

*На правах рукописи*



ГРИГОРЬЕВА  
Татьяна Алексеевна

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕМБРАНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ  
ИНГИБИТОРОВ БЕЛОК-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ MDM2-P53

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Черноголовка – 2016

Работа выполнена в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (техническом университете).

Научный руководитель:

**Гарабаджиу Александр Васильевич**

доктор химических наук, профессор, проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Научный консультант:

**Трибулович Вячеслав Генрихович**

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной фармакологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Официальные оппоненты:

**Лужков Виктор Борисович**

доктор химических наук, главный научный сотрудник ФГБУН Институт проблем химической физики РАН

**Абзианидзе Виктория Вадимовна**

кандидат химических наук, старший научный сотрудник ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН

Защита состоится «14» февраля 2017 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 002.102.01 при ИФАВ РАН по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИФАВ РАН и на сайте ИФАВ РАН: [www.ipas.ac.ru](http://www.ipas.ac.ru).

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



к.х.н. С.В. Афанасьева

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** По данным 2015 года, у 35-50% больных со злокачественными опухолями развиваются метастазы в головном мозге (МГМ), причем в лучшем случае треть из них имеют симптомы, позволяющие осуществить своевременную диагностику. Рост числа выявленных метастатических поражений обусловлен как успехами онкотерапии, способствующей увеличению продолжительности жизни больных, так и усовершенствованием методов диагностики первичных и метастатических опухолей.

Основным препятствием для лекарственного лечения МГМ является наличие гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который контролирует попадание в мозг различных ксенобиотиков, в частности, лекарственных препаратов. Малые, неполярные, гидрофобные молекулы, в том числе многие потенциальные лекарства, преодолевают барьер в основном по механизму пассивной диффузии сквозь мембраны эндотелиоцитов ГЭБ.

В лечении некоторых МГМ (рака легкого, почек, меланомы) нашли применение отдельные ингибиторы киназ и моноклональные антитела; используется и темозоломид, известный своими побочными действиями. Однако эффективность современных препаратов, направленных на борьбу с метастазами, оставляет желать лучшего.

Схема лекарственного лечения МГМ определяется структурой и свойствами первичной опухоли, а также схемой противоопухолевой лекарственной терапии, проведенной до выявления метастазов. Химиотерапия МГМ имеет смысл, только если первичная опухоль не проявляет резистентности к конкретному препарату, но даже в этом случае лечение может быть неэффективным, если действующее вещество не способно преодолевать ГЭБ.

За последние годы создание реактиваторов проапоптотического белка p53 стало одним из ключевых направлений в разработке таргетных противораковых препаратов. Известно, что развитие онкологических заболеваний обусловлено, в частности, подавлением активности этого белка за счет связывания с E3-лигазой MDM2.

Таким образом, при создании препаратов для лечения МГМ представляется актуальным подход, основанный на рациональной структурной оптимизации низкомолекулярных противораковых агентов, в том числе ингибиторов взаимодействия MDM2-p53, для повышения способности активных соединений преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ.

**Степень разработанности темы.** В настоящее время идет активное развитие противораковых агентов, механизм действия которых основан на реактивации проапоптотического белка p53 за счет ингибирования его взаимодействия с лигазой MDM2. Большой объем информации о функции и структуре этих белков позволяет осуществлять

рациональную разработку препаратов и на каждом этапе последовательно оптимизировать структуры соединений с учетом новых знаний. В качестве ингибиторов MDM2 заявлены представители различных классов – *цис*-имидазолины, изоиндолиноны, спирооксиндолы и др. Однако, несмотря на многолетнюю работу, ни один из них не дошел до клинического применения. На I стадии клинических испытаний находятся два ингибитора от Hoffmann-La Roche (III стадию испытаний против миелоидного лейкоза проходит идазанутлин), а также кандидаты от Novartis Pharmaceuticals и M.D. Anderson Cancer Center. При этом ни один из них не заявлен для борьбы с МГМ. С 2012 года разработкой низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия MDM2-p53 занимается НИЛ «Молекулярная фармакология», созданная на базе СПбГТИ(ТУ) под руководством Дженнаро Мелино в рамках реализации гранта №11.G34.31.0069 Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских ВУЗах.

**Цель диссертационного исследования:** создание мембранотропных реактиваторов белка p53 на основе исследования белок-белкового взаимодействия MDM2-p53.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

- идентификация структурных модификаций 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов, повышающих их способность преодолевать ГЭБ с сохранением оптимальных показателей ингибирования взаимодействия MDM2-p53 для последующей оптимизации производного 3-иминоиндолинона;

- разработка и осуществление направленного синтеза новых производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона;

- разработка метода количественного определения способности индолинонов и изоиндолинонов преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ; *in silico* и *in vitro* изучение влияния модифицирующих заместителей на мембранотропность производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона;

- разработка метода количественного определения способности индолинонов и изоиндолинонов индуцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток; *in silico* и *in vitro* изучение влияния модифицирующих заместителей на целевую активность производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона;

- модификация соединений ряда 3-иминоиндолинона с использованием выявленных мембранотропных структурных модификаций, изучение мембранотропности и целевой активности вновь созданных соединений.

**Объекты исследования:** производные 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона и 3-иминоиндолинона, а также фосфолипидные мембраны, используемые для определения мембранотропности соединений.

**Научная новизна.** Разработан метод сравнительного анализа способности низкомолекулярных соединений преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ, основанный на использовании искусственных липидных мембран. Разработана методика высокоинформативного скрининга производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона.

Впервые синтезирован ряд новых производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона. Изучено влияние мембранотропных заместителей на способность вновь синтезированных соединений преодолевать ГЭБ и индуцировать апоптоз раковых клеток. Моделирование методом молекулярного докинга позволило объяснить участие мембранотропных заместителей во взаимодействии 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов с р53-связывающей полостью белка MDM2. На основании полученных данных предложены способы оптимизации новых ингибиторов взаимодействия MDM2-р53 – производных 3-иминоиндолинона.

Установлено, что простые эфиры 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона неустойчивы в кислой среде. Показано, что, в отличие от энантиомеров 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов, диастереомеры их сложных эфиров, получаемых при реакции с N-Вос-*L*-аминокислотами, могут быть выделены препаративно с использованием флэш-хроматографии на ахиральных носителях.

**Теоретическая и практическая значимость.** В ходе работы был синтезирован ряд производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона, которые обладают высокой способностью преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ и ингибировать взаимодействие белков MDM2-р53. Такие соединения являются более перспективными кандидатами в противораковые препараты для лечения метастатических или первичных опухолей мозга, чем исходный ряд 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов с заявленной в литературе противораковой активностью. Благодаря применению разработанного подхода оптимизирована структура представителя нового класса ингибиторов взаимодействия MDM2-р53 на основе замещенного 3-иминоиндолинона.

Предложенный в работе метод сравнительного анализа способности низкомолекулярных соединений преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ с использованием искусственных липидных мембран является универсальным и может быть использован для широкого круга объектов, обладающих достаточной растворимостью и детектируемых в УФ и видимом диапазоне, либо по флуоресценции. Он может быть использован при создании препаратов для лечения различных заболеваний, связанных с нарушениями деятельности головного мозга – как метастатических или первичных опухолей мозга, так и нейродегенеративных заболеваний. Представленный метод оценки способности веществ индуцировать р53-опосредованный апоптоз раковых клеток может быть использован для аналогичных исследований.

