literature review examines the significance of glutarimide derivatives as cereblon ligands and the role of lipophilicity as a crucial parameter in evaluating these compounds. The main methods for experimentally determining lipophilicity are also highlighted.

In the analytical part of the study, an analysis of experimental data was conducted and compared with results obtained using *in silico* methods. The research also involved assessing the relationship between parameters LE, LLE, IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub>, and the lipophilicity of the compounds under study.

The experimental part of the work presented a methodology for determining the distribution coefficient using HPLC, along with calculating retention factors for the compounds studied.

Studying the results obtained from both experimental and theoretical methods, as well as analyzing the correlation between parameters LE, LLE, IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub>, and lipophilicity, allowed us to conclude that lipophilicity can be predicted using specialized software. However, for reliability, it is recommended to rely on experimental methods.

## Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор .....	7
1.1 Понятие липофильности.....	7
1.2 Методы определение липофильности.....	9
1.3 Лиганды цереблон.....	14
1.4 PROTAC на основе CRBN.....	20
2 Результаты и обсуждения.....	27
3 Экспериментальная часть.....	39
3.1 Реагенты и оборудование .....	39
3.2 Методика проведения эксперимента .....	39
3.3 Определение значения фактора удерживания .....	40
Заключение .....	41
Список используемой литературы .....	42
Приложение А Графики зависимостей фактора удерживания исследуемых соединений от доли метанола в подвижной фазе.....	48
Приложение Б Физико-химические свойства, рассчитанные <i>in silico</i> .....	55

## Определения, обозначения и сокращения

BRD4	бромодоменсодержащий белок 4
BTK	тирозинкиназа Брутона
CRBN	цереблон
CUL4	куллин 4
CRL4	куллин-RING-лигаза 4
CLIPAC	внутриклеточные клик-образующие химеры, нацеленные на протеолиз
DDB1	белок, связывающий повреждения ДНК
RBX1	RING-box белок 1
IMiD	иммуномодулирующие препараты
IAP	ингибитор белка апоптоза
MDM2	гомолог двойной минуты 2 мыши
UPS	убиквитин-протеасомная система
PROTAC	химера, нацеленная на протеолиз
POI	белок интереса
UPS	убиквитин-протеасомная система
VHL	белок фон Гиппеля — Линдау
ОФ-ВЭЖХ	обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ОФ-ТСХ	обращенно-фазовая тонкослойная хроматография
ПФ	подвижная фаза
НФ	неподвижная фаза

## Введение

В современном мире медицинская химия занимает ключевое положение в разработке новых лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний. Ее значимость особенно проявляется в контексте постоянно изменяющихся вызовов, таких как новые виды болезней, множественная резистентность к антибиотикам и необходимость в поиске более эффективных и безопасных методов лечения.

Изучение молекулярных механизмов заболеваний и создание эффективных терапевтических средств являются важными аспектами медицинской химии. Особое внимание уделяется поиску и анализу лигандов, способных взаимодействовать с биологическими мишенями для регулирования их активности. При разработке лекарственных препаратов важно учитывать как их биологическую активность, так и физико-химические свойства. Один из ключевых показателей, который необходимо принимать во внимание при отборе биологически активных соединений, — это коэффициент распределения  $\log P$ . В соответствии с правилом Липински, потенциальные лекарственные средства должны иметь коэффициент липофильности не выше 5, что способствует их лучшей биодоступности и терапевтической эффективности.

Цель работы: экспериментальное определение липофильности лигандов цереблona, как одной из ключевых характеристик при скрининге новых активных субстанций.

Задачи:

1. Определить логарифмы коэффициентов удерживания новых лигандов цереблona методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).
2. Рассчитать значения липофильности для исследуемых соединений.
3. Выявить взаимосвязь структуры новых лигандов цереблona и их аффинности с липофильностью.

# 1 Литературный обзор

## 1.1 Понятие липофильности

Липофильность является важной характеристикой химических соединений, определяющей их способность взаимодействовать с липидами и гидрофобными средами. Этот термин обозначает способность вещества растворяться в жирах, маслах, липидах и неполярных растворителях.

Липофильность или гидрофобность имеет значительную роль в формировании фармакокинетических и фармакодинамических характеристик лекарственных средств. Важность липофильности в фармакологии подчеркивается ее влиянием на эффективность, безопасность и биодоступность лекарственных средств [1].

Обычно липофильность выражается через параметр гидрофобности  $\log P$ , который является коэффициентом распределения вещества в системе н-октанол-вода и вычисляется по формуле 1

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

где  $C_{oct}$  равновесная концентрация растворенного вещества в октаноле (неполярной фазе)

$C_{wat}$  - равновесная концентрация в водной фазе (полярной фазе)

Для ионизируемого растворенного вещества липофильность часто выражается в терминах логарифма коэффициента распределения  $\log D$ , [2] включающего вклад всех ионных видов в общую гидрофобность аналита вместо  $\log P$ .  $\log D$  вычисляется по формуле 2

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

Правило Липински или «правило пяти» — это эмпирическое правило, которое используется для оценки препаратоподобности химических соединений, особенно в контексте их потенциального приема внутрь и усвоения в организме человека. Это правило было предложено Кристофером А. Липински и его коллегами в 1997 году [3]. Оно помогает определить, насколько вероятно, что соединение будет успешно использоваться как лекарственное средство для перорального приема.

Данное правило гласит:

– молекулярная масса не менее 500. Молекулы большего размера могут иметь ограниченную способность проникать через клеточные мембраны и обладают низкой биодоступностью;

– количество акцепторов водородной связи должно быть не более 10. Акцепторы водородной связи обычно представлены атомами кислорода или азота в молекуле, способными образовывать водородные связи с молекулами воды. Избыток акцепторов водородной связи может повлиять на пероральное введение;

– количество доноров водородной связи должно быть не более 5. Доноры водородной связи обычно представлены атомами водорода, прямо связанными с электроотрицательными атомами, такими как кислород или азот. Избыток доноров водородной связи также может оказать влияние на пероральное введение;

– логарифм коэффициента распределения  $\log P$  должен быть меньше или равен 5.  $\log P$  измеряет липофильность или гидрофобность соединения, указывая на его способность разделения между гидрофобной фазой (например, липидными мембранами) и водной фазой. Избыточная липофильность может привести к низкой растворимости.



## 1.2 Методы определение липофильности

Существует несколько методов определения липофильности, позволяющих оценить взаимодействие вещества с липидами и липидными средами. Основными методами являются метод встряхивания колбы, и хроматографические методы.

### 1.2.1 Метод встряхивание колбы

Самым старым и наиболее известным методом измерения липофильности является метод встряхиваемой колбы, также известный как метод "shake-flask" [4]. Этот метод заключается в измерении коэффициента распределения  $\log P$  вещества между двумя фазами - *n*-октанолом и водой.

Процедура включает растворение анализируемого вещества в двух отдельных колбах: одна колба заполнена водным буферным раствором, а другая содержит органический растворитель, в частности *n*-октанол. Перед введением соединения оба раствора подвергаются насыщению. Затем эти растворы переносят в лабораторный сепаратор и энергично встряхивают, чтобы облегчить уравнивание растворенного вещества между водной и органической фазами, как показано на рисунке 1. После достижения равновесия концентрацию соединения, растворенного в каждой фазе, определяют с помощью спектрофотометрии или другого подходящего аналитического метода [5].

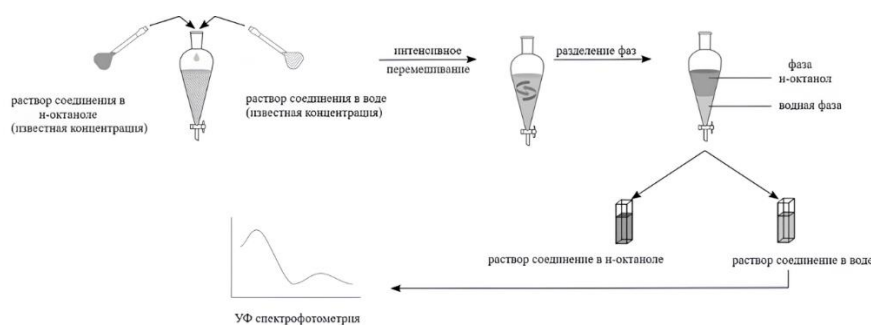


Рисунок 1 - Процедура метода встряхивания [6]

Из-за своей простоты метод встряхиваемой колбы рекомендуется в качестве эталонной процедуры для других методов измерения липофильности. Однако надежное измерение липофильности этим методом возможно только в диапазоне значений  $\log P$  от -3 до 4. Кроме того, процедура является трудоемкой, требует значительного времени и относительно большого количества чистых растворенных веществ. Возможно также образования стабильных эмульсий после этапа встряхивания

### **1.2.2 Определение гидрофобности методом ВЭЖХ**

Хроматографические методы применяются для определения липофильности с 1970-х годов. Благодаря своим многочисленным преимуществам и относительно небольшому количеству ограничений, в настоящее время они являются наиболее популярными экспериментальными косвенными методами оценки значений  $\log P$ .

В настоящее время одна из наиболее часто используемых процедур в исследованиях липофильности является обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. В целом этот метод основан на динамическом распределении соединения между двумя несмешивающимися фазами, подвижной и неподвижной, что согласуется с определением коэффициента распределения. Распределение соединения между ПФ и НФ напрямую связано со временем хроматографического удерживания ( $t_R$ ). В качестве подвижной фазы используют водные растворы и органические модификаторы.

Наиболее распространёнными органическими модификаторами выступают метанол ( $\text{MeOH}$ ) и ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Метанол обладает свойствами, близкими к воде, и не нарушает структуру водородных связей, в то время как ацетонитрил более сходен с органической фазой.

Биологические активные молекулы в той или иной степени диссоциируют в водных подвижных фазах. При работе с диссоциирующими соединениями добавки подвижной фазы часто оказываются незаменимыми. Буферы являются наиболее подходящими подавителями ионов и широко

применяются в качестве добавки к подвижной водной фазы. Морфолинопропансульфоновая кислота (MOPS), фосфатный буфер и фосфатно-солевой буфер (PBS) чаще всего используются для оценки липофильности с помощью ОФ-ВЭЖХ.

В качестве неподвижной фазы в ОФ-ВЭЖХ используют колонки C18 на основе диоксида кремния. Однако воздействие силанофильных взаимодействий в механизме разделения было признано серьезным недостатком, особенно для основных соединений. Силанофильные взаимодействия в основном связаны с оставшимися свободными силанольными центрами и включают водородные связи и электростатические силы, особенно по отношению к положительно заряженным основным соединениям, что приводит к значительному увеличению удерживания и искажениям формы пиков [7]. В ответ на эту проблему были проведены тщательные исследования колонок с различными наполнителями и было предложено разработать стационарные фазы на основе кремнезема и полимера.

Ломбардо и группа ученых исследовали влияние октанола-1 в подвижной фазе на измерение  $\log P$  для набора различных нейтральных препаратов на стационарной фазе LC-ABZ. Они обнаружили значительную корреляцию между  $\log k$  и  $\log P$  в присутствии н-октанол-вода при pH 7,4 для нейтральных и основных лекарственных средств [8].

Для дальнейшего изучения оптимальных условий и применимого диапазона получения значений коэффициентов распределения октанол-вода с использованием обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), группа исследователей выбрала набор из 46 нейтральных соединений, а также веществ с кислотными и амфотерными функциональными группами, которые сохраняют нейтральность при pH 2,5 или 4. Коэффициенты распределения для этих соединений определялись на стационарной фазе Discovery-RP-Amide-C16 с использованием метанол/фосфатного буферного элюента, как с добавлением н-октанола, так и

без него. Все соединения, включенные в исследование, обладали биологической активностью и представляли широкий спектр структурного разнообразия, а значения  $\log P$  варьировались от -0,69 до 5,7 [9].

В качестве косвенного измерения липофильности ОФ-ВЭЖХ напрямую не дает коэффициент распределения, а скорее индекс липофильности, который коррелирует с коэффициентом распределения. Индекс липофильности рассчитывается исходя из предположения, что соединения удерживаются пропорционально их коэффициенту неводно-водного распределения, при этом гидрофильные соединения элюируются первыми, а липофильные соединения - последними, и выражается фактором удерживания. Фактор удерживания легко вычисляется с использованием времени удерживания ( $t_r$ ), согласно уравнению (3):

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

где  $t_r$ - время удерживания растворенного вещества;

$t_0$ - мертвое время удерживания.

В подходящих изократических условиях  $\log P$  исследуемого соединения получается путем измерения его коэффициента удерживания и последующего ввода значений  $k$  в уравнение Колландера 4:

$$\log P = a \times \log k + b, \quad (4)$$

где  $a$  и  $b$  – константы регрессии для наклона и точки пересечения, полученные путем линейной регрессии  $\log P$  эталонных веществ к  $\log k$  эталонных веществ.

### 1.2.3 Обращенно-фазовая тонкослойная хроматография

Обращенно-фазовая тонкослойная хроматография (ОФ-ТСХ) представляет собой простой метод жидкостной хроматографии, который используется для косвенного определения изотропной липофильности [10]. В ОФ-ТСХ и высокоэффективной тонкослойной хроматографии с обратной фазой (ОФ-ВЭТСХ), неподвижной фазой применяют коммерчески доступная пластинка силикагеля с С8 или С18 (рисунок 2).

