

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Младен Д. Коравовић

**ДИЗАЈН, СИНТЕЗА И БИОЛОШКА
КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МАЛИХ ОРГАНСКИХ
МОЛЕКУЛА КОЈИ ИНДУКУЈУ ДЕГРАДАЦИЈУ HSP90
И ВЕТ ПРОТЕИНА**

докторска дисертација

Београд, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Mladen D. Koravovic

**DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF SMALL ORGANIC
MOLECULES THAT INDUCE DEGRADATION OF HSP90
AND BET PROTEINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Ментори:

Др сц. Владимир Савић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Бојан Марковић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Чланови Комисије за одбрану докторске дисертације:

Др сц. Катарина Николић, редовни професор, председник Комисије
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Милена Ковачевић, доцент
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник
Институт за онкологију и радиологију Србије

Датум одбране докторске дисертације: _____

ЗАХВАЛНИЦА

Желео бих да изразим искрену захвалност својим менторима, др сц. Владимиру Савићу и др сц. Бојану Марковићу, на стручном усмеравању, драгоценим саветима и несебичној помоћи током израде ове докторске дисертације. Њихова подршка, критичко сагледавање резултата и сугестије током писања значајно су допринели обликовању и коначном изгледу овог рада.

Посебну захвалност дугујем др сц. Гордани Тасић на помоћи у стицању и усавршавању експерименталних вештина из области органске хемије. Њено знање, стрпљење и практични савети били су од великог значаја за мој лабораторијски рад и професионални развој.

Захваљујем се St. Jude Children's Research Hospital на успешној сарадњи, као и др сц. Зорану Ранковићу, руководиоцу истраживачког тима у оквиру ове сарадње, на доприносу и подршци током реализације истраживања која су део ове докторске дисертације.

Такође, захваљујем се свим члановима Катедре за органску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета на корисним саветима, колегијалној подршци и свакој помоћи коју сам добио током рада на докторској дисертацији.

Најдубљу захвалност дугујем својој породици на безусловној подршци, разумевању, стрпљењу и охрабрењу. Њихова подршка била је мој најважнији ослонац и извор снаге током целокупног периода израде ове докторске дисертације.

Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина

Сажетак

Циљ ове докторске дисертације био је дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула усмерених на HSP90 и BET протеине. Истраживање је обухватило примену стратегија циљане деградације протеина кроз развој PROTAC и НуТ молекула усмерених на HSP90, као и развој оптимизованих инхибитора BET протеина.

У делу истраживања усмереном на HSP90, синтетисана је серија PROTAC молекула који регрутују цереблон (CRBN) као Е3 лигазу и засновани су на три класе лиганата за HSP90: деривати пироло[2,3-*d*]пиримидина, тиено[2,3-*d*]пиримидина и 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола. Сва једињења су окарактерисана применом TR-FRET теста којим је процењено везивање за HSP90, CTG теста у MV4-11 ћелијама којим је процењена антипролиферативна активност, као и одређивањем растворљивости и Сасо-2 пермеабилности. Пироло[2,3-*d*]пиримидински скелет се показао најповољнијим, јер су једињења **(3)** и **(7)** задржала снажно везивање за HSP90 ($IC_{50} = 0,023$ и $0,016 \mu\text{M}$) и показала изражену активност у MV4-11 ћелијама ($EC_{50} = 0,013$ и $0,0295 \mu\text{M}$). Тиено[2,3-*d*]пиримидински скелет је показао да очувано везивање за HSP90 не мора нужно да доведе до снажне активности у ћелијама. У оквиру скелета 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола, бензамидни лиганд био је супериорнији у односу на бензонитрилну алтернативу.