**Методы исследования.** В работе использованы *in silico* и *in vitro* методы: молекулярный докинг и QSAR для предсказания свойств веществ, метод на основе искусственных мембран для оценки мембранотропности соединений, клеточный скрининг для оценки способности веществ индуцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток с подтверждением по связыванию аннексина V и с использованием вестерн-блоттинга. Строение и чистоту полученных в работе соединений исследовали с использованием ЯМР и ВЭЖХ-МС, для очистки продуктов использовали флэш-хроматографию.

**Положения, выносимые на защиту:**

- способ оптимизации ингибиторов взаимодействия MDM2-p53, основанный на использовании мембранотропных заместителей, не снижающих целевую активность соединений;

- *in vitro* метод на основе искусственных липидных мембран для количественного определения способности индолинонов и изоиндолинонов преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ;

- *in vitro* метод на основе высокоинформативного скрининга для количественного определения способности индолинонов и изоиндолинонов провоцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток;

- метод синтеза новых производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона;

- применение мембранотропных заместителей, влияющих на способность производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона преодолевать мембраны ГЭБ и провоцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток;

- способ оптимизации производных 3-иминоиндолинона с использованием заместителей, идентифицированных в ходе оптимизации производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона; влияние модификации соединения на способность преодолевать мембраны ГЭБ и провоцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток.

**Апробация результатов исследования.** Основные положения диссертационной работы представлены на VI научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Неделя науки - 2016» (СПб, 2016), VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (СПб, 2016), Симпозиуме "Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств" (Москва, 2015, в рамках XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство»), XI конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения» (СПб, 2015, в рамках 1-ого Российского онкологического научно-образовательного форума с международным участием «Белые Ночи – 2015»), II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты

химической безопасности» (СПб, 2015), международном симпозиуме EuroQSAR-2014 (СПб, 2014), международной научной конференции «Science of the future» (СПб, 2014), VIII всероссийской конференции с международным участием молодых учёных по химии «Менделеев-2014» (СПб, 2014), VI Международной конференции молодых ученых «Органическая химия сегодня» InterCYS-2014 (СПб, 2014) и др.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 работ в журналах, рекомендуемых ВАК, а также материалы в сборниках тезисов конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, изложения полученных результатов и их обсуждения, описания материалов и методов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 152 страницах, содержит 10 таблиц и 44 рисунка. Список литературы включает 179 ссылок.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ (гранты №№ 11.G34.31.0069, 14.B37.21.0855), Совета по грантам Президента РФ (Стипендия Президента РФ 2013-2015 гг.), грантов РФФИ (мол\_а № 14-04-31684) и РНФ (№ 16-13-10358).*

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Выбор объектов исследования

В работе предложен подход к созданию мембранотропных реактиваторов белка p53. Подход основан на структурной модификации существующих ингибиторов взаимодействия белков p53 и MDM2.

Разработанную методологию использовали для оптимизации ряда низкомолекулярных соединений, обладающих способностью провоцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток путем ингибирования белок-белкового взаимодействия MDM2-p53 (рис. 1):

а) экспериментальный класс ингибиторов MDM2 на основе замещенного изоиндолинона был использован для отработки подхода в качестве опытного объекта исследований;

б) производное 3-иминоиндолинона модифицировали для подтверждения универсальности использованных методов оптимизации ингибиторов MDM2 и собственно разработки нового активного мембранотропного соединения.

Для выбора опытного класса мы провели сравнение представителей нескольких классов ингибиторов белок-белкового взаимодействия MDM2-p53, разработанных на сегодняшний день, по параметрам целевой активности, сложности синтеза и возможности химической оптимизации без нарушения характера взаимодействия с p53-связывающей полостью белка MDM2. Наиболее перспективным для оптимизации по критерию мембранотропности оказался класс 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов, который,

как и 3-аминоиндолинон, имеет свободную гидроксильную группу.

В работе рассматривали представителей нескольких рядов 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов, различающихся заместителями R1 и R2 (рис. 1, R3=H). С целью повышения мембранотропности свободную гидроксильную группу исследуемых соединений этерифицировали карбоновыми и аминокислотами, в том числе с каркасными заместителями.

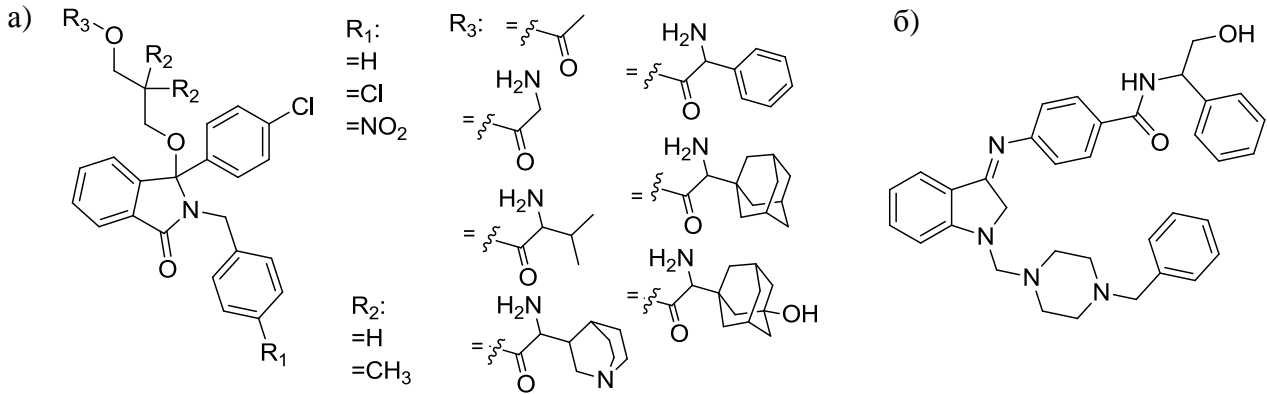


Рисунок 1 – Объекты исследования:

а) – производные 3-гидроксиизоиндолинона, б) производное 3-аминоиндолинона

## 2. *In silico* изучение влияния мембранотропных заместителей на целевую активность и способность веществ преодолевать ГЭБ

Для оценки физико-химических свойств полученных соединений использовали параметры, рассчитанные при помощи он-лайн сервиса ALOGPS 2.1:  $\log P$  – логарифм коэффициента распределения вещества в системе октанол-вода;  $\log S$  – логарифм величины растворимости вещества в воде. Полученные результаты (табл. 1) показали, что все предложенные модификации, за исключением глицина, способствуют повышению липофильности соединений, причем наилучшие результаты показывают производные валина, фенилглицина и адамантилглицина.

С другой стороны, повышение липофильности связано со снижением растворимости веществ. Для идентификации допустимых значений  $\log S$  мы рассчитали растворимость ряда ингибиторов MDM2, в том числе находящегося на стадии клинических испытаний RG7112, а также некоторых лекарственных препаратов.

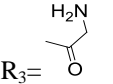
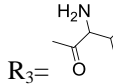
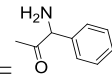
PASS (он-лайн сервис Way2Drug) использовали для оценки способности веществ попадать в ЦНС (BBB) и для оценки возможности взаимодействия соединений с гликопротеином-P (Pgp), поскольку известно, что многие вещества, способные преодолевать мембраны, связываются с этим транспортным белком и выводятся из клетки. Как оказалось, все рассмотренные вещества потенциально способны преодолевать ГЭБ ( $[P_a-P_i]_{BBB} > 0$ ), однако производные хинуклидина связываются с Pgp ( $[P_a-P_i]_{Pgp} > 0$ ).