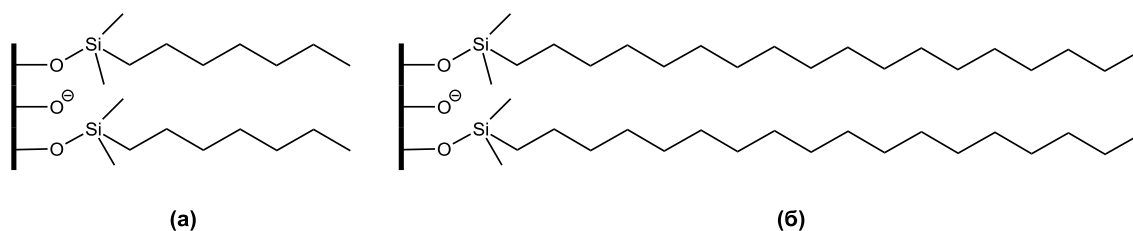


Рисунок 2 – Неподвижные фазы на основе октила (а) и октадецила (б)

Подвижные фазы в хроматографических системах обычно состоят из смеси воды (или буферного раствора) и органического растворителя, который действует как модификатор. Метанол часто используется из-за его хорошей смешиваемости с водой, но также могут применяться тетрагидрофуран или ацетонитрил [11].

В обращенно-фазовых системах удерживание веществ главным образом определяется их распределением между стационарной и подвижной фазами. Для расчета индекса липофильности в этом методе используется параметр  $R_M$ , который вычисляется по определенной формуле 5:

$$R_M = \log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right), \quad (5)$$

где  $R_f$  - коэффициент удерживания, определяемый как отношение расстояния, пройденного образцом, к расстоянию, пройденному подвижной фазой.

Значения коэффициента удерживания  $R_M$  рассчитываются в присутствии различных концентраций органических растворителей в подвижной фазе. Затем устанавливается линейная зависимость между полученными данными и пропорциями подвижной фазы. Для определения коэффициентов распределения проводится экстраполяция к подвижной фазе чистой воды, согласно уравнению 6 [12]:

$$R_M = R_{MW} + S\varphi, \quad (6)$$

где  $\varphi$  - объемный процент органического модификатора;

$S$  - наклон графика регрессии;

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

### 1.3 Лиганды цереблон

CRBN был впервые обнаружен Джозефом Дж. Хиггинсом [13] в 2004 году как ген, ассоциированный с аутосомно-рецессивной несиндромальной умственной отсталостью. Клиническое значение CRBN начало привлекать внимание, когда было обнаружено, что этот белок отвечает за тератогенность.

CRBN представляет собой белок, который состоит из 442 аминокислот, с массой около 200 кДа, локализующихся в тканях организма. Он состоит из трех доменов: N-концевого протеаз подобного домена Lon, спирально-пучковый HBD домен и C-концевого талидомид-подобного домена, известного как связывающий домен TBD. TBD содержит карман для связывания лекарственных средств.

CRBN рекрутируется в лигазный модуль Cullin-4-ROC1 с адаптерным белком DDB1, состоящим из трех бета-пропеллерных доменов WD-40 (BPA, BPB и BPC).

CRBN вступает в роли рецептора в лигазном комплексе CRL3, особенно в составе комплекса CRL4. В дополнение к цереблону, этот ферментативный комплекс включает в себя белок, который связывается с участками

повреждений ДНК (DDB1), а также куллин-4 (CUL4 A/B) и регулятор куллинов-1 (ROC1), часто называемый RING box protein-1 (RBX1) [14].

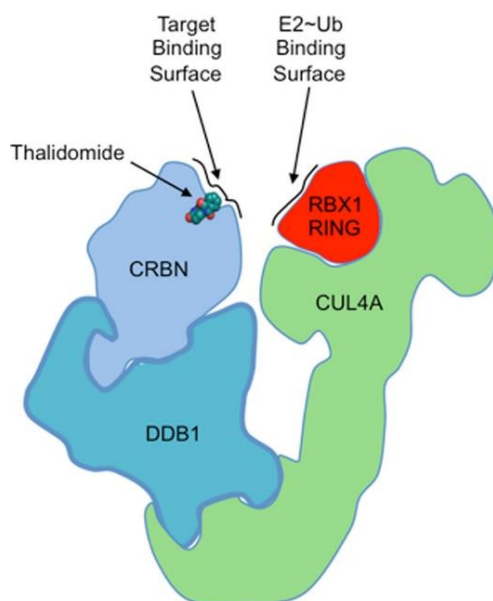


Рисунок 3 - Строение комплекса CRL4 с талидомидом

В 2010 году было установлено, что единственным белком, связывающим талидомид, был CRBN [15]. Талидомид был представлен как безопасное седативное средство с 1957 года немецкой компанией Grünenthal. Он доказал свою эффективность как противорвотное средство и назначался при тошноте на ранних стадиях беременности. Однако к концу ноября 1961 года стало известно, что талидомид является причиной развития фокомелии (отсутствие проксимальных отделов конечностей, кисти рук или стопы ног) у детей, матери которых принимали данный препарат [16]. В 1960-х годах талидомид был изъят из продажи из-за многочисленных смертей, а также было зафиксировано случаи врожденных дефектов у новорожденных. Тем не менее, впоследствии было обнаружено, что талидомид оказывает эффективное воздействие при множественной миеломе и узловатой лепрозной эритеме [17,18].

Лечебный эффект талидомида против множественной миеломы привел к разработке его производных леналидомида и помалидомида. Помалидомид представляет собой соединение, в котором к фталимиду талидомида добавлена аминогруппа, а леналидомид имеет структуру помалидомида без карбонильной группы во фталимидном фрагменте (рисунок 4). Оба соединения называются иммуномодулирующими препаратами (IMiD) и обладают более мощной иммуномодулирующей активностью, чем талидомид [19].

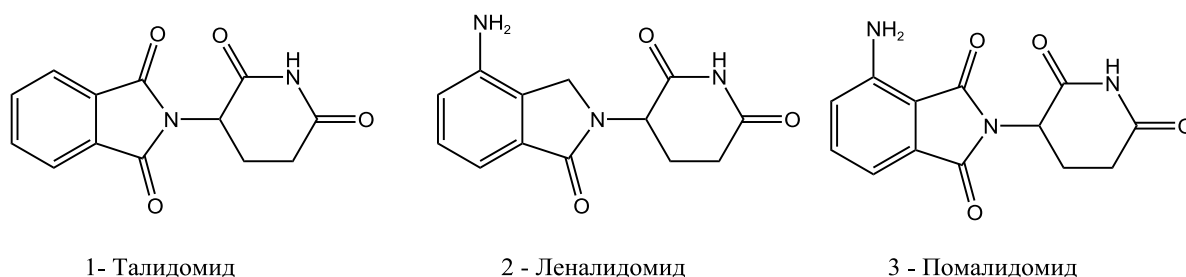


Рисунок 4 – Химические структуры лигандов цереблона

Открытие кристаллической структуры CRL4 и механизма связывания лекарственного средства прояснило, почему активность зависит от энантиомера талидомида. Талидомид обладает одним хиральным центром на атоме углерода C3 глутаримидного кольца. Считалось, что два оптических изомера, (R)- и (S)- энантиомеры талидомида вызывающие различную активность, приводящую к седативному и тератогенному эффекту. В 2018 году было проведено исследование, где были выяснены молекулярные различия между двумя изомерами [20]. Биохимический анализ показал, что (S)- энантиомер проявляет значительно более сильное сродство связывания с CRBN по сравнению с (R)- энантиомером. Следовательно, (S)-энантиомер действовал как более мощный ингибитор аутоубиквитинирования CRBN и рекрутирования IKZF1 в CRBN. Дальнейший структурный анализ показал, что, хотя (S)-энантиомер связывается с CRBN в «расслабленной»



конформации, (R)-энантиомер требует скрученной конформации для связывания CRBN, что приводит к явным различиям в эффективности связывания.

Связывание IMiD с CRBN изменяет сайт связывания субстрата комплекса, тем самым изменяя его целевую селективность. Это механистическое понимание было подчеркнуто в исследованиях Фишера и его коллег [14], которые продемонстрировали, что при нормальной функции комплекс CRL4 нацелен на деградацию транскрипционного фактора MEIS2. MEIS2 является эндогенным субстратом комплекса, и его стабильность имеет решающее значение для правильного развития.

Однако, когда IMiD связываются с CRBN, они вызывают сдвиг субстратной специфичности комплекса CRL4. Вместо того, чтобы нацеливаться на MEIS2, комплекс перенаправляет свою активность на убиквитилирование и последующую деградацию двух ключевых транскрипционных факторов семейства Ikaros, IKZF1 и IKZF3. Эти факторы транскрипции необходимы для дифференцировки В- и Т-клеток, что подчеркивает критическую роль IMiD во влиянии на иммунную функцию [21].

Следует отметить, что производные талидомида также применяются для терапии множественной миеломы. Исходные гипотезы предполагали, что талидомид и его аналоги взаимодействуют с множеством целевых белков, способствуя разнообразным плеiotропным эффектам, как это отражено на рисунке 5 в старой модели (a). Однако современные исследования указывают на то, что основной или единственной молекулярной мишенью талидомида и его производных является белок CRBN [22]. Связывание с CRBN активирует комплекс убиквитинлигазы CRL4, что приводит к убиквитин-зависимому распаду различных неосубстратов, как показано на текущей модели (b) рисунок 5.

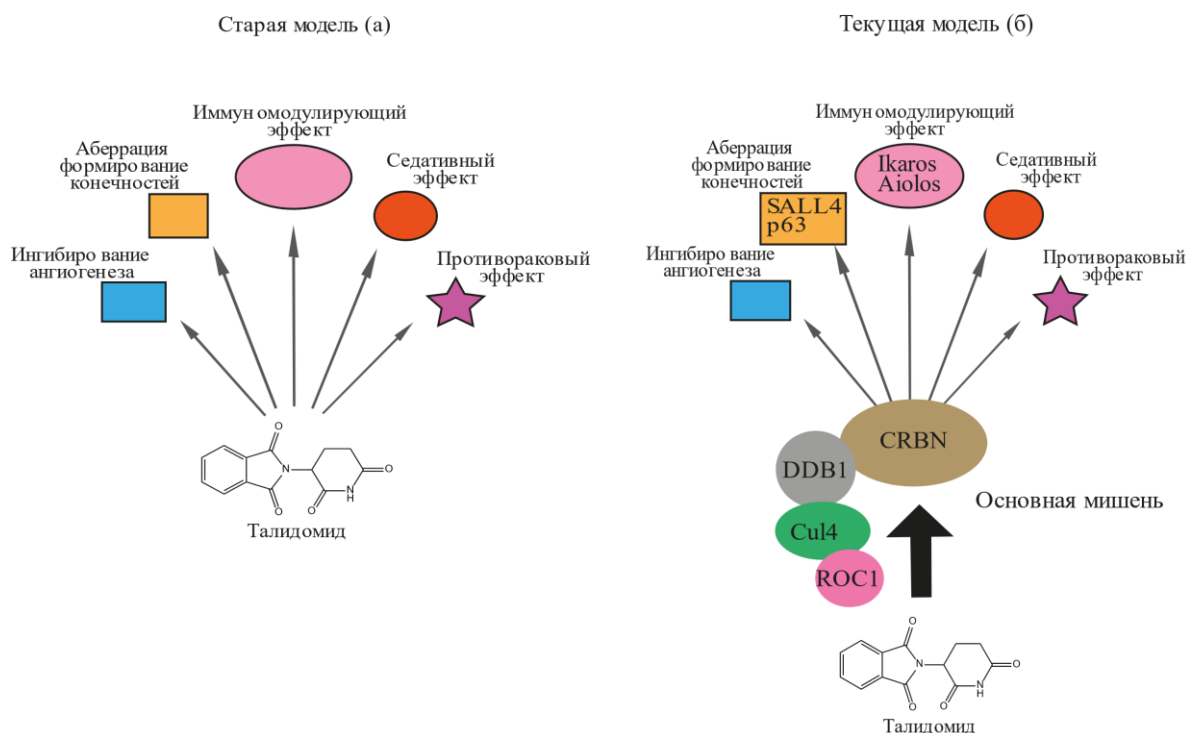


Рисунок 5 - Связывание талидомида с различными мишенями

Мутации в гене CRBN связаны с аутосомно-рецессивной несиндромальной умственной отсталостью, а экспрессия CRBN имеет решающее значение для антипролиферативного действия IMiD на клетки миеломы [23].

Талидомид связан с тератогенными последствиями, известными как талидомидная эмбриопатия. Это состояние характеризуется широким спектром врожденных дефектов, поражающих разнообразные ткани и органы, включая уши, глаза, лицо, конечности, половые органы, а также внутренние органы как сердце, почки и желудочно-кишечный тракт. Влияние талидомида на развитие плода зависит от времени его приема во время эмбрионального развития, при этом различные стадии внутриутробного роста чувствительны к его воздействию в разной степени [24].

Дальнейшее понимание механизма возникло, когда группа ученых продемонстрировали, что леналидомид и помалидомид и другие препараты, модулирующие цереброн, не ингибируют, а вместо этого активируют

убиквитин-лигазу CRL4 в направлении специфических белков-мишеней, называемых неосубстратами [25,26]. Первыми неосубстратами, которые были идентифицированы, были Ikaros (IKZF1) и Aiolos (IKZF3), два фактора транскрипции C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zn-finger, которые регулируют дифференцировку гематопоэтических клеток [27].

В рамках последующих исследований была разработана новая серия терапевтических соединений, известных как CELMoDs. Они представляют собой группу терапевтических соединений, разработанных для модуляции активности цереблон E3-лигазы. Основная цель их создания заключается в расширении области терапевтического применения путем воздействия на новые молекулярные мишени и преодоления устойчивости в лечении различных заболеваний.

Большое количество соединений, связывающихся с CRBN, было синтезировано компанией Celgene, среди которых CC-885 проявляет антипролиферативную активность в отношении различных типов раковых клеточных линий, включая рак крови и рак печени [28]. Особенно высокая антипролиферативная активность CC-885 была обнаружена в отношении острого миелоидного лейкоза или клеточных линий, полученных из него (рисунок 4). Интересно, что классические CRBN-связывающие соединения, такие как талидомид, леналидомид или помалидомид, не обладают такой активностью.