Као комплементарна стратегија деградације HSP90 испитани су НуТ молекули засновани на тетрахидроиндазолском скелету који садрже адамантан као хидрофобно обележје. У овој серији једињење **(65)** се издвојило као најповољнији представник, јер је задржало субмикромоларно везивање за HSP90 ($IC_{50} = 0,1075 \mu\text{M}$) и показало најизраженији одговор у CTG тесту међу НуТ молекулима ($EC_{50} = 0,2114 \mu\text{M}$). Ипак, ни PROTAC ни НуТ молекули усмерени на HSP90 нису показали довољно снажан образац активности у ћелијама да би се приступило испитивању деградације HSP90 користећи *Western blot* методу. Међутим, имајући у виду хипотезу да испитивани PROTAC молекули могу покренути више механистичких исхода, укључујући жељену деградацију HSP90, али и нежељену деградацију CRBN-а и/или Е3 лигаза које су део интерактома HSP90, овакви PROTAC молекули представљају кандидате за будућа механистичка испитивања.

У делу истраживања усмереном на BET протеине, кристалографска анализа PROTAC молекула **(71)** изведеног из (+)-JQ1 указала је да побољшано везивање за бромодомене потиче из додатних интеракција у близини амидног региона. На основу овог запажања синтетисана је серија амида изведених из (+)-JQ1 и испитана применом TR-FRET теста према BRD2(BD1), BRD2(BD2), BRD4(BD1) и BRD4(BD2), као и CTG теста у ћелијским линијама леукемије и медулобластома. Неколико хетероцикличних амида надмашило је референтне инхибиторе (+)-JQ1 и бирабресиб. Једињење **(85)**, 1,3,4-гиадиазолски амид, издвојило се као веома потентан лиганд за BRD2 и BRD4, са IC_{50} вредностима од $0,0016 \mu\text{M}$ за BRD2(BD1), $0,0001 \mu\text{M}$ за BRD2(BD2), $0,0065 \mu\text{M}$ за BRD4(BD1) и $0,0002 \mu\text{M}$ за BRD4(BD2). Ово једињење је показало високу активност у ћелијама, потентну пан-инхибиторну активност према BET протеинима, релативну преференцију за BRD4(BD1) и очекивано снижење нивоа с-Мус у MV4-11 ћелијама.

Проучавање амида изведених из (+)-JQ1 показало је да избор водећег једињења није могао да се заснива на једном појединачном физичко-хемијском, биолошком или фармакокинетичком параметру. Једињење **(85)** је објединило снажно везивање за бромодомене, високу активност у ћелијама, прихватљиву растворљивост, одговарајућу Сасо-2 пермеабилност, нижи ефлукс у односу на неколико блиских аналога, добру стабилност у плазми и физиолошком раствору

пуферованом фосфатима, као и побољшану стабилност у хуманим микрозомима у односу на (+)-JQ1 и бирабресиб. У *in vivo* фармакокинетичком испитивању на мишевима, једињење **(85)** је показало низак клиренс након интравенске примене и високу оралну биорасположивост 60-70%. Сагледано у целини, део истраживања усмерен на HSP90 пружио је молекуле за будућа механистичка испитивања, док је део усмерен на BET протеине довео до једињења **(85)** као водећег једињења за даљи развој.

Кључне речи: циљана деградација протеина, HSP90, BET протеини, PROTAC молекули, НуТ молекули, инхибитори BET протеина, (+)-JQ1

Научна област: Фармација

Ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа

Design, Synthesis, and Biological Characterization of Small Organic Molecules That Induce Degradation of HSP90 and BET Proteins

Abstract

The aim of this doctoral dissertation was the design, synthesis, and biological characterization of small organic molecules directed toward HSP90 and BET proteins. The research included the application of targeted protein degradation strategies through the development of HSP90-directed PROTAC and HyT molecules, as well as the development of optimized BET protein inhibitors.

In the HSP90-directed part of the research, a series of PROTAC molecules recruiting cereblon (CRBN) as the E3 ligase was synthesized. These molecules were based on three classes of HSP90 ligands: pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine, thieno[2,3-*d*]pyrimidine, and 4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indazole derivatives. All compounds were characterized using a TR-FRET assay to assess HSP90 binding, a CTG assay in MV4-11 cells to evaluate antiproliferative activity, as well as solubility and Caco-2 permeability measurements. The pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine scaffold showed the most favorable profile, as compounds (**3**) and (**7**) retained strong HSP90 binding ($IC_{50} = 0.023$ and $0.016 \mu\text{M}$) and showed pronounced activity in MV4-11 cells ($EC_{50} = 0.013$ and $0.0295 \mu\text{M}$). The thieno[2,3-*d*]pyrimidine scaffold showed that preserved HSP90 binding does not necessarily lead to strong cellular activity. Within the 4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indazole scaffold, the benzamide ligand was superior to the benzonitrile alternative.