Мы проверили, не оказывают ли предложенные модификации отрицательного



влияния на целевую активность ингибиторов. Взаимодействие белков MDM2-p53 хорошо изучено: гидрофобная полость N-концевого домена MDM2 связывает  $\alpha$ -спираль трансактивационного домена белка p53. На основе описанных в Protein Data Bank структур MDM2 мы провели молекулярный докинг (GOLD Suite v5.2.2, CCDC) низкомолекулярных соединений в гидрофобную полость белка. Поскольку в непосредственной близости от сайта взаимодействия находится высокоподвижный N-концевой фрагмент MDM2, то в работе рассматривали 3 модели белка, которые различаются положением этого фрагмента: 4HG7 (а.о. 17–125), 1Z1M (а.о. 1–118) и 2LZG (а.о. 1–125). Предложенные модификации не оказали отрицательного влияния на ингибиторную способность веществ (табл. 1), более того, сложные эфиры аминокислот показали более высокую способность связываться с p53-связывающей полостью MDM2, что нашло отражение в росте GoldScore (GS).

Таблица 1 – Значения характеристик некоторых представителей рассмотренных подклассов: липофильность, растворимость, взаимодействие с ГЭБ и гликопротеином-P, GS связывания с полостью MDM2. Общая структура соединений представлена на рис. 1.

| Параметр   | R <sub>3</sub> =H |                                 |                    | R <sub>3</sub> =C(O)CH <sub>3</sub> |                                 |                    | <br>R <sub>3</sub> = |                                 |                    | <br>R <sub>3</sub> = |                                 |                    | <br>R <sub>3</sub> = |                                 |                    |
|--|-------------------|---------------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------|---|---------------------------------|--------------------|---|---------------------------------|--------------------|---|---------------------------------|--------------------|
|  | R <sub>1</sub> =H | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>1</sub> =Cl | R <sub>1</sub> =H                   | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>1</sub> =Cl | R <sub>1</sub> =H   | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>1</sub> =Cl | R <sub>1</sub> =H   | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>1</sub> =Cl | R <sub>1</sub> =H   | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>1</sub> =Cl |
| R <sub>2</sub> =H                                |                   |                                 |                    |                                     |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |
| Взаимодействие с ГЭБ                             |                   |                                 |                    |                                     |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |
| logP   | 4,11              | 4,18                            | 4,66               | 5,04                                | 4,89                            | 5,59               | 3,57  | 3,70                            | 4,35               | 4,66  | 4,68                            | 5,32               | 5,15  | 4,93                            | 5,67               |
| logS   | -5,20             | -5,57                           | -5,73              | -6,08                               | -6,36                           | -6,51              | -5,58   | -5,90                           | -6,13              | -6,09   | -6,35                           | -6,50              | -6,51   | -6,66                           | -6,86              |
| [P <sub>a</sub> -P <sub>i</sub> ] <sub>BBB</sub> | >0                | >0                              | >0                 | >0                                  | >0                              | >0                 | >0  | >0                              | >0                 | >0  | >0                              | >0                 | >0  | >0                              | >0                 |
| [P <sub>a</sub> -P <sub>i</sub> ] <sub>Pgp</sub> | <0                | <0                              | <0                 | <0                                  | <0                              | <0                 | <0  | <0                              | <0                 | <0  | <0                              | <0                 | <0  | <0                              | <0                 |
| Взаимодействие с MDM2                            |                   |                                 |                    |                                     |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |
| GS <sub>4HG7</sub>                               | 54,2              | 54,4                            | 54,5               | 59,5                                | 62,3                            | 60,6               | 66,0  | 67,3                            | 62,4               | 65,8  | 71,6                            | 70,0               | 71,8  | 74,5                            | 72,5               |
| GS <sub>1Z1M</sub>                               | 52,2              | 59,1                            | 54,7               | 59,0                                | 66,4                            | 61,1               | 59,9  | 67,0                            | 62,2               | 64,0  | 69,6                            | 65,7               | 63,2  | 72,5                            | 67,3               |
| GS <sub>2LZG</sub>                               | 55,5              | 59,6                            | 56,1               | 65,6                                | 65,3                            | 69,1               | 66,6  | 69,7                            | 76,1               | 73,1  | 72,0                            | 64,3               | 71,5  | 74,5                            | 70,4               |
| R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub>                  |                   |                                 |                    |                                     |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |
| Взаимодействие с ГЭБ                             |                   |                                 |                    |                                     |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |
| logP   | 4,77              | 4,85                            | 5,20               | 5,67                                | 5,50                            | 6,13               | 4,31  | 4,34                            | 5,18               | 5,45  | 5,25                            | 5,95               | 5,73  | 5,48                            | 6,39               |
| logS   | -5,57             | -6,07                           | -6,13              | -6,41                               | -6,79                           | -6,87              | -6,15   | -6,41                           | -6,60              | -6,63   | -6,67                           | -6,84              | -6,79   | -6,91                           | -7,09              |
| [P <sub>a</sub> -P <sub>i</sub> ] <sub>BBB</sub> | >0                | >0                              | >0                 | >0                                  | >0                              | >0                 | >0  | >0                              | >0                 | >0  | >0                              | >0                 | >0  | >0                              | >0                 |
| [P <sub>a</sub> -P <sub>i</sub> ] <sub>Pgp</sub> | <0                | <0                              | <0                 | <0                                  | <0                              | <0                 | <0  | <0                              | <0                 | <0  | <0                              | <0                 | <0  | <0                              | <0                 |
| Взаимодействие с MDM2                            |                   |                                 |                    |                                     |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |   |                                 |                    |
| GS <sub>4HG7</sub>                               | 53,7              | 55,4                            | 55,2               | 56,6                                | 61,8                            | 59,2               | 60,5  | 61,9                            | 63,1               | 63,2  | 66,9                            | 61,5               | 66,1  | 76,1                            | 66,3               |
| GS <sub>1Z1M</sub>                               | 53,6              | 58,0                            | 53,9               | 56,1                                | 58,8                            | 60,7               | 60,7  | 64,4                            | 58,3               | 65,4  | 69,5                            | 59,9               | 60,0  | 66,8                            | 59,9               |
| GS <sub>2LZG</sub>                               | 54,5              | 60,3                            | 54,8               | 64,4                                | 67,4                            | 67,0               | 66,7  | 64,9                            | 71,3               | 66,2  | 73,4                            | 64,4               | 65,3  | 69,1                            | 70,3               |

На основании расчетных данных из дальнейшего рассмотрения были исключены производные с адамантильным фрагментом (согласно критерию растворимости,  $\log S < -7$ ), а также эфиры, имеющие в своем составе хинуклидин, которые оказались характерными субстратами Pgp. Эфиры глицина, хотя и не показали достаточной липофильности, обладали более высокой целевой активностью, чем немодифицированные соединения, и поэтому не были исключены из рассмотрения.

Повышение расчетной целевой активности четко прослеживается в ряду «исходное соединение – ацетат –  $\alpha$ -аминоацетат – сложный эфир  $\alpha$ -аминокислоты». Анализ укладки лигандов в полости MDM2 (рис. 2,а) показал, что роль новых фрагментов состоит в формировании дополнительных взаимодействий с основанием подвижного участка N-концевого домена MDM2 (а.о. 94–98).