Следующее соединение - CC-122 (рисунок 4) способствует деградации белков IKZF1 и IKZF3 и проявляет как антиопухолевые, так и иммуномодулирующие эффекты против лимфомы В-клеточного типа, таких как диффузная крупноклеточная лимфома [29]. Авадомид обладает более широким спектром действия по сравнению с леналидомидом, поскольку он эффективен как против активированных В-клеток (ABC) DLBCL, так и герминативного центра В-клеток (GCB) DLBCL [30]. Результаты клинической испытании фазы I удовлетворительные характеристики безопасности, а также выгодные фармакокинетические свойства при монотерапии авадомидом у

пациентов с неходжкинской лимфомой, множественной миеломой, а также включая рак мозга.

Другой препарат, связывающийся с CRBN - СС-220 (ибердомид; рисунок б), обладает более высокой аффинностью к CRBN и вызывает деградацию белков IKZF1 и IKZF3 более эффективно, чем леналидомид или помалидомид [31]. СС-220 изучается с целью лечения системной красной волчанки. В настоящее время исследователи занимаются выявлением специфических неосубстратов CRBN, на которые оказывают воздействие СС-122 или СС-220.

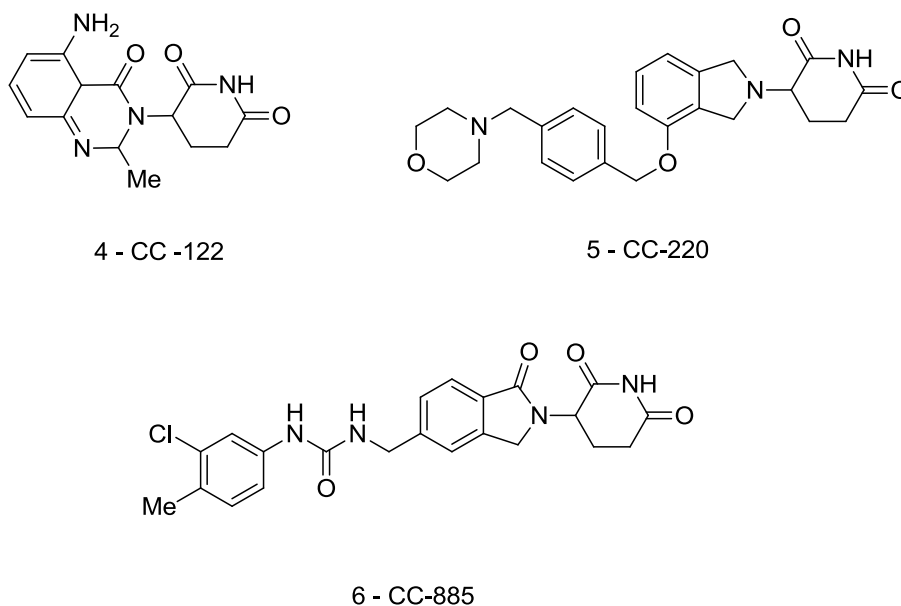


Рисунок 6 – Структурные формулы лигандов к CRBN

#### 1.4 PROTAC на основе CRBN

Система убиквитиновой протеасомы (UPS) представляет собой перспективную область медицинской химии для разработки лекарств. Несмотря на то, что существуют некоторые препараты, нацеленные на протеасому, в клинической разработке остается недостаточно много агентов,

нацеленных на ферменты этой системы. E3-Лигазы, являющиеся ключевыми компонентами UPS, сложно применять в качестве мишеней для лекарств из-за их многочисленности и сложности. Разработка эффективных методов скрининга и поиска ингибиторов лигаз-E3 представляет собой сложную задачу. Однако последние годы большой интерес выделяется к подходу, основанному на использовании PROTACs (протеолиз, нацеленный на химер). PROTACs позволяют перенаправлять убиквитинлигазы-E3 для избирательного убиквитинирования целевых белков, что приводит к их протеасомной деградации [32]. Этот подход открывает перспективы для разработки новых лекарственных средств.

PROTAC включает в себя три элемента: 1) агент, который связывается с целевым белком (POI); 2) агент, который связывается с убиквитин-лигазой E3; и 3) связывающий их линкер (рисунок 7) [33].

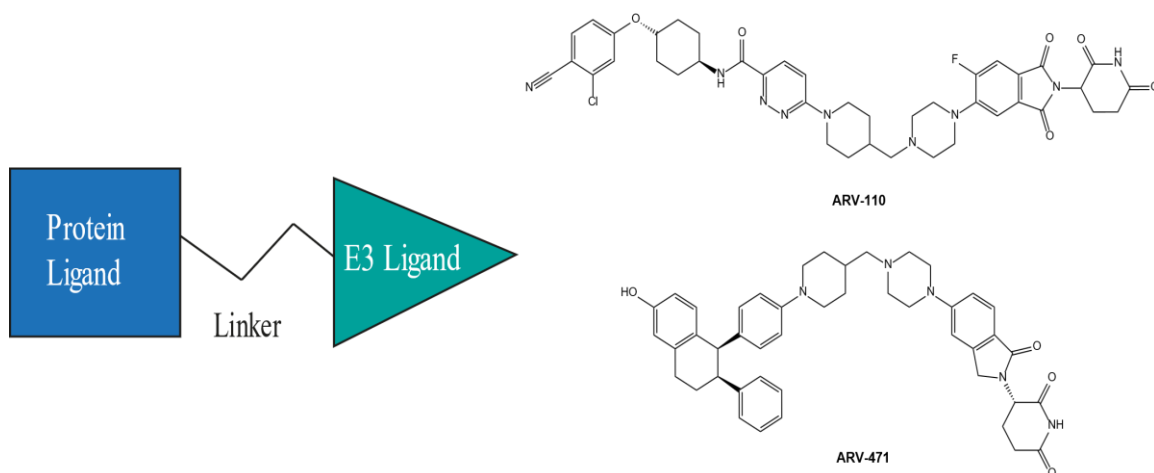


Рисунок 7 – Строение PROTAC

Роль PROTAC заключается в иницировании образования комплекса между целевым белком, убиквитин-лигазой E3 и самим PROTAC. Этот комплекс приводит к полиубиквитинированию целевого белка и его последующей деградации через убиквитин-протеасомную систему (UPS). Поскольку для PROTAC необходимо взаимодействие нескольких белков,

чтобы образовать функциональный комплекс, который эффективно разрушает целевые белки, это может привести к усилению активности, эффективности и селективности в деградации целевых белков. PROTAC сами по себе не разрушаются в процессе, а могут повторно использоваться для убиквитинирования и деградации других целевых белков (рисунок 8) [34].

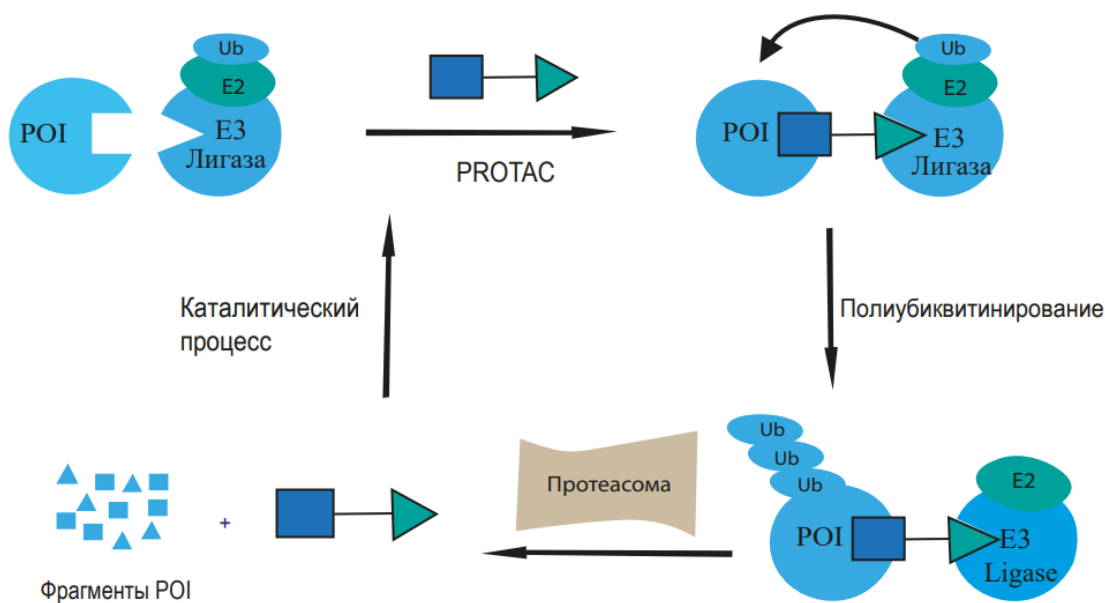


Рисунок 8 – Механизм действия PROTAC

В настоящее время PROTACs привлекают значительное внимание фармацевтических компаний и научных исследователей, их потенциал стал предметом активных исследований и дальнейшего развития. PROTACs имеют ряд преимуществ:

- специфичное воздействие PROTAC на целевые белки позволяет минимизировать побочные эффекты и повысить эффективность лечения;
- формирование тройных комплексов с участием убиквитинлигазы E3 способствует усилению процесса деградации целевых белков, что увеличивает терапевтический эффект;

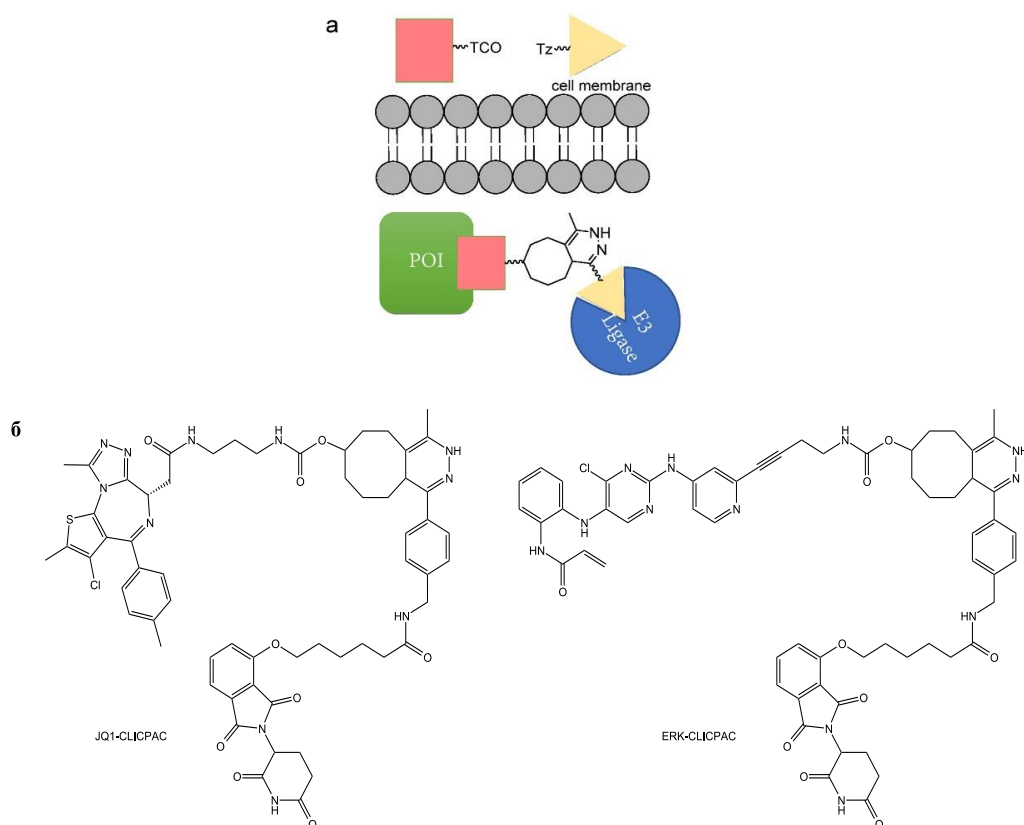
– PROTACs могут быть разработаны для работы с различными целевыми белками, что делает их перспективными инструментами в лечении различных заболеваний;

Однако несмотря на значительные преимущества и потенциал технологии PROTAC в контексте разработки фармацевтических препаратов, следует признать наличие ряда значимых ограничений требующих дальнейших исследований. Основными недостатками можно выделить:

- низкая растворимость и проницаемость;
- большая молекулярная масса, что может привести к плохим фармакокинетическим значениям;
- длина и состав линкера также может повлиять на стабильность PROTACs.

Лигазы E3, такие как CRBN, VHL, IAP и MDM2, играют ключевую роль в технологии PROTAC. Среди них особенно широко используются CRBN и VHL из-за их высокой эффективности и специфичности в связывании с целевыми белками. CRBN и VHL обеспечивают стабильную деградацию различных патологических белков, что делает их предпочтительными в разработке PROTAC.

Современные исследования в области разработки PROTAC сталкиваются с проблемами, связанными с их фармакокинетическими свойствами и ограниченной проницаемостью мембран, что часто обусловлено большой молекулярной массой этих соединений. Для решения этой проблемы был разработан новый класс PROTAC, известный как Click-formed PROTAC (CLIPAC). Технология CLIPAC основана на использовании клик-химии для внутриклеточной сборки PROTAC из двух низкомолекулярных компонентов. Этот инновационный подход не только улучшает фармакокинетические характеристики и мембранную проницаемость, но и открывает новые возможности для создания более эффективных терапевтических агентов на основе механизма направленной деградации белков (рисунок 9) [35].