As a complementary HSP90 degradation strategy, HyT molecules based on the tetrahydroindazole scaffold and containing adamantane as a hydrophobic tag were investigated. In this series, compound (**65**) emerged as the most favorable representative, as it retained submicromolar HSP90 binding ($IC_{50} = 0.1075 \mu\text{M}$) and showed the strongest response in the CTG assay among the HyT molecules ($EC_{50} = 0.2114 \mu\text{M}$). However, neither the HSP90-directed PROTAC nor HyT molecules showed a sufficiently strong pattern of cellular activity to proceed with the investigation of HSP90 degradation using the Western blot method. Nevertheless, considering the hypothesis that the investigated PROTAC molecules may trigger multiple mechanistic outcomes, including the desired degradation of HSP90, but also the undesired degradation of CRBN and/or E3 ligases that are part of the HSP90 interactome, such PROTAC molecules represent candidates for future mechanistic studies.

In the BET-directed part of the research, crystallographic analysis of the (+)-JQ1-derived PROTAC molecule (**71**) indicated that improved bromodomain binding originated from additional interactions near the amide region. Based on this observation, a series of (+)-JQ1-derived amides was synthesized and evaluated using TR-FRET assays against BRD2(BD1), BRD2(BD2), BRD4(BD1), and BRD4(BD2), as well as CTG assays in leukemia and medulloblastoma cell lines. Several heterocyclic amides outperformed the reference inhibitors (+)-JQ1 and birabresib. Compound (**85**), a 1,3,4-thiadiazole amide, emerged as a highly potent ligand for BRD2 and BRD4, with IC_{50} values of $0.0016 \mu\text{M}$ for BRD2(BD1), $0.0001 \mu\text{M}$ for BRD2(BD2), $0.0065 \mu\text{M}$ for BRD4(BD1), and $0.0002 \mu\text{M}$ for BRD4(BD2). This compound showed high cellular activity, potent pan-inhibitory activity toward BET proteins, relative preference for BRD4(BD1), and the expected reduction of c-Myc levels in MV4-11 cells.

The investigation of (+)-JQ1-derived amides showed that the selection of a lead compound could not be based on any single physicochemical, biological, or pharmacokinetic parameter. Compound (**85**) combined strong bromodomain binding, high cellular activity, acceptable solubility, appropriate Caco-2 permeability, lower efflux than several close analogues, good stability in plasma and phosphate-buffered saline, as well as improved stability in human microsomes compared with (+)-JQ1 and birabresib. In an *in vivo* pharmacokinetic study in mice, compound (**85**) showed low clearance after intravenous administration and high oral bioavailability of 60-70%. Overall, the

HSP90-directed part of the research provided molecules for future mechanistic studies, while the BET-directed part led to compound **(85)** as a lead compound for further development.

Key words: targeted protein degradation, HSP90, BET proteins, PROTAC molecules, HyT molecules, BET inhibitors, (+)-JQ1