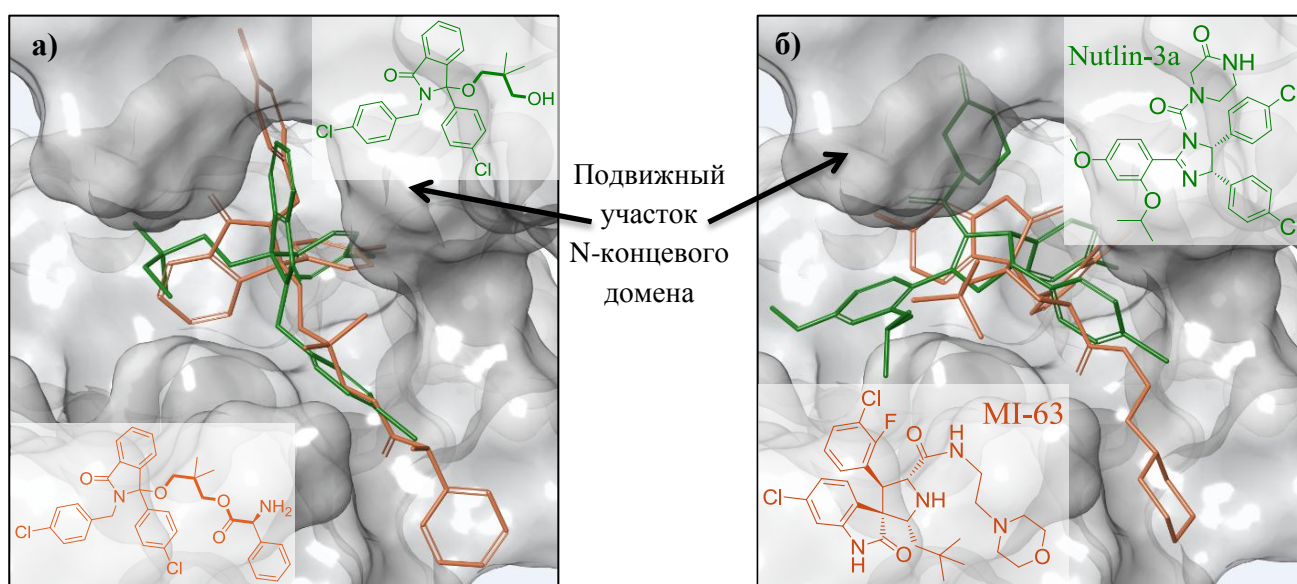


Рисунок 2 – Укладки в полости MDM2 (модель 1Z1M):

а) 2-(4-хлорбензил)-3-(4-хлорфенил)-3-(3-гидрокси-2,2-диметилпропокси)-изоиндолин-1-он и его сложный эфир; б) нутлин-3а и MI-63.

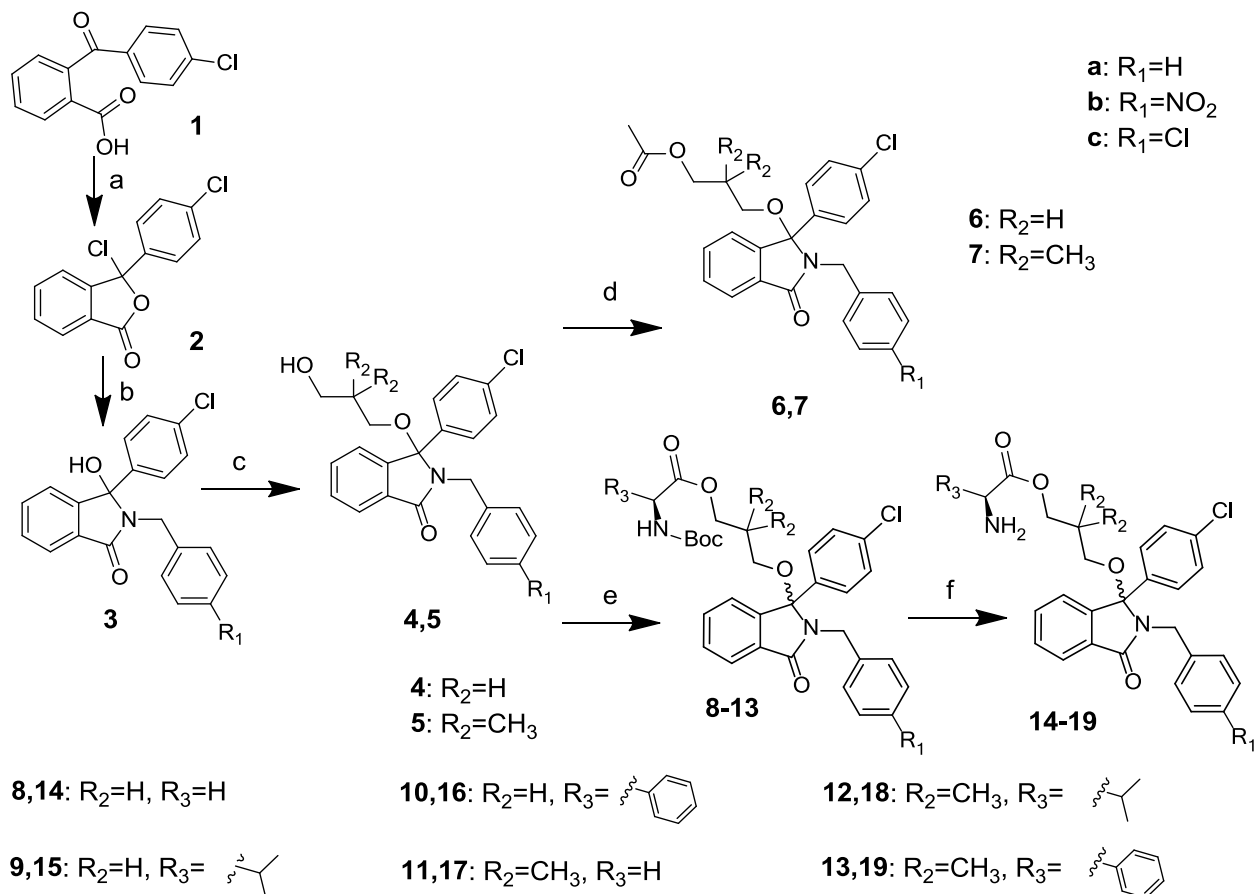
Наличие гибкого «мостика» между двумя эфирными связями обеспечивает оптимальное расположение индольного фрагмента в гидрофобной полости и аминокислотного фрагмента в основании подвижного участка. Аналогичное изменение связывания ингибиторов наблюдается в случае перехода от нутлина-3а к более эффективному MI-63 (рис.2,б).

### 3. Синтез соединений

Для *in vitro* проверки влияния заместителей на мембранотроность и целевую активность соединений был осуществлен синтез сложных эфиров 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов.

Из бензоилбензойной кислоты **1** получали хлорид **2** и без выделения продукта проводили его конденсацию с замещенным бензиламином для получения N-замещенного

3-гидрокси-изоиндолинона **3**. Далее получали 3-Cl-производное с последующим проведением реакции с соответствующим диолом в присутствии триэтиламина для получения простых эфиров изоиндолинона **4**, **5**. Для получения ацетатов использовали ацетилхлорид, для защиты аминогруппы *L*-аминокислоты – ди-*трет*-бутилпиpecокарбонат. Сложные эфиры *N*-Вос-защищенных *L*-аминокислот получали с использованием карбодиимидного метода в присутствии *N,N'*-диметиламинопиридина (рис. 3).



Реагенты и условия: а)  $SOCl_2$ , ДМФА, ТГФ; б) *p*- $R_1$ -бензиламин,  $Et_3N$ , ТГФ; в)  $SOCl_2$ , ДМФА, 2,2- $R_2, R_2$ -пропан-1,3-диол,  $Et_3N$ ; д)  $AcCl$ , ТГФ,  $Et_3N$ ; е) *Woc*-NH-CH( $R_3$ )-COOH,  $CH_2Cl_2$ , ДЦЦ, ДМАП; ф) силикагель,  $t=120^\circ C$ .