А – схема механизма действия CLIPAC; Б - Структуры JQ1-CLIPAC и ERK-CLIPAC для деградации BRD4 и ERK1/2

### Рисунок 9 – Click-formed PROTAC

Этот подход включает использование двух молекулярных фрагментов: производное талидомида с тетразиновой меткой и лиганд целевого белка (POI), меченный транс-циклооктеном (TCO). Эти фрагменты, отличающиеся низким молекулярным массой и хорошей проницаемостью, предназначены для самосборки внутри клетки посредством клик-реакции, что приводит к формированию функциональной молекулы PROTAC (рисунок 9а). Высокая специфичность реакции обусловлена эффективностью клик-реакции и отсутствием перекрестной реактивности с другими молекулярными группами. С помощью этой технологии были успешно разработаны два типа CLIPAC для деградации белков BRD4 и ERK1/2 соответственно (рисунок 9б), что



демонстрирует потенциал данной стратегии для создания целевых PROTAC [36].

Кроме того, последнее время активно разрабатываются новые классы PROTAC, которые могут минимизировать побочные эффекты и токсичность. Одним из таких инновационных подходов является использование фотохимически активируемых химер (PHOTACs), [37] также известных как photo-PROTAC или opto-PROTAC. Эти молекулы сочетают в себе свойства PROTAC с фоторасщепляемыми заместителями, такими как нитровератрилоксикарбонил, или с фотопереключаемыми заместителями, например азобензолом [38]. PHOTACs неактивны в темноте, но при облучении УФ или видимым светом фоторасщепляемые заместители удаляются, а фотопереключаемые заместители изменяют свою конфигурацию, активируя PROTAC и инициируя деградацию целевого белка (POI). Недавние исследования показали успешную деградацию различных мишеней, включая BRD4, FKBP12, IKZF1/3, ALK, BTK и другие [40,41].

Однако из-за того, что УФ-излучение способно вызывать повреждение ДНК и обладает ограниченной способностью проникать в глубокие слои человеческого тела, перспективным направлением станет разработка PHOTAC с использованием более безопасных проникающих волн большей длины.

В 2015 году Брэднер [42] и его коллеги разработали новые гетеробифункциональные соединения, состоящие из талидомида и ингибитора бромодоменсодержащего белка 4 (BRD4) JQ1.

Одновременно исследовательская группа продвинула синтез химерных соединений FK506-талидомид, которые способствовали деградации FKBP12, одного из белков, связывающихся с FK506. Вскоре после этих событий Крю и его коллеги сообщили о создании еще одного деградатора [43].

В последующие годы было синтезировано множество соединений PROTAC на основе CRBN. Заметные достижения включают деградацию таких белков, как BCR-ABL, SIRT2 и TAU, с помощью технологии PROTAC [44].

Детальный структурный анализ позволил определить трехмерные структуры CRBN-BRD4 в сочетании с производными dBET1 [45]. Эти исследования показали, что dBET23 одновременно связывается с бромодоменом 1 (BD1) BRD4 и талидомидсвязывающим доменом (TBD) CRBN, способствуя множественным гидрофобным и электростатическим взаимодействиям, которые стабилизируют тройной комплекс (рисунок 10).

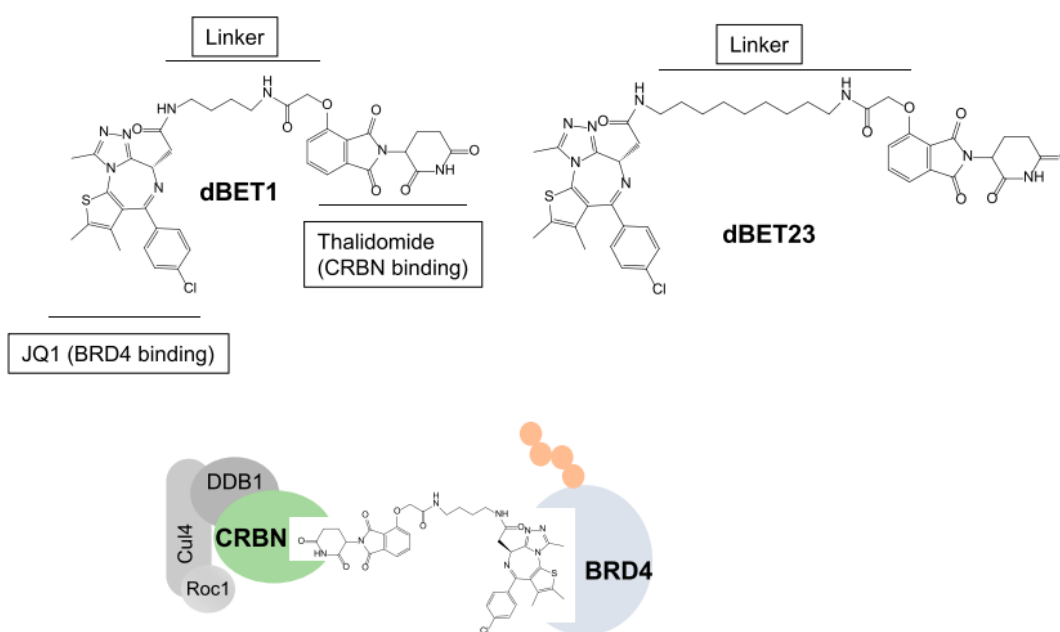


Рисунок 10 – Структуры PROTAC на основе CRBN

В то время как такие соединения, как dBET6, dBET70 и dBET55, вызывают образование тройных комплексов со схожими структурными конфигурациями, dBET57, который имеет более короткий линкер, приводит к образованию тройного комплекса, включающего значительные разные поверхностные остатки на границе раздела CRBN-BRD4. Эти данные позволили предположить, что взаимодействия между лигазами E3 и нео-субстратами могут быть гибкими и не требуют точного соответствия между двумя молекулами.

## 2 Результаты и обсуждения

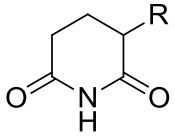
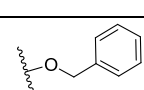
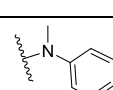
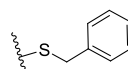
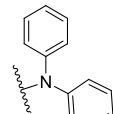
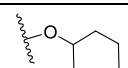
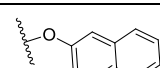
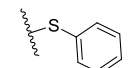
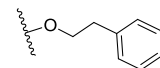
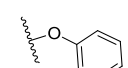
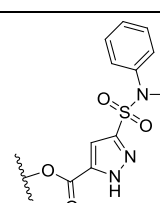
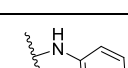
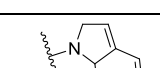
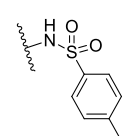
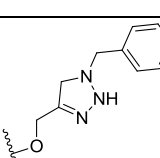
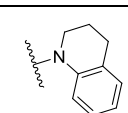
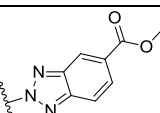
Липофильность – фундаментальный параметр в фармацевтической химии. Липофильность не только важна для определения термодинамической стабильности молекул в липидных средах, но и играет решающую роль в процессах абсорбции, распределения, метаболизма и выведения (ADMET), что напрямую влияет на эффективность и безопасность лекарственных средств. Эффективное проникновение через клеточные мембраны и достаточная растворимость – критические факторы для достижения желаемой фармакологической активности.

В ходе данного исследования были определены показатели липофильности для 16 соединений, рассматриваемых как потенциальные лиганды цереблona.

В качестве объектов исследования использовалась библиотека из 16 соединений. Эти соединения были синтезированы нашими коллегами из партнерской Лаборатории синтеза биологически активных малых молекул, кафедры медицинской химии института химии (СПбГУ).

Все исследуемые соединения являются ароматическими производными глутаридамида и имеющие общий скаффолд (3-метилпиперидин-2,6-дион) с различными заместителями в 3-положении глутаридамидного фрагмента. Структуры исследуемых веществ показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Структуры исследуемых веществ

			
Код соединения	R	Код соединения	R
874		887	
877		888	
880		891	
881		892	
882		893	
883		894	
885		895	
886		896	

Ранее было показано, что хроматографический метод можно применять для оценки липофильности. Этот метод основывается на определении времени удерживания как стандартных соединений, так и анализируемых образцов. Используя времена удерживания стандартных веществ с известными

показателями липофильности, было получено уравнение, связывающее фактор удерживания с  $\log P$ :

пере

$$\log P_{o/w} = 0.8879 \log(k_0) + 0.6099, \quad (7)$$

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

$\log k_0$  – логарифм фактора удерживания вещества.

Для исследуемых соединений были получены значения  $\log k_0$  при различных соотношениях метанол-вода, и построены графики зависимости  $\log k$  от доли метанола в подвижной фазе.

На рисунках 11 - 13 представлены примеры графиков для некоторых из производных глутаримида, а графики остальных соединений приведены в приложении А.

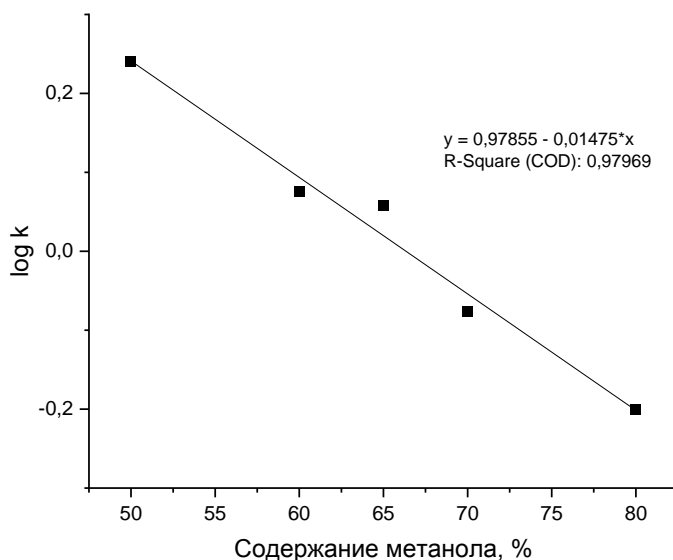


Рисунок 11 - Зависимость фактора удерживания 874 от содержания метанола в составе подвижной фазы.

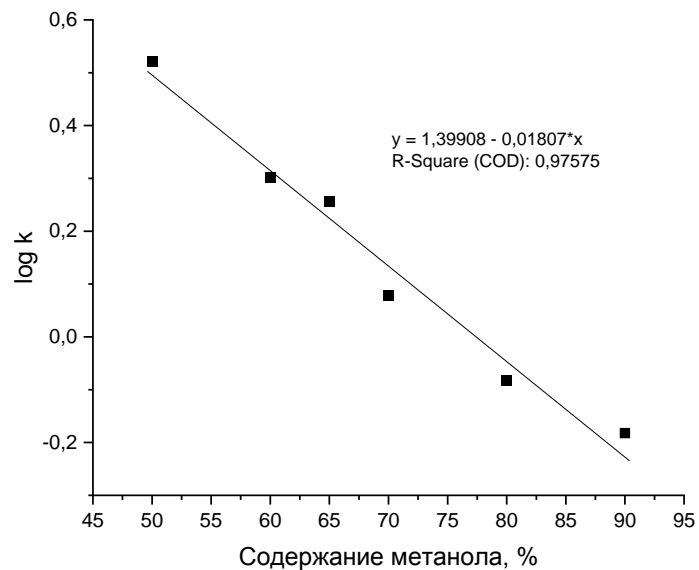


Рисунок 12 - Зависимость фактора удерживания 000877 от содержания метанола в составе подвижной фазы.

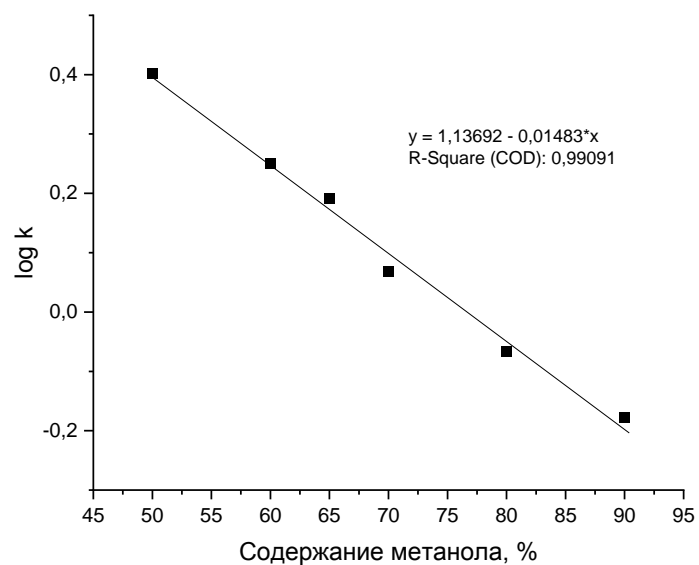


Рисунок 13 - Зависимость фактора удерживания 000880 от содержания метанола в составе подвижной фазы.

Используя уравнение 7, определили показатели липофильности для всех исследуемых соединений. Дополнительно значения  $\log P$  были рассчитаны с помощью алгоритма QikProp, встроенного в программное обеспечение Schrodinger Suite. Экспериментально определенные и предсказанные *in silico* значения логарифмов коэффициента распределения представлены в таблице 2 (физико-химические свойства, рассчитанные *in silico* представлены в приложении Б).