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

СКРАЋЕНИЦЕ

АНА1	енг. <i>Activator of 90 kDa Heat Shock Protein ATPase Homolog 1</i> (активатор хомолога 1 АТПазе протеина топлотног шока од 90 kDa)
AR	енг. <i>Androgen Receptor</i> (андрогени рецептор)
BD	енг. <i>Bromodomain</i> (бромодомен)
ВЕТ	енг. <i>Bromodomain and Extra-Terminal Domain Proteins</i> (протеини са бромодоменом и екстра-терминалним доменом)
протеини	
Вос	енг. <i>tert-Butyloxycarbonyl</i> (<i>tert</i> -бутилоксикарбонил)
bRo5	енг. <i>beyond Rule of 5</i> (изван правила петице)
CDK	енг. <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> (циклин-зависна киназа)
cIAP	енг. <i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i> (ћелијски инхибитор протеина апоптозе)
CRBN	енг. <i>Cereblon</i> (цереблон)
CRL	енг. <i>Cullin-RING Ligase</i> (кулин-RING лигаза)
CTD	енг. <i>C-Terminal Domain</i> (C-терминални домен)
CTG	енг. <i>CellTiter-Glo</i>
CUL	енг. <i>Cullin</i> (кулин)
СУР450	енг. <i>Cytochrome P450</i> (цитохром P450)
DCAF15	енг. <i>DDB1- and CUL4-Associated Factor 15</i> (фактор 15 повезан са DDB1 и CUL4)
EDC × HCl	енг. <i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride</i> (1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид-хидрохлорид)
EDP	енг. <i>Event-Driven Pharmacology</i> (фармаколошки модел заснован на покретању догађаја који доводе до разградње циљних протеина)
ER	енг. <i>Estrogen Receptor</i> (естрогени рецептор)
ESI	енг. <i>Electrospray Ionization</i> (електроспреј јонизација)
ETD	енг. <i>Extra-Terminal Domain</i> (екстра-терминални домен)
GAPDH	енг. <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> (глицералдеhid-3-фосфат дехидрогеназа)
HIF-1α	енг. <i>Hypoxia-Inducible Factor-1α</i> (хипоксијом-индуковани фактор-1α)
HIP	енг. <i>HSP70-Interacting Protein</i> (протеин који интерагује са HSP70)
HOP	енг. <i>HSP70-HSP90 Organizing Protein</i> (организациони протеин HSP70-HSP90)
HRMS	енг. <i>High-Resolution Mass Spectra</i> (масени спектри високе резолуције)
HSP90	енг. <i>Heat Shock Protein 90</i> (протеин топлотног шока 90)
HyT	енг. <i>Hydrophobic Tagging</i> (хидрофобно обележавање)
IMiDs	енг. <i>Immunomodulatory Drugs</i> (имуномодулаторни лекови)
ITC	енг. <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (изотермална титрациона калориметрија)
MD	средишњи домен
MDM2	енг. <i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i> (хомолог мишјег <i>double minute 2</i>)
MGs	енг. <i>Molecular Glues</i> (молекулски лепкови)
NanoBRET	енг. <i>Nanoluciferase Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i> (пренос биолуминесцентне резонантне енергије посредован нанолуциферазом)
NTD	N-терминални домен
ODP	енг. <i>Occupancy-Driven Pharmacology</i> (фармаколошки модел заснован на окупираности циљних протеина)
PAMPA	енг. <i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i> (тест пропустљивости паралелне вештачке мембране)
PBS	енг. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (физиолошки раствор пуферован фосфатима)
PDHUs	енг. <i>Phenyl Dihydrouracils</i> (фенил-дихидроурацили)

P-gp	енг. <i>P-Glycoprotein</i> (<i>P</i> -гликопротеин)
PGs	енг. <i>Phenyl Glutarimides</i> (фенил-глутаримиди)
PROTAC	енг. <i>Proteolysis-Targeting Chimera</i> (химера усмерена на протеолизу)
P-TEFb	енг. <i>Positive Transcription Elongation Factor b</i> (позитивни транскрипциони елонгациони фактор <i>b</i>)
rpm	енг. <i>Revolutions Per Minute</i> (обртаји у минути)
SAR	енг. <i>Structure-Activity Relationship</i> (однос структуре и активности)
SPR	енг. <i>Surface Plasmon Resonance</i> (површинска плазмонска резонанца)
TBD	енг. <i>Thalidomide-Binding Domain</i> (домен за везивање талидомида)
TPD	енг. <i>Targeted Protein Degradation</i> (циљана деградација протеина)
TR-FRET	енг. <i>Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (временски разрешен пренос флуоресцентне резонантне енергије)
VHL	енг. <i>Von Hippel-Lindau</i> (фон Хипел-Линдау)
АМЛ	акутна мијелоидна леукемија
АТП	аденозин-трифосфат
АЦН	ацетонитрил
ДИПЕА	<i>N,N</i> -диизопропилетиламин
ДМАП	4-диметиламинопиридин
ДМСО	диметил-сулфоксид
ДМФ	<i>N,N</i> -диметилформамид
ДХМ	дихлорометан
ММ	мултипли мијелом
МФ	мобилна фаза
ПЕГ	полиетилен-гликол
ПОИ	протеин од интереса
ППИ	протеин-протеин интеракције
СТ	собна температура
ТК	тернарни комплекс
ТФСК	трифлуоросирћетна киселина
ТХФ	тетрахидрофуран
УПС	убиквитин-протеазом систем
ХАТУ	<i>O</i> -(7-азабензотриазол-1-ил)- <i>N,N,N',N'</i> -тетраметилурунијум-хексафлуорофосфат
ХБТ	хидроксибензотриазол