Рисунок 3 – Схема синтеза производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона

Для снятия *Woc*-защиты на последней стадии синтеза нами были использованы несколько классических методов (обработка ТФУ,  $HCl$ /диоксан). ТСХ, ВЭЖХ и ЯМР анализ получаемых продуктов показал, что в результате реакции происходит распад молекулы с образованием соединения **3**. При обработке соединения **4** ТФУ и раствором  $HCl$  в диоксане наблюдался такой же эффект, что свидетельствует о чувствительности С-О связи простого эфира к кислой среде.

Для снятия защиты, без разрыва простой эфирной связи, применили кипячение в системе вода-диоксан. Это привело к образованию целевого продукта, однако выход составлял не более 6% (ВЭЖХ-МС) даже после обработки в течение нескольких суток.

Варьирование условий кипячения не привело к значимому увеличению выхода реакции. Нагревание при пониженном давлении приводило к разложению соединения.

При термической обработке (120°C) в течение часа N-Вос-защищенного сложного эфира, нанесенного на пятикратный избыток силикагеля, была получена смесь продуктов, содержащая более 80 % целевого соединения и соединение **3** в качестве побочного продукта (11 %, ВЭЖХ-МС). Аналогично были получены все целевые сложные эфиры аминокислот.

#### 4. Разработка *in vitro* метода для сравнительного анализа способности веществ преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ

Для оценки мембранотропности соединений широко применяется метод РАМРА (parallel artificial membrane permeability assay). Наиболее активно он используется для исследований проникновения веществ через барьеры желудочно-кишечного тракта и кожи, однако ввиду общей липидной природы физиологических барьеров организма, он может быть применен и для оценки способности веществ преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ. Первоначально метод был валидирован путем исследования веществ с известной способностью преодолевать ГЭБ, в качестве мембраны применялся раствор фосфатидилхолина (табл. 2).

Таблица 2 - Способность веществ преодолевать мембраны

|           | Проникновение в ЦНС (лит.) | Log P ( <i>in silico</i> ) | LogPe ( <i>in vitro</i> ) | Log Pe (лит.) | Log Pe (клетки человека, лит.) |
|-----------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|--------------------------------|
| Кофеин    | +                          | -0,07                      | -5,7±0,2                  | -5,8          | -2,3                           |
| Фуросемид | -                          | 2,03                       | -6,9±0,3                  | -6,8          | -5,3                           |
| L-допа    | +                          | -2,39                      | -7,0±0,3                  | -7,1          | -3,5                           |

Полученные значения logPe кофеина и фуросемида соответствовали представленным в литературе, в дальнейших экспериментах их использовали в качестве контролей. Известно, что L-допа преодолевает ГЭБ, тем не менее, полученные результаты показали, что вещество не способно преодолевать искусственные мембраны. Этот результат согласуется с литературными данными о том, что L-допа переносится в мозг с помощью специфической системы транспорта нейтральных аминокислот [Kageyama, 2010], а не путем пассивной диффузии, для изучения которой разработан данный метод.

Анализ литературных данных показал недостаточность информации о составе мембран эндотелиоцитов ГЭБ человека, поэтому в дальнейшей работе мы использовали фосфолипиды, доминирующие в клетках, которые используются в *in vitro* моделях ГЭБ. Были отобраны три раствора в додекане: 1) 10 мг/мл фосфатидилхолина, 2) 2,52 мг/мл фосфатидилхолина + 6,62 мг/мл фосфатидилэтаноламина, 3) 2,52 мг/мл фосфатидилхолина + 6,62 мг/мл фосфатидилэтаноламина + 3,7 мг/мл фосфатидилсерина. Для сравнения мембран использовали 10 производных оксиндола, а также кофеин (**К**) и фуросемид (**Ф**) в качестве контролей (рис. 4).

Полученные данные показали, что роль липидного состава мембраны меняется в зависимости от исследуемых соединений. Для сравнения большинства однотипных веществ липидный состав не имеет принципиального значения. Однако в случае отдельных соединений, имеющих как очевидные, так и неявные особенности, изменение состава мембраны может приводить к получению существенно различающихся результатов. Наиболее чувствительным к составу мембраны оказалось соединение **И**, характерной структурной особенностью которого является наличие гидроксильных групп, способных образовывать водородные связи или участвовать в таутомерных равновесиях. Из экспериментальных данных также следует, что для задачи идентификации веществ с очень низкой (**Ф**) или очень высокой (**К**) способностью преодолевать ГЭБ используемый липидный состав не играет существенной роли.

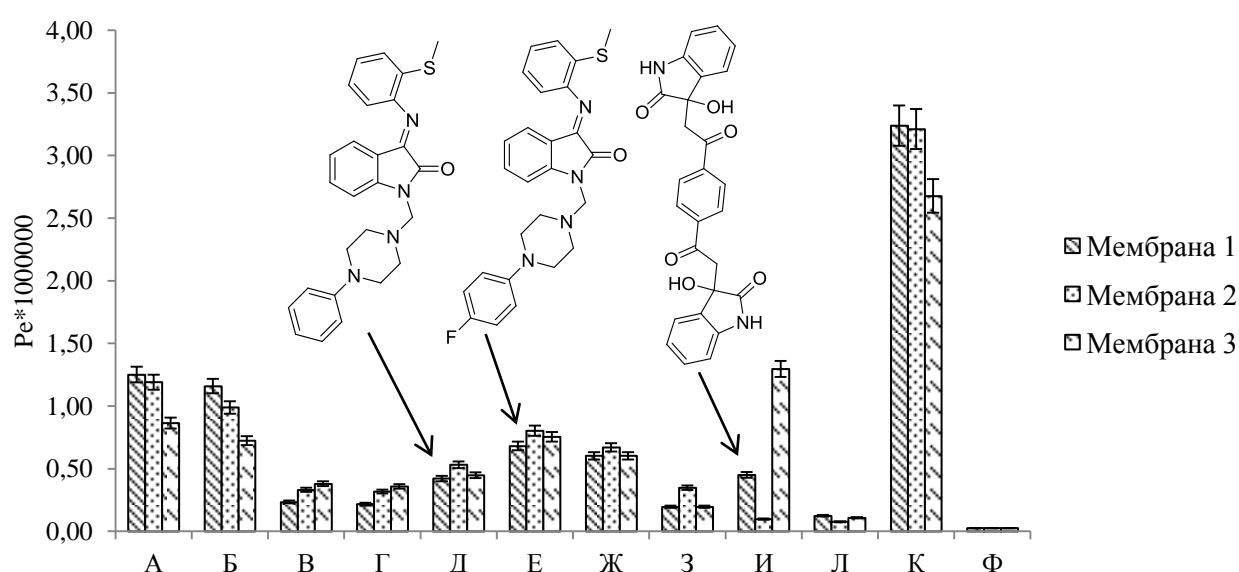


Рисунок 4 – Использование мембран разного состава при оценке мембранотропных свойств производных оксиндола

В большинстве случаев при разработке лекарственных препаратов перед исследователем стоит задача выявления оптимального кандидата среди соединений с варьируемой структурой, которые различным образом взаимодействуют с мембранами разного состава. В такой ситуации использование одного вида мембраны может приводить к неверным выводам. Таким образом, для практических задач разработки лекарственных препаратов оптимальным представляется параллельное использование мембран нескольких составов.

Полученные результаты также свидетельствовали о воспроизводимости данных well-to-well и plate-to-plate. В дальнейшем все вещества тестировались в трех повторностях.