Таблица 2 – Полученные данные для исследуемых соединений

Код исследуемого соединения	$\log k_0$	$\log P_{o/w}$	QProp $P_{o/w}$ S izomer	QProp $P_{o/w}$ R izomer
874	0.98	1.48	1.48	1.47
877	1.40	1.85	2.10	1.99
880	1.14	1.62	1.12	1.12
881	0.95	1.45	1.85	1.85
882	0.70	1.23	1.61	1.61
883	0.47	1.03	1.13	1.13
885	0.44	1.00	0.55	0.64
886	1.65	2.07	2.10	2.10
887	1.17	1.65	1.67	1.68
888	2.58	2.90	2.94	3.07
891	2.02	2.40	2.39	2.39
892	1.47	1.92	1.77	1.77
893	1.10	1.59	0.70	0.69
894	0.89	1.40	2.10	2.10
895	0.30	0.87	1.58	1.54
896	1.17	1.65	0.88	0.88

Анализируя полученные значения липофильности в зависимости от строения соединения, было выявлено влияние на параметр  $\log P$  природы гетероатома, длины углеводородной цепи и размера заместителей при основном скафандре. На примере соединений 881-883, 874 и 877 (рисунок 14), видно, как закономерно увеличивается значение липофильности при переходе от группы  $-NH-$  к атомам кислорода и далее к сере.

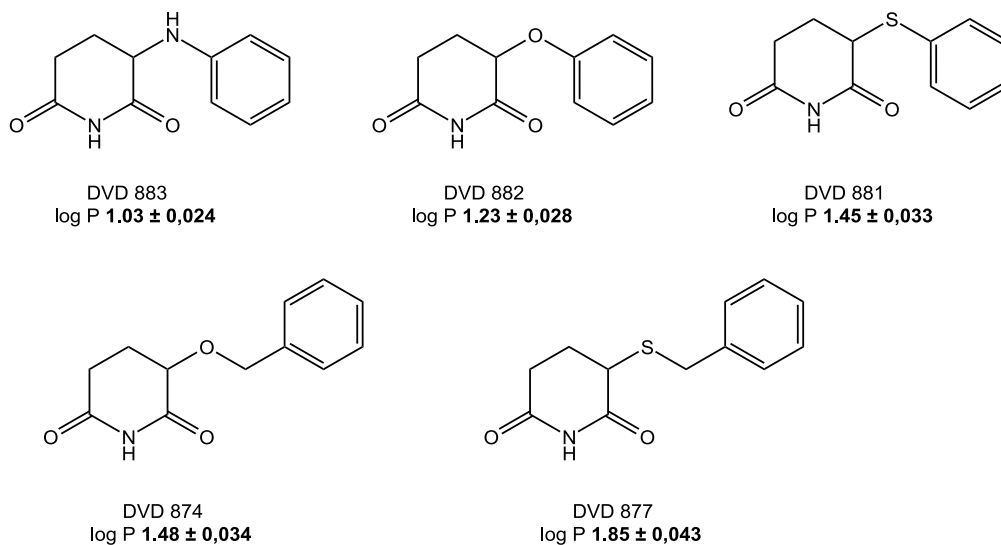


Рисунок 14 – Влияние природы гетероатома на липофильность исследованных соединений

На примере соединений 882, 874, 892, 881 и 877 прослеживается зависимость липофильности от длины углеводородной цепи. Липофильность закономерно увеличивается. В частности, для соединений 882, 874 и 892 липофильность находится в диапазоне значений от 1,23 до 1,92. В соединениях 881 и 877 значения липофильности составляет 1,45 и 1,85 (рисунок 15).



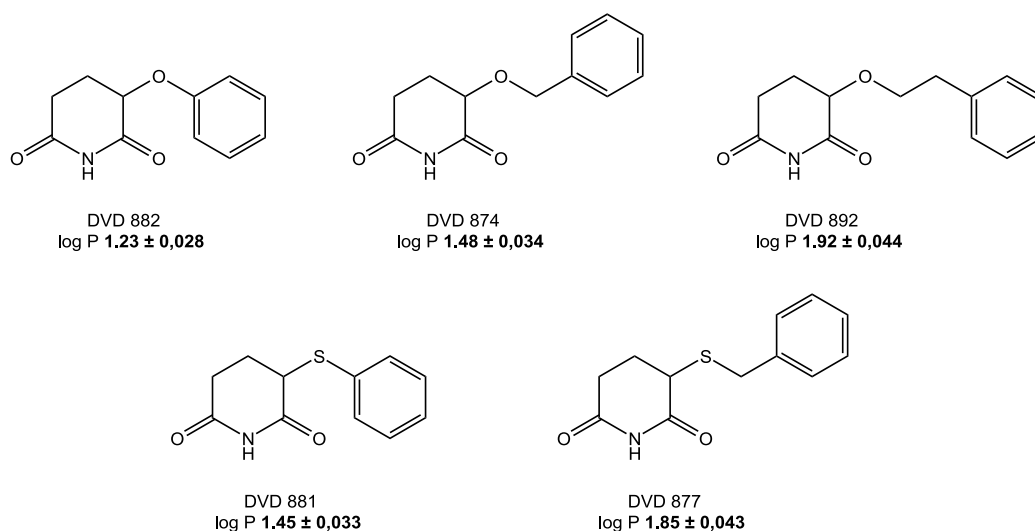


Рисунок 15 – Влияние длины углеводородной цепи на липофильность исследованных соединений

На примере соединений 882, 880 и 891 наблюдается влияние ароматической природы заместителей на изменение липофильности молекул. Значения коэффициента распределения logP для указанных соединений колеблются в диапазоне от 1,23 до 2,40 (рисунок 16).

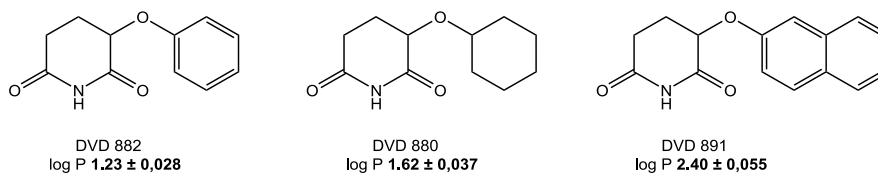


Рисунок 16 – Влияние размера и ароматичности заместителей на липофильность исследованных соединений

Как можно увидеть, в ряду 883-887-888 возрастание липофильности происходит при увеличении размера заместителя. При этом стоит отметить, что соединение 888 имеет самое большое значение липофильности вследствие наличия наибольших гидрофобных свойств, что выражается в присутствии в системе двух фенильных заместителей. Соединения 886 и 894, в которых аминогруппа входит в состав циклических систем, представляют собой

соединения с менее разветвленной структурой, липофильность которых уменьшается в соответствии с размером цикла (рисунок 17).

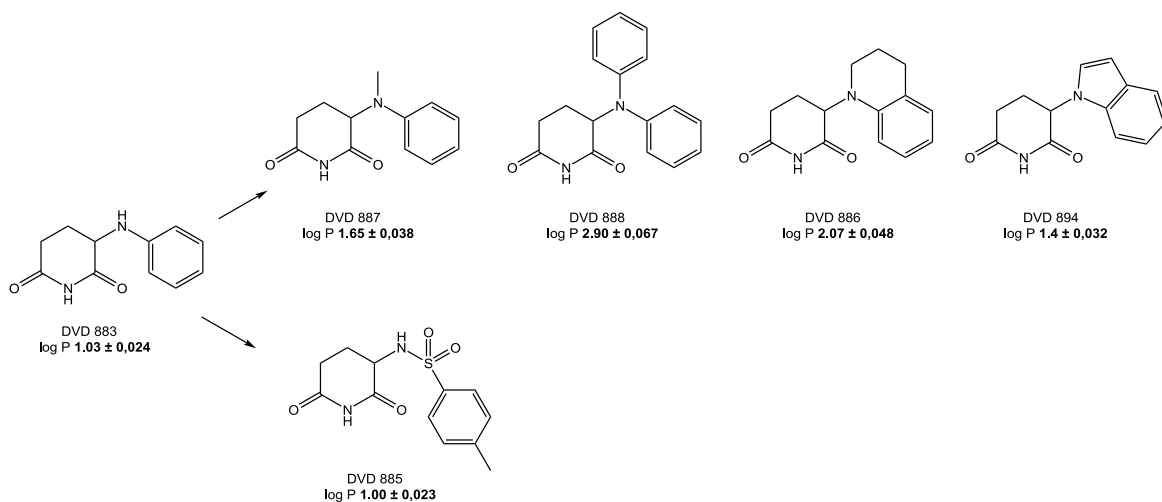


Рисунок 17 – Влияние размера и ароматичности заместителей на липофильность исследованных соединений

Также для всех соединений были рассчитаны параметры LE, LLE.

Лигандная эффективность (LE) – это параметр, который используется для оценки эффективности связывания лиганда с биологической мишенью с учётом молекулярной массы лиганда. Данный параметр помогает в оптимизации лигандов при разработке лекарственных препаратов, особенно важен для определения того, насколько эффективно молекула использует свою массу для связывания с белком-мишенью. LE рассчитывали по формуле 8.

$$LE = \Delta G/N, \quad (8)$$

где  $\Delta G$  - свободная энергия связывания, ккал/моль;

$N$  – количество неводородных атомов;

Липофильная эффективность (LEE) представляет собой метрику, которая оценивает соотношение между липофильностью — способностью

химических веществ или соединений растворяться в липидной среде — и их биологической активностью. Оптимизация LEE может привести к разработке лекарственных препаратов с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. LEE был рассчитан по формуле 9.

$$LEE = pIC_{50} - \log P, \quad (9)$$

где  $pIC_{50}$  — отрицательный десятичный логарифм концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ),  $\mu M$

Полученные значения, а также данные по  $IC_{50}$  и  $K_i$  приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты расчетов значений по LE, LEE, а также данные по  $IC_{50}$  и  $K_i$

Код соединения	LE ( $\frac{\text{kcal/mol}}{\text{heavy atom}}$ )	LEE	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$K_i$ ( $\mu M$ )
874	0.40	-3.15	$46.6 \pm 10.2$	$21.8 \pm 5.6$
877	0.41	-3.41	$36.2 \pm 9.1$	$16.2 \pm 4.9$
880	0.39	-3.66	$110.6 \pm 48.5$	$56.6 \pm 26.4$
881	0.46	-2.83	$24.2 \pm 2.9$	$9.7 \pm 1.6$
882	0.43	-2.23	$40.8 \pm 6.6$	$18.7 \pm 3.6$
883	0.44	-2.57	$34.3 \pm 11.0$	$15.1 \pm 6.0$
885	0.34	-2.60	$39.9 \pm 8.8$	$18.2 \pm 4.8$
886		-2.90	$6.8 \pm 0.7$	
887		-2.69	$10.7 \pm 1.5$	
888	0.36	-3.97	$11.7 \pm 1.1$	$2.9 \pm 0.6$
891	0.38	-3.59	$15.5 \pm 1.5$	$4.9 \pm 0.8$
892	0.38	-3.54	$41.4 \pm 21.8$	$19.0 \pm 11.9$
893	0.27	-2.73	$13.9 \pm 2.5$	$4.1 \pm 1.4$
894		-2.34	$8.7 \pm 0.8$	
895	0.30	-2.41	$34.7 \pm 10.5$	$15.4 \pm 5.7$
896	0.32	-2.98	$21.4 \pm 23.8$	$8.1 \pm 12.9$

Тепловая карта, представленная на рисунке 17, визуализирует параметры различных химических соединений, таких как  $IC_{50}$ ,  $K_i$ , LE, LLE и LogP. В данной карте красный цвет обозначает наилучшие значения параметров, желтый – умеренные, а зеленый – наихудшие. Соединения 888 и 891 выделяются как наиболее перспективные, демонстрируя отличные значения  $IC_{50}$ ,  $K_i$ , LE и LLE. Наоборот, соединения 895 и 885 показывают наихудшие результаты.

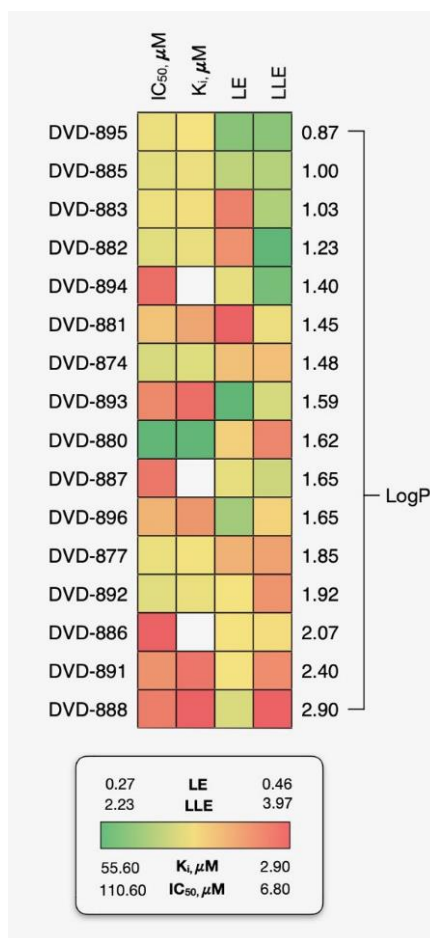


Рисунок 17 – Анализ взаимосвязи параметров LE, LLE,  $IC_{50}$ ,  $K_i$  и липофильности исследованных соединений (тепловая карта)

На представленном ниже графике изображена зависимость значения  $pIC_{50}$  от логарифма коэффициента распределения  $\log P$  для новых лигандов cereblona (рисунок 18). Ось ординат показывает значения  $pIC_{50}$ , характеризующие биологическую активность соединений, в то время как ось

абсцисс отражает значения  $\log P$ , описывающие липофильность соединений. Каждый кружок на графике представляет отдельное соединение с указанием его идентификатора.

Красные пунктирные линии на графике указывают уровни липофильной лигандной эффективности LLE, которые равны 2, 3 и 4 соответственно.

Соединения, расположенные выше красных пунктирных линий, демонстрируют более высокую лигандную эффективность, что является предпочтительным при разработке лекарственных средств.