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Фармакологија традиционалних инхибитора.....	2
1.2. Проширење терапијских приступа изван инхибиције.....	3
1.3. Фармаколошки принципи традиционалних и нових терапија.....	4
1.4. Циљана деградација протеина	5
1.5. Убиквитин-протеазом систем као основа циљане деградације протеина	6
1.5.1. E1 ензими: активација убиквитина.....	7
1.5.2. E2 ензими: конјугација убиквитина	7
1.5.3. E3 лигазе: завршни пренос убиквитина.....	7
1.6. PROTAC молекули	12
1.6.1. Историјска позадина и еволуција PROTAC молекула.....	13
1.6.2. Функције структурних елемената PROTAC молекула	20
1.6.3. Архитектура E3 лигаза у функцији PROTAC молекула	23
1.6.4. Улоге формирања тернарног комплекса и кооперативности у дејству PROTAC молекула.....	27
1.6.5. Тестови за испитивање тернарних комплекса и кооперативности.....	27
1.6.6. Експериментално одређивање деградационе активности PROTAC молекула.....	33
1.6.7. Предности PROTAC технологије	36
1.6.8. Изазови у дизајну PROTAC молекула.....	40
1.6.9. Изгледи за PROTAC молекуле	41
1.6.10. Одабрани PROTAC молекули у клиничким студијама и први регистровани представник	42
1.7. Проширење репертоара за разградњу протеина: молекулски лепкови.....	43
1.7.1. Одабрани примери MGs	44
1.7.2. Начин везивања MGs	46
1.8. Молекули за хидрофобно обележавање протеина	47
1.8.1. Концепт хидрофобног обележавања	47
1.8.2. Механизам дејства	47
1.8.3. Разлике у односу на PROTAC молекуле и MGs	48
1.8.4. Примена НуТ молекула	48
1.8.5. Фармаколошка разматрања	49

1.9. Значај HSP90 за функцију ћелија.....	50
1.9.1. Механизам одвијања конформационих промена протеина посредованих HSP90...	50
1.9.2. HSP90 као централни регулатор „обележја рака“	51
1.9.3. Стабилизација онкогених протеина-клијената.....	52
1.9.4. Зависност од HSP90 специфична за карциноме.....	52
1.9.5. Протеини-партнери HSP90 у контекстима канцера.....	53
1.9.6. Развој инхибитора HSP90.....	53
1.10. BET протеини као епигенетски регулатори.....	54
1.10.1. Улоге BET протеина у контроли транскрипције и функцији енхенсера.....	55
1.10.2. Ремоделовање хроматина и онкогене улоге BET протеина.....	57
1.10.3. Инхибиција BET протеина у онколошким стањима.....	57
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	59
3. ЕКСПЕРИМЕНТИ	61
3.1. Опште информације о експерименталном раду	62
3.2. Дизајн и синтеза PROTAC молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету пироло[2,3- <i>d</i>]пиримидина	62
3.2.1. Оптимизација скелета и дизајн лиганда	62
3.2.2. Однос структуре и активности и избор места припајања линкера	63
3.2.3. Фармакокинетичка својства пиролопиримидинског лиганда.....	64
3.2.4. Изложеност у <i>in vivo</i> условима и дистрибуција у ткива	64
3.2.5. Примена пиролопиримидинског скелета у синтези PROTAC молекула	64
3.2.6. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула базираних на скелету пироло[2,3- <i>d</i>]пиримидина	65
3.3. Дизајн и синтеза PROTAC молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету тиено[2,3- <i>d</i>]пиримидина.....	68
3.3.1. Афинитет за HSP90 и ћелијска активност	70
3.3.2. Фармакокинетичка својства	70
3.3.3. Антитуморска ефикасност у <i>in vivo</i> условима	70
3.3.4. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула базираних на скелету тиено[2,3- <i>d</i>]пиримидина.....	70
3.4. Дизајн и синтеза PROTAC молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола	89
3.4.1. SAR анализа супституције на бензамиду	90
3.4.2. Оптимизација потентности и фармакокинетичких својстава.....	90
3.4.3. Развој скелета 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола.....	91