### 5. Способность замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов преодолевать мембраны

Важным параметром при исследовании мембранотропности является продолжительность эксперимента. В зависимости от особенностей исследуемых соединений она может изменяться в широких пределах. Для определения оптимальной

продолжительности эксперимента в случае 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов была проведена серия измерений с использованием 6 временных интервалов (2, 4, 8, 16, 24 и 48 часов) и раствора фосфатидилхолина в качестве липидной мембраны. Оптимальным для оценки мембранотропности исследуемых соединений был выбран интервал в 16 часов.

Для изучения влияния заместителей на мембранотропность 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов определяли концентрацию исследуемых веществ в растворах за мембраной Ca. На рис. 5 представлены данные, полученные при использовании трех составов мембраны и концентрации начального раствора 1000  $\mu\text{M}$ .

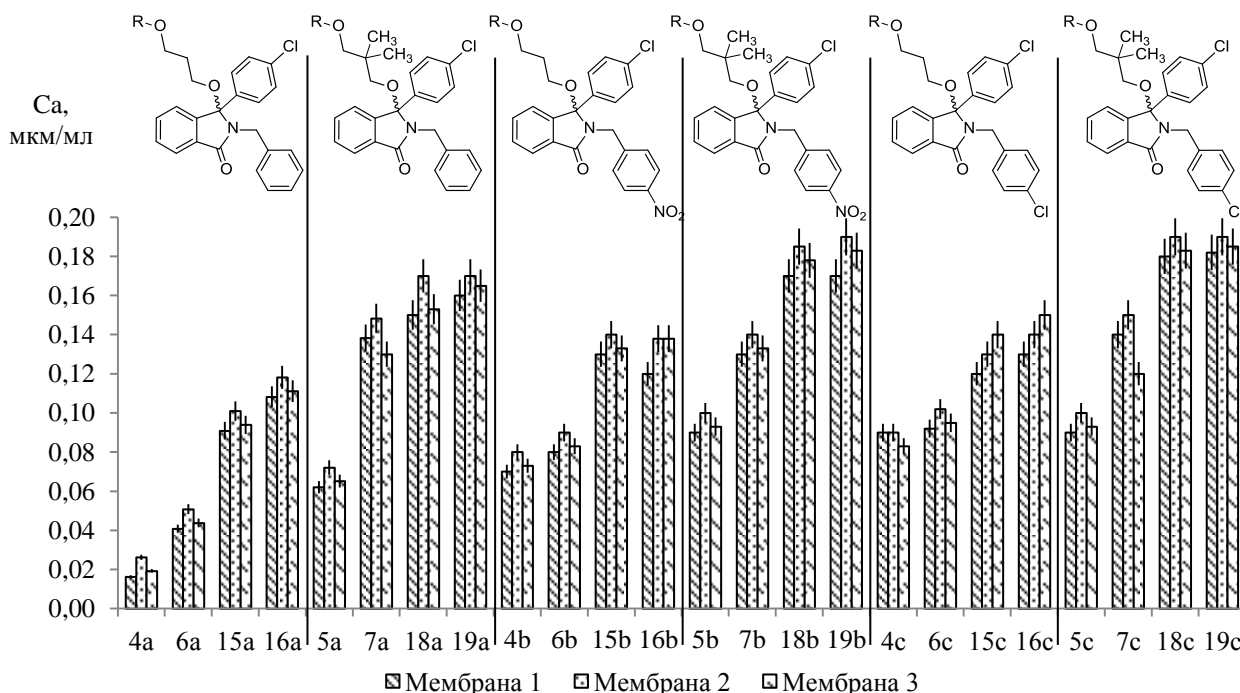


Рисунок 5 – Мембранотропность исследуемых соединений

## 6. Валидация метода оценки способности изоиндолинонов провоцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток

В НИЛ Молекулярная Фамакология СПбГТИ(ТУ) разработана тест-система для анализа активности белков семейства p53. Конструкция на основе вектора pLV1 обеспечивает повышенную экспрессию зелёного флуоресцентного белка (EGFP) в клетках U2OS в ответ на увеличение активности p53 в клетке. Такая система позволяет идентифицировать p53-опосредованный апоптоз по изменению флуоресценции клеток.

Для валидации тест-системы использовали: а) доксорубцин – ингибитор топоизомеразы-II, провоцирующий диссоциацию комплекса MDM2-p53 в ответ на повреждение ДНК, б) нутлин-3а – известный ингибитор взаимодействия MDM2-p53 класса *цис*-имидазолинов, в) немодифицированные ингибиторы MDM2 на основе изоиндолинона.

Для каждого вещества определяли диапазон концентраций, обработка которыми вызывает изменение доли светящихся клеток без значительного снижения их общего

количества. Через 24 часа обработки реактиваторами p53 наблюдали явное изменение доли светящихся клеток по сравнению с контрольными клетками. Соединение **4b** вызывало значительное снижение количества клеток (общий токсический эффект), что можно объяснить оксидативным стрессом, который имеет место при биотрансформации нитрогруппы [Erve J., 2006].

### 7. Способность изоиндолинонов провоцировать p53-опосредованный апоптоз

Клетки обрабатывали 2,3-замещенными 3-гидроксиизоиндолинонами в течение 24 часов, в качестве контроля использовали нутлин-3а. По общему количеству p53<sup>+</sup> и p53<sup>-</sup> клеток оценивали токсичность веществ. В таблице 3 представлены значения, полученные при обработке клеток веществами в концентрации 5 мкМ. Результаты для соединений с нитрогруппой не представлены, поскольку высокая токсичность веществ не позволила достоверно определить их активность.

Таблица 3 – Способность изоиндолинонов провоцировать p53-опосредованный апоптоз

| Вещество  | % EGFP клеток* | Количество p53 <sup>+</sup> клеток* | Количество p53 <sup>-</sup> клеток* | Вещество | % EGFP клеток* | Количество p53 <sup>+</sup> клеток* | Количество p53 <sup>-</sup> клеток* |
|-----------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Нутлин-3а | 14             | 6100                                | 8700                                | ДМСО     | 0,1            | 8900                                | 8600                                |
| 4а        | 1,1            | 6300                                | 8400                                | 4с       | 1,3            | 5400                                | 7000                                |
| 5а        | 3,8            | 5800                                | 8000                                | 5с       | 3,2            | 4800                                | 7600                                |
| 6а        | 1,8            | 6000                                | 8800                                | 6с       | 2,1            | 4900                                | 8400                                |
| 7а        | 4,0            | 5400                                | 8700                                | 7с       | 4,1            | 4700                                | 7700                                |
| 14а       | 3,7            | 5000                                | 8100                                | 14с      | 4,7            | 4300                                | 7700                                |
| 15а       | 5,8            | 4400                                | 7900                                | 15с      | 7,0            | 3900                                | 8000                                |
| 16а       | 6,1            | 4300                                | 7800                                | 16с      | 7,1            | 3700                                | 8300                                |
| 17а       | 5,7            | 4100                                | 7700                                | 17с      | 10             | 3000                                | 6900                                |
| 18а       | 7,8            | 4000                                | 8000                                | 18с      | 14             | 3200                                | 7900                                |
| 19а       | 8,1            | 4000                                | 8300                                | 19с      | 15             | 3500                                | 8000                                |

\* - относительная погрешность измерений не превышала 11%.

Обработка сложными эфирами приводила к увеличению доли светящихся клеток по сравнению с немодифицированными соединениями **4** и **5**, т.е. введение данных заместителей увеличивало способность 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов провоцировать p53-опосредованный апоптоз. В рамках каждого из рассмотренных рядов лучший результат показали сложные эфиры фенилглицина и валина.