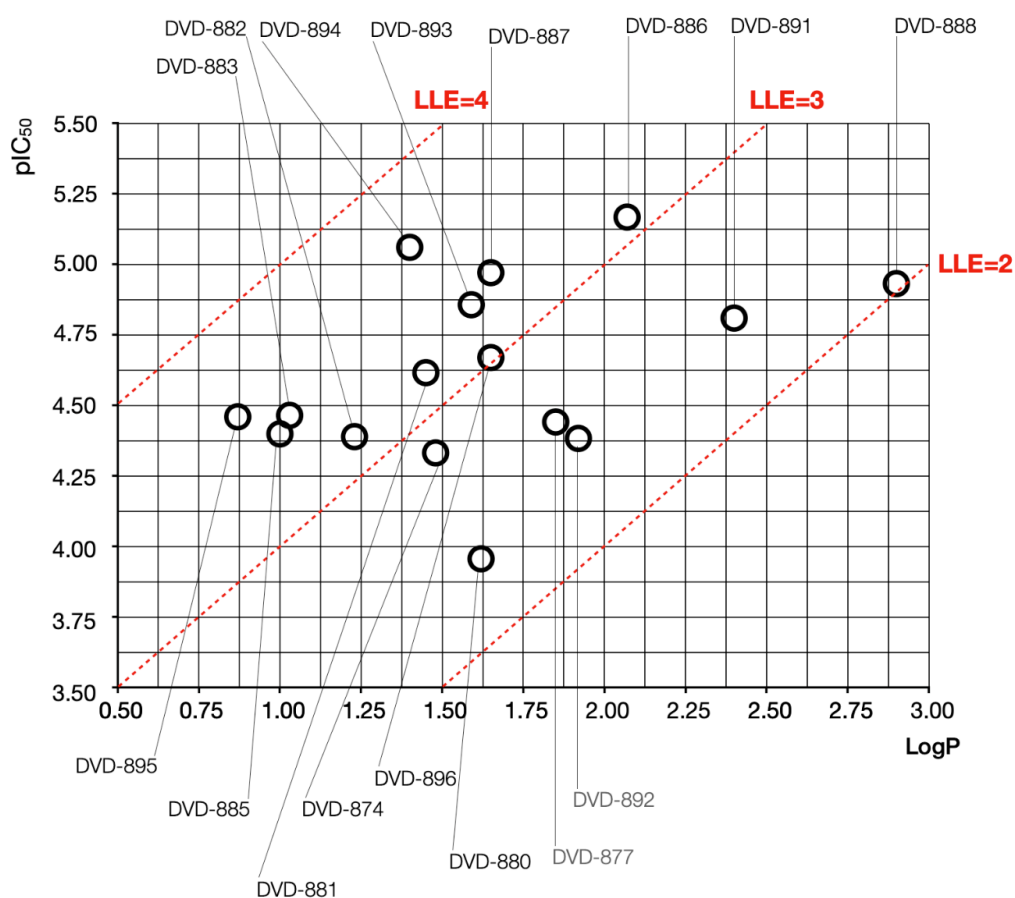


Рисунок 18 – График зависимости  $\log P$  от  $pIC_{50}$

В результате исследования с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии были определены значения липофильности для производных глутаримида. Анализ этих значений и других молекулярных параметров показал, что все изученные соединения практически полностью

соответствуют правилу Липински (таблицу 2). Соединение DVD-895 имеет наименьшую липофильность, в то время как DVD-888 — наивысшую. Эти данные свидетельствуют о том, что уровень липофильности зависит от объема ароматических и предельных циклов, а также от природы гетероатомов. Экспериментальные значения липофильности каждого из соединений были сравнены с теоретическими расчетами.

Сопоставление экспериментальных данных с расчетными подтверждает их общую согласованность, однако расчеты должны использоваться лишь для предварительной оценки липофильности, а окончательные выводы необходимо подтверждать экспериментальными данными.

В итоге, исследуемые соединения соответствуют критериям перорального введения согласно правилу Липински и рекомендованы для дальнейших исследований.

### **3 Экспериментальная часть**

#### **3.1 Реагенты и оборудование**

Реагенты использовались коммерчески доступные, без дополнительной очистки.

В экспериментах были использованы следующее оборудование и вспомогательные материалы:

- жидкостный хроматограф фирмы Agilent Technologies 1220 Infinity LC;
- колонка хроматографическая ZORBAX Eclipse Plus C18 (100x4.6 мм), с размером частиц 5 мкм;
- микрошприц Agilent объемом 50 мкл;
- метанол для ОФ ВЭЖХ, 99.9 %;
- ультразвуковая ванна «Сапфир»;
- вода дистиллированная;
- нитрит натрия, х. ч.

#### **3.2 Методика проведения эксперимента**

Исследования проводились на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220 Infinity LC с использованием хроматографической колонки Zorbax Eclipse Plus C18 размером 4,6 × 100 мм и частицами сорбента размером 5 мкм. В качестве подвижной фазы применялась смесь метанола и воды в различных пропорциях: 80 : 20, 70 : 30, 65 : 35, 60 : 40, 50 : 50 (об. %). Для расчета коэффициентов удерживания (k) объектов и соответствующих им logk использовался нитрит натрия в качестве несорбирующегося вещества.

Эксперименты проводили при комнатной температуре, при этом скорость потока элюента составляет 1 мл/мин. Детектирование проводили с использованием УФ-детектора при длине волны 252 нм.

### 3.3 Определение значения фактора удерживания

Фактор удерживания был рассчитан по формуле:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}, \quad (6)$$

где  $t_R$  – время удерживания исследуемых соединений, с;

$t_M$  – время удерживания несорбирующегося соединения ( $\text{NaNO}_2$ ), с.

Для каждого из анализируемых соединений были определены коэффициенты удерживания  $k$ , а также их логарифмические значения  $\log k$  для всех изучаемых соотношениях метанол-вода, результаты отображены в таблице 4.

Таблица 4 Рассчитанные величины логарифма от фактора удерживания для изучаемых соединений при различных соотношениях метанол-вода.

Код исследуемого соединения	logk				
	(80:20)	(70:30)	(65:35)	(60:40)	(50:50)
874	-0.200	-0.076	0.058	0.076	0.241
877	-0.083	0.079	0.257	0.302	0.521
880	-0.067	0.068	0.191	0.251	0.401
881	-0.137	-0.022	0.102	0.170	0.314
882	-0.171	-0.137	-0.040	0.003	0.107
883	-0.188	-0.145	-0.075	-0.048	0.036
885	-0.171	-0.196	-0.137	-0.109	-0.010
886	-0.071	0.084	0.228	0.285	0.592
887	-0.167	-0.061	0.036	0.070	0.302
888	0.024	0.272	0.496	0.578	1.003
891	-0.072	0.122	0.306	0.365	0.734
892	-0.114	0.027	0.168	0.205	0.501
893	-0.256	-0.254	-0.058	-0.025	0.265
894		-0.087	0.022	0.044	0.297
895	-0.044	0.004	0.024	0.048	0.089
896	-0.141	0.006	0.157	0.191	0.535



## Заключение

В ходе выполнения работы было проведено экспериментальное определение липофильности 16 новых лигандов цереблona, а именно производных глутаримида, с использованием метода обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ).

На примере производных глутаримида, отличающихся природой гетероатомов и заместителями при основном скаффолде, показано, что липофильность соединений закономерно растет при переходе от азота (3-(фениламино)пиперидин-2,6-дион, 883,  $\log P = 1.03$ ) через кислород (3-феноксипиперидин-2,6-дион, 882,  $\log P = 1.23$ ) к сере (3-(фенилсульфанил)пиперидин-2,6-дион, 881,  $\log P = 1.45$ ). Липофильность также увеличивается с ростом длины углеводородной цепи и с появлением в структуре объемных ароматических и предельных циклов. В среднем, появление одного метиленового звена при кислородном мостиковом атоме дает прирост липофильности на 0.23-0.25 единиц, при атоме серы – до 0.4 единиц.

Анализ взаимосвязи параметров LE, LLE, IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub> и липофильности соединений позволил выявить лидеров в исследованной серии. Наиболее оптимальное соотношение параметров показывают соединения 888 и 891, содержащие в своей структуре бифинильный и нафталиновый заместители.

Построение зависимости pIC<sub>50</sub> от logP позволило ранжировать изученные соединения по данным параметрам. Девять соединений лежат в области значений LLE от 3 до 4, при этом лидерами являются соединения 3-(1,2,3,4-тетрагидрохинолин-1-ил)пиперидин-2,6-дион (886), 3-[метил(фенил)амино] пиперидин-2,6-дион (887), 2,6-диоксипиперидин-3-ил 3-[метил(фенил)сульфамойл]-1H-пиразол-5-карбоксилат (893) и 3-(2,7а-дигидро-1H-индол-1-ил) пиперидин-2,6-дион (894), которые могут быть рекомендованы к дальнейшему исследованию.

## Список используемой литературы

1. Arnott J. A. The influence of lipophilicity in drug discovery and design / J. A. Arnott, S. L. Planey // Expert opinion on drug discovery. – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 863-875.
2. Landry M. L. Log D contributions of substituents commonly used in medicinal chemistry / M. L. Landry, J. J. Crawford // ACS medicinal chemistry letters. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 72-76.
3. Lipinski C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution // Drug Discov. Today Technol. – 2004. – Vol. 1. – №4. – P. 337- 341.
4. Zhou L. Development of a high throughput equilibrium solubility assay using miniaturized shake- flask method in early drug discovery / L. Zhou, L. Yang, S. Tilton et al. // Journal of pharmaceutical sciences. – 2007. – Vol. 96. – № 11. – P. 3052-3071.
5. Testa B. Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies. – John Wiley & Sons, 2001.
6. Kempieńska D. State of the art and prospects of methods for determination of lipophilicity of chemical compounds / D. Kempieńska, T. Chmiel, A. Kot-Wasik et al. //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – Vol. 113. – P. 54-73.
7. Vervoort R. J. M. et al. Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals / R. J. M. Vervoort, A. J. J. Debets, H. A. Claessens et al. // Journal of Chromatography A. – 2000. – Vol. 897. – № 1-2. – P. 1-22.
8. Lombardo F. ElogDoct: a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds / F. Lombardo, M. Y. Shalaeva, K. A. Tupper et al. // Journal of medicinal chemistry. – 2001. – Vol. 44. – № 5. – P. 2490-2497.
9. Liu X. Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Influence of 1-octanol in the mobile phase / X. Liu, H.

Tanaka, A. Yamauchi et al. // Journal of Chromatography A. – 2005. – Vol. 1091. – № 1-2. – P. 51-59.

10. Abbas N. S. Simple TLC–spectrodensitometric method for studying lipophilicity and quantitative analysis of hypoglycemic drugs in their binary mixture / N. S. Abbas, Y. A. Salim Mohamed, S. M. Derayea et al. // Biomedical Chromatography. – 2021. – Vol. 35. – № 11. – P. 5154-5274.

11. Giaginis C, Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. / C. Giaginis, A. Tsantili- Kakoulidou // Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. – 2007. – Vol. 31. – № 1. – P. 79-96.

12. Cozma A. Prediction of the lipophilicity of nine new synthesized selenazoly and three aroyl–hydrazinoselenazoles derivatives by reversed-phase high performance thin-layer chromatography / A. Cozma, V. Zaharia, A. Ignat et al. // Journal of chromatographic science. – 2012. – Vol. 50. – № 3. – P. 157-161.

13. Higgins J. J. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in kindred with mild mental retardation / J. J. Higgins, J. Pucilowska, R. Q. Lombardi et al. // Neurology. – 2004. – Vol. 63. – № 10. – P. 1927-1931.

14. Fischer E. S. Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide / E. S. Fischer, J. R. Lydeard, H. Yang et al. // Nature. – 2014. – Vol. 512. – № 7512. – P. 49-53.

15. Ito T. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito, H. Ando, T. Suzuki et al. // Science. - 2010. - Vol. 327, № 5971. - P. 1345-1350.

16. Chang X. Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma / X. Chang, Y. Zhu, Ch. Shi et al. // Acta Biochim Biophys Sin. – 2014. – Vol. 46. – № 3. – P. 240-253.

17. Singhal S. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma / S. Singhal, J. Mehta, R. Desikan et al. // New England Journal of Medicine. – 1999. – Vol. 341. – № 21. – P. 1565-1.

18. Walker S. L. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum / S. L. Walker, M. F. R. Waters, D. N. J. Lockwood et al. //Leprosy review. – 2007. – Vol. 78. – № 3. – P. 197-215.
19. Ito T. Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives / T. Ito, H. Handa //Proceedings of the Japan Academy, Series B. – 2020. – Vol. 96. – № 6. – P. 189-203.
20. Mori T. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon / T. Mori, T. Ito, S. Liu et al. //Scientific reports. – 2018. – Vol. 8, – № 1. – P. 1-14.
21. Krönke J. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells / J. Krönke, N. D. Udeshi, A. Narla et al. // Science. – 2014. – Vol. 343. – № 6168. – P. 301-305.
22. Asatsuma-Okumura T. Molecular mechanisms of cereblon-based drugs / T. Asatsuma-Okumura, T. Ito, H. Handa et al. // Pharmacology & therapeutics. – 2019. – Vol. 202. – P. 132-139.
23. Zhu Y. X. Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide / Y. X. Zhu, E. Braggio, Ch. Shi et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – Vol. 118. – № 18. – P. 4771-4779.
24. Gao S. Recent advances in the molecular mechanism of thalidomide teratogenicity / S. Gao, Sh. Wang, R. Fan et al. // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2020. – Vol. 127. – P. 1-6.
25. Gandhi A. K. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co- stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4 CRBN / A. K. Gandhi, J. Kang, C. G. Havens et al. //British journal of haematology. – 2014. – Vol. 164. – № 6. – P. 811-821.
26. Lu G. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins / G. Lu, R. E. Middleton, H. Sun et al. // Science. – 2014. – Vol. 343. – № 6168. – P. 305-309.