3.4.4. Основа за избор 2'-позиције као места припајања линкера	91
3.4.5. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула базираних на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола	92
3.5. Дизајн и синтеза НуТ молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола	105
3.5.1. Образложење дизајна и избор места припајања линкера	105
3.5.2. Синтеза и структурна карактеризација НуТ молекула базираних на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола	105
3.6. Дизајн и синтеза једињења усмерених на BET протеине	111
3.6.1. Сазнања и закључци који су подстакли прелаз са деградера на инхибиторе.....	112
3.6.2. Стратегија дизајна за оптимизацију инхибитора BET протеина.....	112
3.6.3. Опсег серије инхибитора BET протеина	113
3.6.4. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула усмереног на BET протеине	113
3.6.5. Синтеза и структурна карактеризација амида изведених из (+)-JQ1	115
3.7. TR-FRET тест за HSP90 α	126
3.8. TR-FRET тест за бромодомене BET протеина	126
3.9. Луминесцентни <i>CellTiter-Glo</i> тест вијабилности ћелија	127
3.10. Анализа стабилности у плазми.....	127
3.11. Анализа стабилности у физиолошком пуферу са фосфатима	127
3.12. Тест растворљивости	127
3.13. РАМРА тест.....	128
3.14. Тест пермеабилности на Сасо-2 ћелијама	128
3.15. Испитивање везивања за протеине плазме	129
3.16. Тест стабилности у микрозомима јетре	129
3.17. Фармакокинетичко профилисање у <i>in silico</i> условима	130
3.18. Фармакокинетичко профилисање једињења (85) у <i>in vivo</i> условима.....	131
3.19. Процена селективности једињења (85) према BET протеинима користећи „BROMOscan“ методу	132
3.20. Процена утицаја једињења (85) на ниво с-Мус <i>Western blot</i> анализом.....	133
3.21. Кристалографска анализа једињења (79) и (85)	133
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	135
4.1. PROTAC молекули усмерени на HSP90.....	136
4.1.1. PROTAC молекули засновани на скелету пиролопиримидина.....	136
4.1.2. PROTAC молекули засновани на скелету тиенопиримидина	138