Экспрессия белка p53 в клетках при обработке производными аминокислот также была выше, чем при обработке немодифицированными соединениями. Аналогичные

результаты были получены при проведении цитофлуорометрического теста на апоптоз по связыванию аннексина V: доля апоптотических клеток НСТ-116 после 24-часовой обработки (C = 10  $\mu$ M) составила 31% в случае нутлина-3а и **18с** и 33% в случае **19с**, при этом веществу **5с** соответствовало всего 2% апоптотических клеток.

Поскольку и мембранотропность (раздел 5), и ингибиторная способность *in silico* (раздел 2) эфиров валина и фенилглицина различалась незначительно, то можно предположить, что положительный целевой эффект этих веществ, наблюдаемый в экспериментах *in vitro*, определяется как повышением мембранотропности, так и увеличением прочности связывания ингибитора с гидрофобной полостью MDM2 за счет появления дополнительного центра взаимодействия.

### **8. Выделение и целевая активность диастереомеров 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов**

Наличие в молекулах соединений **4** и **5** асимметрических центров делает необходимой оценку биологической активности для каждого из оптических изомеров в отдельности. На данный момент не существует энантиоселективного метода синтеза этих соединений. Эти ингибиторы получают в виде смеси энантиомеров, причем ее разделение является трудоемким процессом, требующим использования хиральной хроматографии. В литературе представлен способ разделения таких энантиомеров при помощи хиральной препаративной ВЭЖХ [Hardcastle, 2011], причем авторы утверждают, что целевая активность энантиомеров различается на порядок.

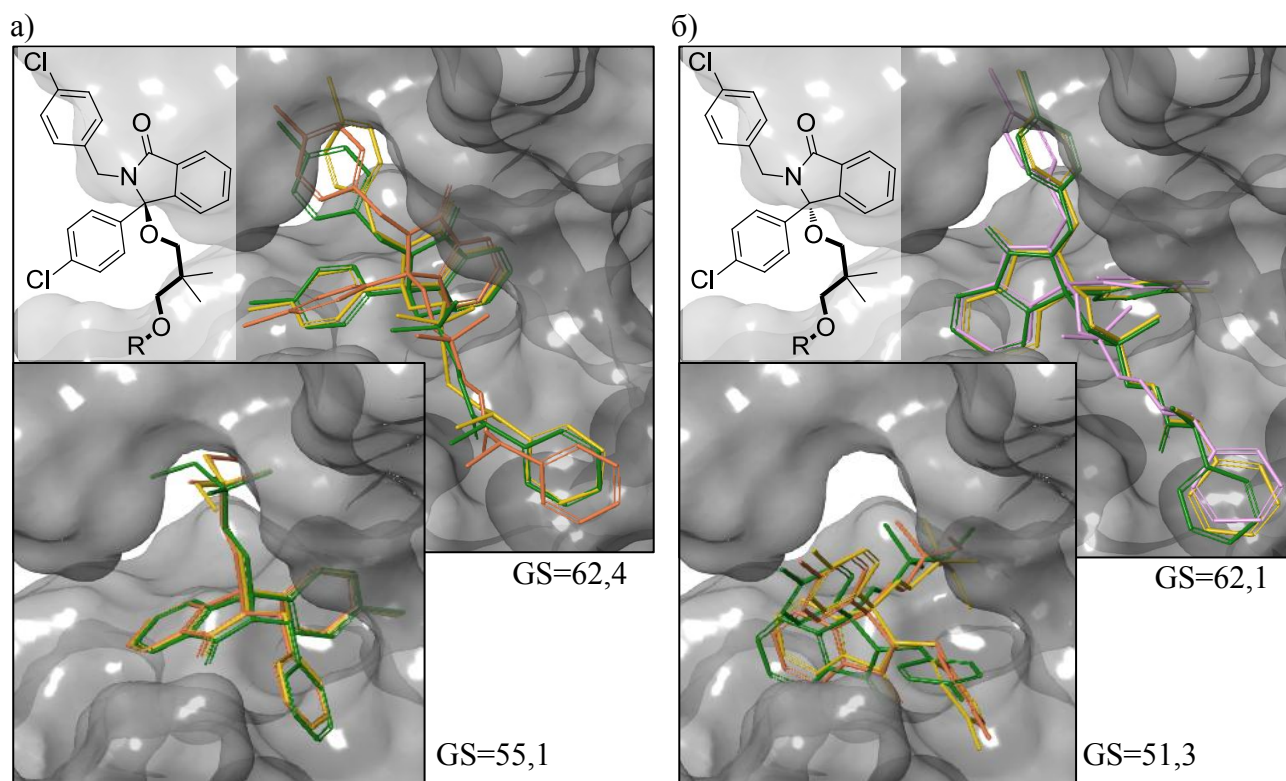
В отличие от ацетатов **6** и **7**, сохраняющих один асимметрический центр, сложные эфиры L-аминокислот имеют по два оптических центра, что делает возможным разделение пар таких диастереомеров без применения хиральной хроматографии.

Нами было установлено, что в ахиральной системе с помощью обращенно-фазной ВЭЖХ могут быть разделены только производные N-Вос-защищенных аминокислот **9**, **10**, **12**, **13**, в отличие от конечных продуктов **15**, **16**, **18**, **19**. Отсутствие асимметрических условий в процессе синтеза ожидало приводило к равному содержанию диастереомеров в продукте. Понижение силы элюента приводило к повышению селективности разделения. В случае прямофазной флэш-хроматографии такая закономерность сохранялась, что позволило оптимизировать препаративное разделение и выделить диастеремеры в чистом виде, хотя порядок выхода изомеров в такой системе стал обратным.

Целевая активность диастереомеров **15**, **16**, **18**, **19**, полученных путем термического снятия Вос-защиты, была изучена, как описано в разделе 7. Результаты показали, что ингибиторная способность каждой пары оптических изомеров различалась незначительно



(менее 15%). Молекулярный докинг показал, что наличие гибкого «мостика» между жесткими участками низкомолекулярного ингибитора обеспечивает оптимальное расположение молекулы в гидрофобной полости MDM2 в случае каждого из изомеров, что и определяет высокую ингибиторную способность как индивидуальных диастереомеров, так и их неразделенных смесей. В то же время GS и укладки энантиомеров неоптимизированных структур различаются, что согласуется с литературными данными об их различной ингибиторной способности (рис. 6).



**Рис. 6.** Укладка изомеров в гидрофобной полости белка MDM2 (модель 1Z1M): А) (*R*)-2-(4-хлорбензил)-3-(4-хлорфенил)-3-(3-гидрокси-2,2-диметилпропокси)изоиндолин-1-он и его сложный эфир. Б) (*S*)-изомер и его сложный эфир.

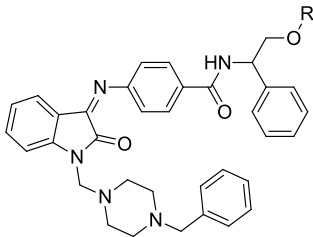
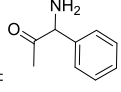
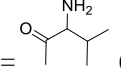
### 8. Модификация производного 3-иминоиндолинона

Поскольку предлагаемый в работе подход к оптимизации реактиваторов p53, основанный на структурной модификации существующих ингибиторов взаимодействия белков p53 и MDM2, показал свою эффективность при работе с производными изоиндолинона, аналогично была осуществлена разработка мембранотропных аналогов серии веществ, разработанных в нашей лаборатории [Davidovich, 2015].