27. Fink E. C. Crbn I391V is sufficient to confer in vivo sensitivity to thalidomide and its derivatives in mice / E. C. Fink, M. McConkey, D. N. Adams et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2018. – Vol. 132. – № 14. – P. 1535-1544.

28. Matyskiela M. E. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4CRBN ubiquitin ligase / M. E. Matyskiela, G. Lu, T. Ito et al. // *Nature*. – 2016. – Vol. 535. – № 7611. – P. 252-257.

29. Rasco D. W. A first-in-human study of novel cereblon modulator avadomide (CC-122) in advanced malignancies / D. W. Rasco, K. P. Papadopoulos, M. Pourdehnad et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25. – № 1. – P. 90-98.

30. Hagner P. R. CC-122, a pleiotropic pathway modifier, mimics an interferon response and has antitumor activity in DLBCL / P. R. Hagner, N. Man, C. Fontanillo et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2015. – Vol. 126. – № 6. – P. 779-789.

31. Matyskiela M. E. A cereblon modulator (CC-220) with improved degradation of Ikaros and Aiolos / M. E. Matyskiela, W. Zhang, H. Man et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 61. – № 2. – P. 535-542.

32. Wang C. Developments of CRBN-based PROTACs as potential therapeutic agents / C. Wang, Y. Zhang, Y. Wu et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 225. – P. 1-36.

33. Wang C. The state of the art of PROTAC technologies for drug discovery / C. Wang, C. Zheng, H. Wang et al. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 235. – P. 1-8.

34. Paiva S. L. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design / S. L. Paiva // *Current opinion in chemical biology*. – 2019. – Vol. 50. – P. 111-119.

35. Zhao C. Novel design strategies to enhance the efficiency of proteolysis targeting chimeras / C. Zhao // *ACS Pharmacology & Translational Science*. – 2022. – Vol. 5. – № 9. – P. 710-723.

36. Lebraud H. Protein degradation by in-cell self-assembly of proteolysis targeting chimeras / H. Lebraud, D. J. Wright, Ch. N. Johnson et al. // ACS central science. – 2016. – Vol. 2. – № 12. – P. 927-934.
37. Liu J. Light-induced control of protein destruction by opto-PROTAC / J. Liu, H. Chen, L. Ma et al. // Science advances. – 2020. – Vol. 6. – № 8. – P. 5154-5347.
38. Pfaff P. Reversible spatiotemporal control of induced protein degradation by bistable PhotoPROTACs / P. Pfaff, K. T. G. Samarasinghe, C. M. Crews et al. // ACS Central Science. – 2019. – Vol. 5. – № 10. – P. 1682-1690.
39. Wang Z. PhotoPROTACs: a novel biotechnology for cancer treatment / Z. Wang, Y. Liu, X. Zhu et al. // Trends in Cell Biology. – 2020. – Vol. 30. – № 10. – P. 749-751.
40. Xue G. Light-induced protein degradation with photocaged PROTACs / G. Xue, K. Wang, D. Zhou et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2019. – Vol. 141. – № 46. – P. 18370-18374.
41. Winter G. E. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation / G. E. Winter, D. L. Buckley, J. Paulk et al. // Science. – 2015. – Vol. 348. – № 6241. – P. 1376-1381.
42. Lu J. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 / J. Lu, Y. Qian, M. Altieri et al. // Chemistry & biology. – 2015. – Vol. 22. – № 6. – P. 755-763.
43. Lai A. C. Modular PROTAC design for the degradation of oncogenic BCR- ABL / C. Ashton, M. Toure, D. Hellerschmied et al. // Angewandte Chemie International Edition. – 2016. – Vol. 55. – № 2. – P. 807-810.
44. Schiedel M. Chemically induced degradation of sirtuin 2 (Sirt2) by a proteolysis targeting chimera (PROTAC) based on sirtuin rearranging ligands (SirReals) / M. Schiedel, D. Herp, S. Hammelmann, S. Swyter et al. // Journal of medicinal chemistry. – 2018. – Vol. 61. – № 2. – P. 482-491.

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

## Приложение А

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

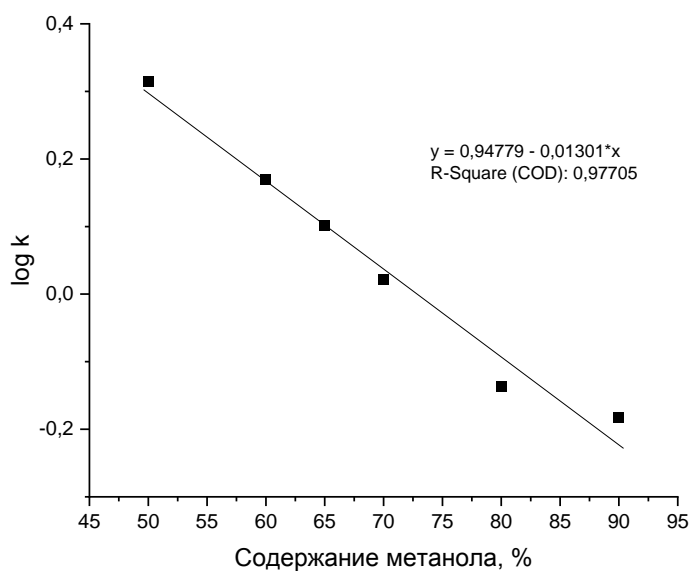


Рисунок А.1 – Зависимость фактора удерживания 881 от содержания метанола в составе подвижной фазы

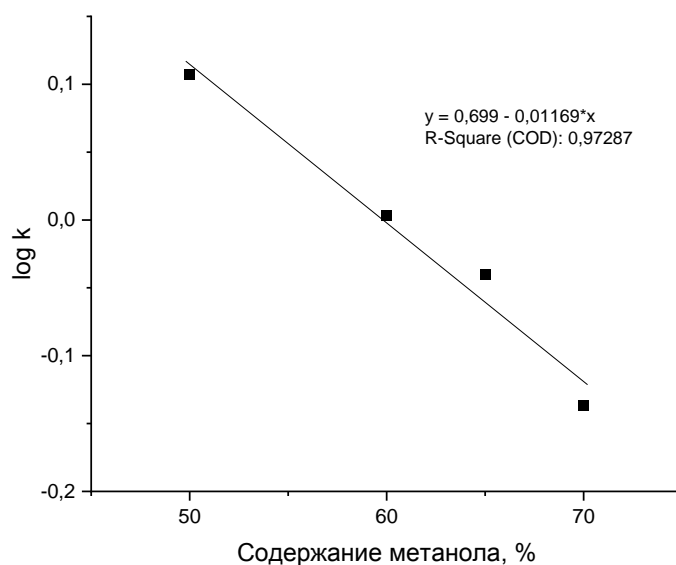


Рисунок А.2 – Зависимость фактора удерживания 882 от содержания метанола в составе подвижной фазы



## Продолжение Приложения А

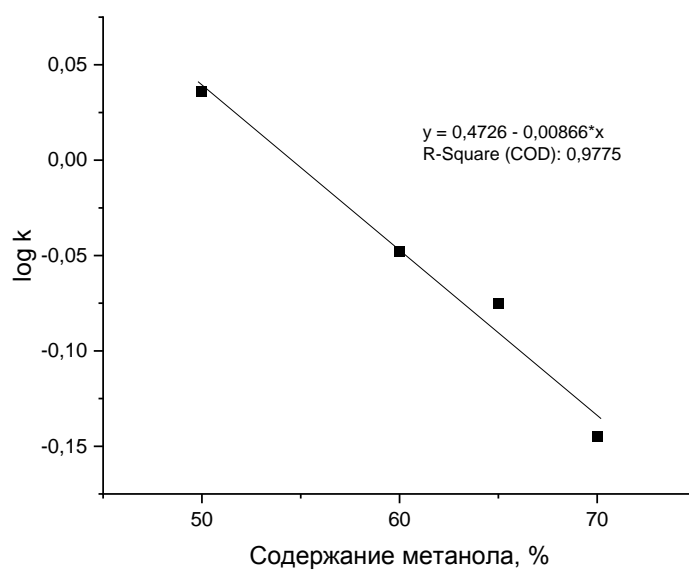


Рисунок А.3 – Зависимость фактора удерживания 883 от содержания метанола в составе подвижной фазы

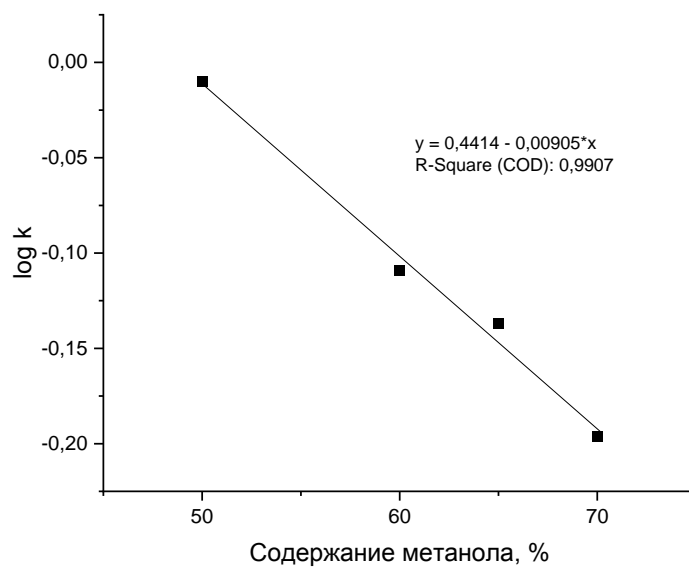


Рисунок А.4 – Зависимость фактора удерживания 885 от содержания метанола в составе подвижной фазы

## Продолжение Приложения А

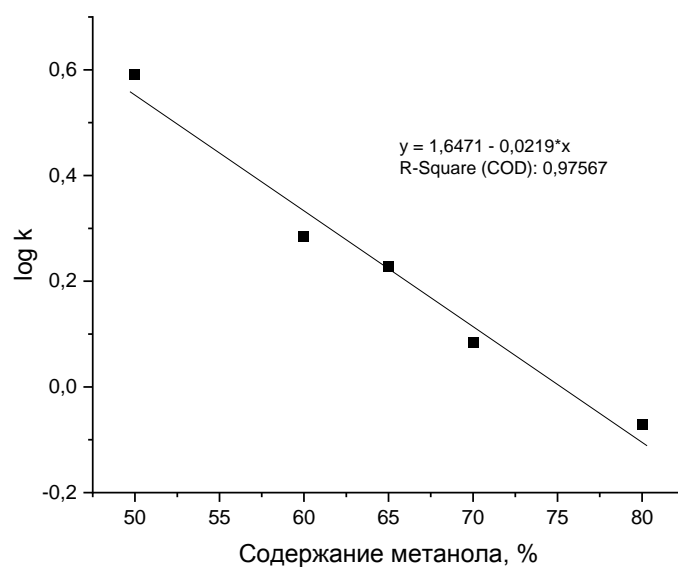


Рисунок А.5 – Зависимость фактора удерживания 886 от содержания метанола в составе подвижной фазы

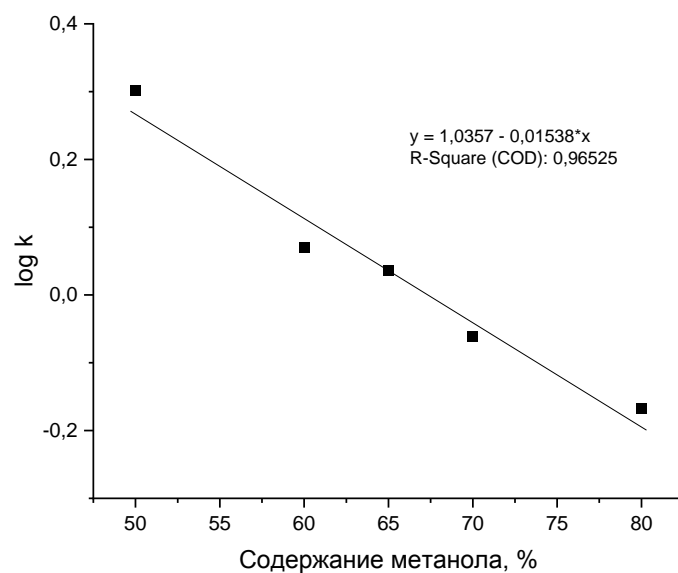


Рисунок А.6 – Зависимость фактора удерживания 887 от содержания метанола в составе подвижной фазы

## Продолжение Приложения А

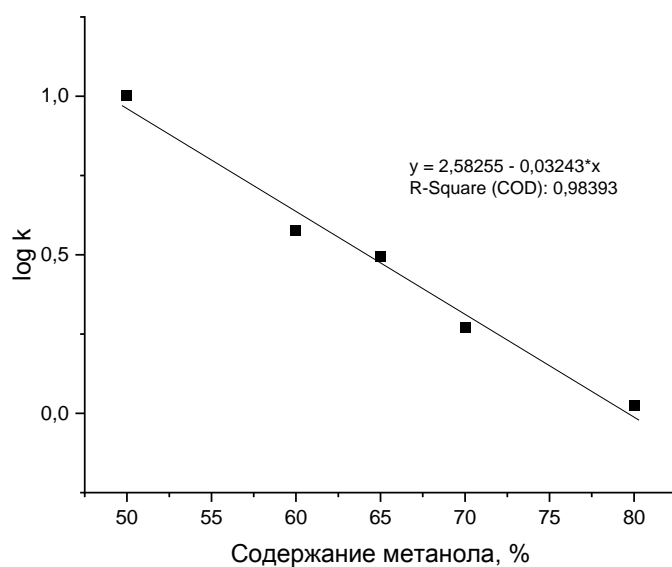


Рисунок А.7 – Зависимость фактора удерживания 888 от содержания метанола в составе подвижной фазы