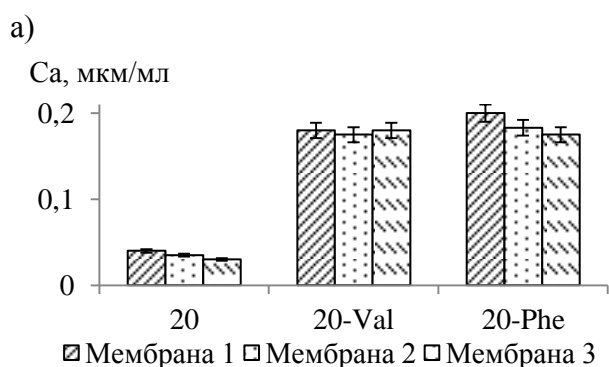
В качестве модифицирующих агентов, способствующих повышению мембранотропности, были рассмотрены валин и фенилглицин, идентифицированные в ходе оптимизации производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона.

В соответствии с предложенной схемой создания мембранотропных реактиваторов белка p53 на первом этапе была проведена *in silico* оценка мембранотропности и целевой активности соединения **20** и оптимизированных структур. Результаты компьютерного моделирования (табл. 3) показали, что в случае соединения **20**, как и в случае производных изоиндолинона, введение аминокислотных заместителей способствует повышению мембранотропности. При этом происходит повышение целевой активности соединений. Анализ укладок показал, что гибкость каркаса производных замещенного 3-иминоиндолинона позволяет молекуле эффективно связываться с полостью MDM2. При этом этерификация аминокислотными фрагментами не приводит к существенному изменению связывания.

Таблица 3 - *In silico* мембранотропность и целевая активность производных 3-иминоиндолинона

| Соединение   | logP   | logS | GS <sub>4HG7</sub> | GS <sub>1Z1M</sub> | GS <sub>2LZG</sub> |      |
|--|--|------|--------------------|--------------------|--------------------|------|
|  | R=H ( <b>20</b> )  | 4,37 | -5,58              | 67,6               | 67,2               | 56,1 |
|  | R=  ( <b>20-Phe</b> )  | 5,23 | -6,15              | 69,9               | 71,1               | 61,0 |
|  | R=  ( <b>20-Val</b> ) | 4,98 | -5,95              | 71,8               | 69,9               | 59,2 |

Для сравнения свойств соединения **20** и его сложных эфиров оценивали их способность преодолевать искусственных липидные мембраны и вызывать p53-опосредованный апоптоз. Длительность экспериментов была сокращена, поскольку в водной среде наблюдалось частичное разрушение соединений. Для изучения целевой активности была выбрана концентрация 3 мкМ, поскольку при такой обработке не происходит значительного снижения общего количества клеток. В качестве контроля использовали нутлин-3а. Результаты представлены на рис. 6.



б)

| Вещество  | % EGFP клеток | Количество p53 <sup>+</sup> клеток | Количество p53 <sup>-</sup> клеток |
|-----------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Нутлин-3а | 6             | 6800                               | 8600                               |
| ДМСО      | 0,1           | 8800                               | 8900                               |
| TI        | 13            | 5300                               | 8200                               |
| TI-Val    | 18            | 4500                               | 7800                               |
| TI-Phe    | 26            | 2400                               | 7800                               |

\* - относительная погрешность измерений не превышала 11%.

Рисунок 6 – Свойства производных иминоиндолинона:  
а) мембранотропность, б) целевая активность

В случае производных 3-иминоиндолинона оптимизированные соединения **20-Phe** и **20-Val** показали близкую способность преодолевать мембраны, в 3–4 раза большую, чем в случае соединения **20** (рис. 6, а). Оптимизированные соединения вызывали свечение EGFP у большей доли обработанных клеток (рис. 6, б), что свидетельствует об их более высокой способности провоцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток.

Как и в случае производных изоиндолинона, повышение уровня белка p53 и количества апоптотических клеток при их обработке исследуемыми веществами было подтверждено вестерн-блоттом и тестом на связывание аннексина V.

## ВЫВОДЫ

I. В диссертационной работе предложен подход к созданию мембранотропных реактиваторов белка p53 путем структурной модификации ингибиторов взаимодействия MDM2-p53. Для проверки такого подхода были разработаны:

а) метод сравнительного анализа способности индолинонов и изоиндолинонов преодолевать мембраны эндотелиоцитов ГЭБ *in vitro* с использованием искусственных липидных мембран;

б) метод оценки способности индолинонов и изоиндолинонов индуцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток с использованием высокоэффективного скрининга на имиджинговой системе Operetta.

II. Предложенный подход был успешно использован для модификации ингибиторов белок-белкового взаимодействия MDM2-p53: модифицированные производные 2,3-замещенных 3-гидроксиизоиндолинонов более эффективно преодолевают мембраны и обладают повышенной способностью индуцировать p53-опосредованный апоптоз раковых клеток за счет ингибирования белок-белкового взаимодействия MDM2-p53.

III. В ходе химического синтеза было показано, что:

а) простые эфиры 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона, известные как кандидаты в противораковые препараты, чувствительны к кислой среде;

б) производные 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона, получаемые при реакции рацемической смеси с N-Вос-*L*-аминокислотами, могут быть выделены с использованием флэш-хроматографии на ахиральных носителях.

IV. Модифицирующие структурные фрагменты, идентифицированные в ходе оптимизации производных 2,3-замещенного 3-гидроксиизоиндолинона, были использованы для создания новых мембранотропных производных замещенного 3-иминоиндолинона, которые преодолевают мембраны ГЭБ и индуцируют p53-опосредованный апоптоз раковых клеток существенно лучше, чем полученный ранее представитель этого класса ингибиторов белок-белкового взаимодействия MDM2-p53.

**Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Григорьева, Т.А. Диастереотропные производные хиральных алкоксиизоиндолинонов / Григорьева Т.А., Гарабаджиу А.В., Трибулович В.Г. // Журнал общей химии. – 2016. – № 11 (86). – С. 1811-1818.
2. Григорьева, Т.А. Исследование *in vitro* мембранотропных свойств биологически активных соединений / Т.А. Григорьева, А.В. Гарабаджиу, В.Г. Трибулович // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2016. – № 33 (59). – С. 41-45.
3. Grigoreva, T.A. The 26S proteasome is a multifaceted target for anti-cancer therapies / T.A. Grigoreva, V.G. Tribulovich, A.V. Garabadzhiu, G. Melino, N.A. Barlev // Oncotarget. – 2015. – № 6 (28). – P. 24733-24749.
4. Шувалов, О.Ю. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии / О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, А.В. Петухов, А.А. Дакс, Е.А. Васильева, Т.А. Григорьева, Г.С. Иванов, Н.А. Барлев // Цитология. – 2015. – №12 (57). – С. 847-854.
5. Григорьева, Т.А. Гематоэнцефалический барьер в разработке противоопухолевых препаратов / Т.А. Григорьева, А.В. Гарабаджиу, В.Г. Трибулович // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – № 1 (14). – С. 74.
6. Grigoreva, T.A. Mitochondrial morphogenesis role in apoptosis regulation / D.D. Orlova, T.A. Grigoreva, O.A. Fedorova, V.G. Tribulovich // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2014. – № 27 (53). – С.33-38.
7. Розен (Григорьева), Т.А. Модификация существующих ингибиторов MDM2 с целью повышения их способности преодолевать гемато-энцефалический барьер / Т.А. Розен, П.Б. Давидович, В.Г. Трибулович, Н.А. Барлев, А.В. Гарабаджиу, Дж. Мелино // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – № 1 (13). – С. 123.
8. Розен (Григорьева), Т.А. Вмешательство в убиквитин-зависимую систему деградации белков как способ борьбы с онкологическими заболеваниями / Т.А. Розен, П.Б. Давидович, В.Г. Трибулович, Н.А. Барлев, А.В. Гарабаджиу, Дж. Мелино // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – № 2 (12). – С. 69.