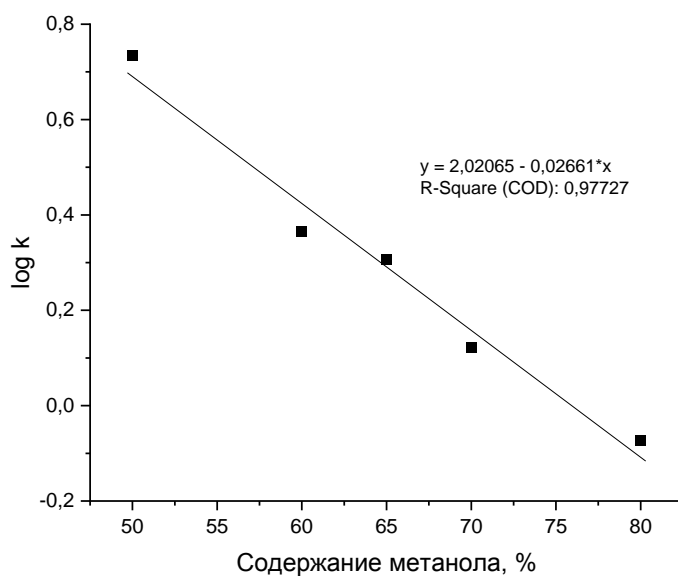


Рисунок А.8 – Зависимость фактора удерживания 891 от содержания метанола в составе подвижной фазы

## Продолжение Приложения А

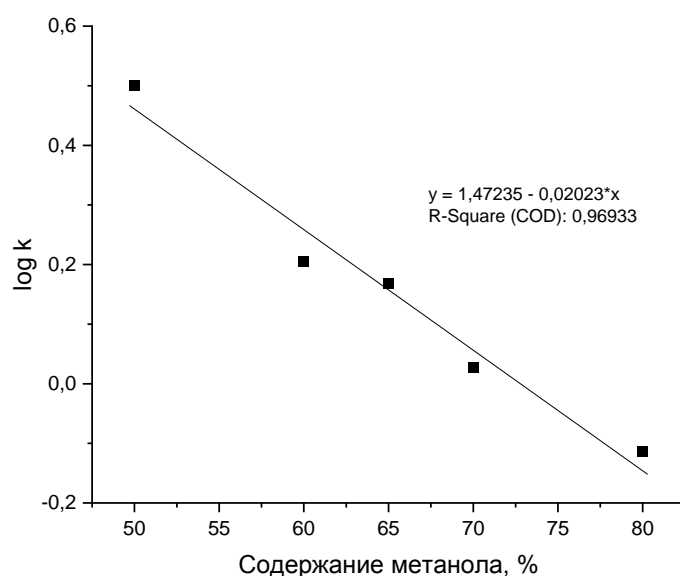


Рисунок А.9 – Зависимость фактора удерживания 892 от содержания метанола в составе подвижной фазы

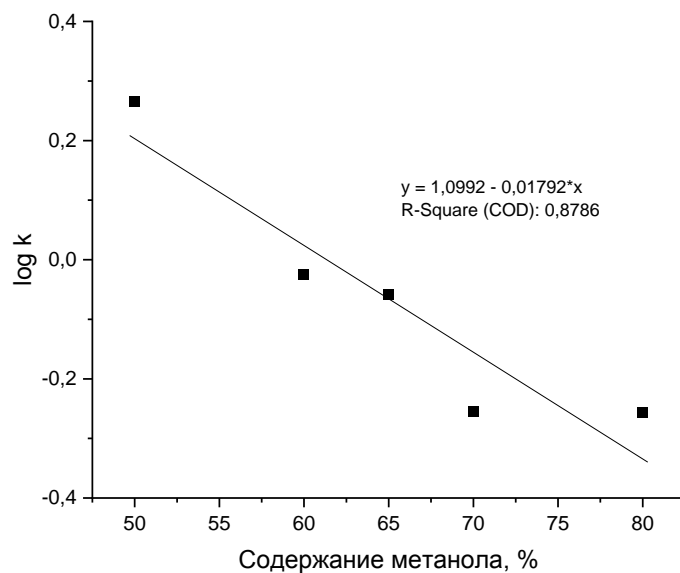


Рисунок А.10 – Зависимость фактора удерживания 893 от содержания метанола в составе подвижной фазы

## Продолжение Приложения А

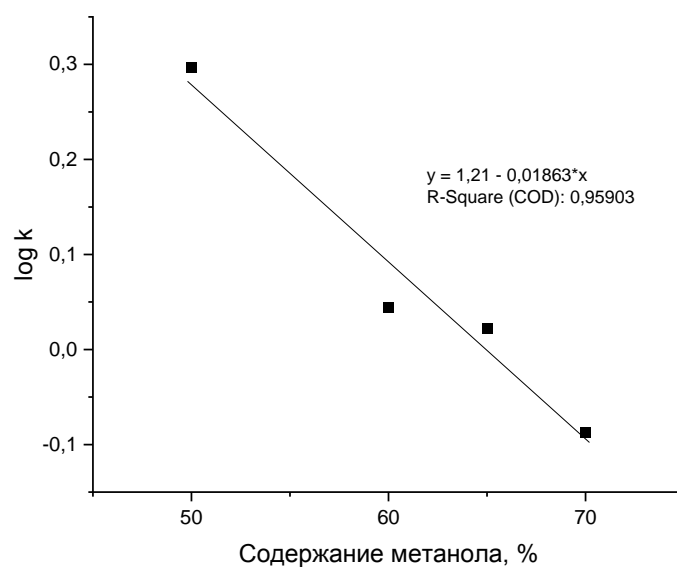


Рисунок А.11 – Зависимость фактора удерживания 894 от содержания метанола в составе подвижной фазы

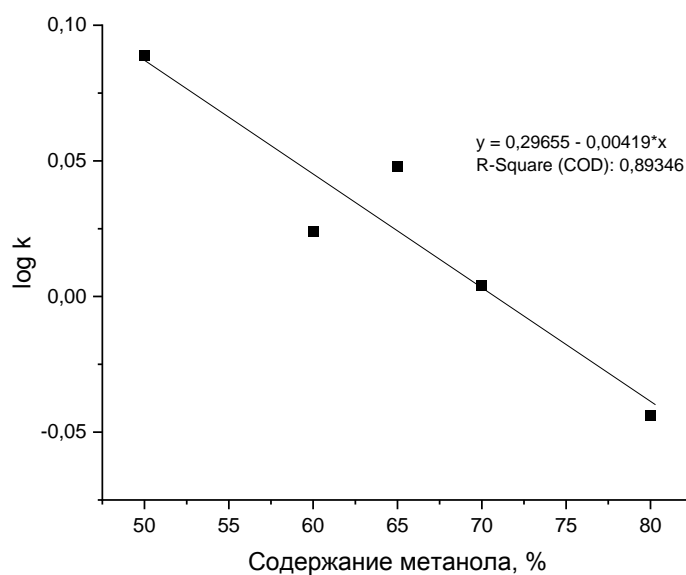


Рисунок А.12 – Зависимость фактора удерживания 895 от содержания метанола в составе подвижной фазы

## Продолжение Приложения А

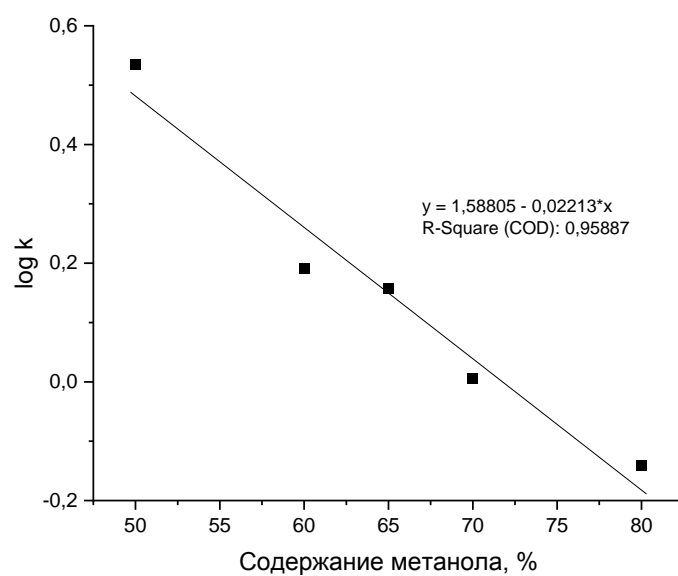


Рисунок А.13 – Зависимость фактора удерживания 896 от содержания метанола в составе подвижной фазы

## Приложение Б

### Физико-химические свойства, рассчитанные *in silico*

Таблица Б.1 – Физико-химические свойства, рассчитанные *in silico* (S изомеры)

Код соединения	SASA	FOSA	PISA	Volume	QPlogPo/w	QPlogS, моль/дм <sup>3</sup>	QPPCaco, нм/с	HumOralAbso rb	PercentHumOralA bsorb	PSA
874	448.120	135.670	199.118	744.122	1.475	-2.401	834.009	3	87.866	76.568
877	437.130	142.392	177.184	745.990	2.101	-2.624	1294.237	3	94.947	67.794
880	432.897	310.568	0.000	731.760	1.115	-2.264	685.259	3	84.232	79.072
881	422.225	104.698	188.864	701.460	1.851	-2.444	966.373	3	91.214	68.236
882	413.840	107.766	197.119	676.360	1.605	-2.301	917.643	3	89.370	76.266
883	414.881	92.738	192.292	682.462	1.131	-2.219	581.462	3	83.048	81.347
885	485.116	166.093	115.721	839.939	0.550	-2.448	121.495	3	67.476	120.114
886	458.940	205.455	148.337	799.452	2.095	-3.289	997.186	3	92.887	71.482
887	426.921	158.318	161.422	726.716	1.672	-2.410	953.887	3	90.060	70.506
888	480.863	58.378	317.862	870.041	2.938	-3.335	1008.704	3	100.000	69.382
891	483.485	107.810	266.764	815.254	2.390	-3.464	918.544	3	93.975	76.184
892	465.902	172.064	180.597	794.658	1.766	-2.541	835.674	3	89.584	75.957
893	638.743	160.259	202.924	1124.535	0.698	-3.619	24.267	2	55.821	175.814

Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

Код соединения	SASA	FOSA	PISA	Volume	QPlogPo/w	QPlogS, моль/дм <sup>3</sup>	QPPCaco, нм/с	HumOralAbsorb	PercentHumOralAbsorb	PSA
894	440.149		237.758	740.815	2.101	-3.903	833.772	3	91.530	72.375
895	572.243	186.128	225.878	976.932	1.576	-3.333	299.480	3	80.495	110.833
896	566.008	241.662	118.468	956.426	0.884	-3.613	110.548	3	68.697	137.713

SASA (англ. Solvent accessible surface area) – площадь поверхности соединения, доступная для растворителя, Å<sup>2</sup> ; FOSA -- гидрофобный компонент SASA, Å<sup>2</sup> ; PISA – полярный компонент SASA, Å<sup>2</sup> ; volume – полный объем соединения, доступный для растворителя, Å<sup>3</sup> ; QPlogPo/w – предсказанное значение коэффициента распределения в системе н-октанол/вода; QPlogS – предсказанное значение растворимости, моль/дм<sup>3</sup> ; QPPCaco – предсказанное значение кишечной проницаемости на модели клеток Caco-2, нм/с; HumOralAbsorb – количественная оценка перорального поглощения соединения, 1 – плохое, 2 – среднее, 3 – хорошее; PercentHumOralAbsorb – предсказанное значение перорального поглощения соединения, %.



Продолжение Приложения Б

Таблица Б.2 – Физико-химические свойства, рассчитанные in silico (R изомеры)

Код соединения	SASA	FOSA	PISA	Volume	QPlogPo/w	QPlogS, моль/дм <sup>3</sup>	QPPCaco, нм/с	HumOralAbs orb	PercentHumOra lAbsorb	PSA
874	445.690	135.400	196.768	742.850	1.465	-2.360	830.557	3	87.776	76.006
877	442.208	118.490	178.296	750.889	1.991	-2.680	722.135	3	89.768	70.772
880	436.218	313.889	0.000	732.521	1.117	-2.311	685.257	3	84.240	79.072
881	422.340	104.797	188.868	701.609	1.852	-2.444	966.439	3	91.217	68.236
882	413.840	107.766	197.119	676.360	1.605	-2.301	917.643	3	89.370	76.266
883	414.881	92.738	192.292	682.462	1.131	-2.219	581.462	3	83.048	81.347
885	485.215	180.514	117.728	839.299	0.642	-2.442	167.047	3	70.491	119.499
886	458.945	205.463	148.344	800.067	2.100	-3.289	997.422	3	92.913	71.486
887	427.929	158.474	162.384	727.494	1.677	-2.424	956.197	3	90.114	70.503
888	493.818	66.997	325.815	885.929	3.067	-3.561	1091.598	3	100.000	69.680
891	483.485	107.810	266.764	815.254	2.390	-3.464	918.543	3	93.975	76.184
892	465.900	172.062	180.603	794.656	1.766	-2.541	835.787	3	89.586	75.960
893	638.595	160.189	202.178	1124.472	0.692	-3.617	23.917	2	55.674	175.992
894	440.149	89.046	237.758	740.815	2.101	-3.903	833.771	3	91.530	72.375
895	574.477	186.933	221.198	978.316	1.535	-3.371	262.090	3	79.219	111.147
896	566.008	241.662	118.468	956.426	0.884	-3.613	110.548	3	68.697	137.713