4.1.3. PROTAC молекули засновани на скелету тетра hidroиндазола	141
4.1.4. Трендови физичко-хемијских особина кроз три фамилије скелета	145
4.1.5. Односи између структуре, својстава и активности кроз комплетан скуп података за PROTAC молекуле усмерене на HSP90	145
4.1.6. Образложење одсуства Western blot анализе у овом истраживању	146
4.1.7. Хипотеза о деградацији и деплецији CRBN-а инспирисана литературом о деградерима који користе интерактом HSP90	147
4.1.8. Општи закључци о PROTAC молекулима усмереним на HSP90	149
4.2. НуТ молекули усмерени на HSP90	150
4.2.1. Полазни инхибитори и њихово превођење у НуТ молекуле усмерене на HSP90..	151
4.2.2. Односи између структуре, својстава и активности кроз комплетан скуп података за НуТ молекуле усмерене на HSP90.....	155
4.2.3. Образложење изостанка Western blot анализе	156
4.2.4. Укупни закључци о НуТ молекулима усмереним на HSP90.....	156
4.3. Једињења усмерена на ВЕТ протеине	157
4.3.1. Оптимизација амида изведених из (+)-JQ1 помоћу кристалографских података..	157
4.3.2. Трендови везивања за бромодомене амида изведених из (+)-JQ1	159
4.3.3. Антипролиферативна активност амида изведених из (+)-JQ1	161
4.3.4. Кристалографска анализа референтних и одабраних инхибитора ВЕТ протеина.	163
4.3.5. Односи између структуре, својстава и активности и тумачење физичко-хемијских и in vitro фармакокинетичких својстава	165
4.3.6. Процена селективности једињења (85) према члановима породице ВЕТ протеина	167
4.3.7. Процена модулације с-Мус посредством једињења (85).....	168
4.3.8. In vivo фармакокинетичка карактеризација једињења (85).....	169
4.3.9. Компаративна in silico/in vitro анализа фармакокинетичких профила амида изведених из (+)-JQ1	170
4.3.10. Општи закључци о једињењима усмереним на ВЕТ протеине	183
5. ЗАКЉУЧАК.....	184
6. ЛИТЕРАТУРА	187
7. ПРИЛОЗИ	217
7.1. Одобрење за коришћење резултата добијених кроз сарадњу са <i>St. Jude Children's Research Hospital</i>	218
7.2. Оригинални извештај о фармакокинетичком профилисању једињења (85) у in vivo условима.....	219
БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА	243

РАДОВИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	244
ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ	245
ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА	246
ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ	247

1. УВОД

1.1. Фармакологија традиционалних инхибитора

Током више деценија, инхибитори мале молекулске масе представљали су окосницу откривања лекова, и то с оправданим разлогом. Када протеин поседује јасно дефинисан џеп за везивање, пажљиво дизајниран лиганд може да се веже у том џепу и смањи патолошку сигнализацију. Ипак, како се наше разумевање људске биологије продубљивало, постало је јасно да ова традиционална стратегија оставља значајан део биологије болести изван свог домета. Традиционални инхибитори најбоље делују на ензиме и рецепторе који имају приступачна везивна места; међутим, приближно 75% људског протеома нема такве домene, што многе интрацелуларне неензимске протеине – као што су транскрипциони фактори и скафолд протеини – ставља изван домета конвенционалне медицинске хемије [1]. Тешкоће у модулирању ових класа протеина огледају се у веома ограниченом броју одобрених лекова који могу деловати на њих [2,3].

Чак и када је циљни протеин фармаколошки доступан лиганду (енг. *druggable*), постизање ефикасног дејства инхибитора у живом систему ретко је једноставно. Стратегије медицинске хемије које теже ка одрживој окупираности циљног протеина често захтевају високу системску изложеност леку како би се обезбедило довољно и трајно дејство *in vivo*, што може повећати ризик од споредних (енг. *off-target*) фармаколошких ефеката и нежељених догађаја [4]. Осим тога, клиничке перформансе ових једињења чврсто су повезане са термодинамиком и кинетиком везивања, односно, њихова ефикасност зависи од јачине и стабилности интеракције између инхибитора и циљног протеина. Ова усмереност на везивање може оставити значајне биолошке функције нетакнутим; инхибитори обично супримирају каталитичку активност, док некаталитичке функције, као што су скафолд улоге у организовању протеинских комплекса, остају углавном непромењене. У ситуацијама у којима су ендогени лиганди претерано експримирани, класични инхибитори могу да се нађу у директној конкуренцији на истом месту везивања, што додатно умањује терапијски ефекат [5].

Ова молекулска ограничења одражавају се на нивоу мрежа протеина. Мали молекули најчешће ремете само један домен мултидоменског скафолд протеина, допуштајући другим доменима и њиховим протеин-протеин интеракцијама (ППИ) да остану функционалне и одрже сигнализацију [6]. Ћелијски системи такође могу да пруже отпор – инхибиција може да изазове компензационе одговоре, укључујући усходну регулацију и акумулацију циљаних протеина, што доводи до само делимичне функционалне супресије и непотпуног пригушивања низводних каскада [7,8]. Поред ове адаптивне биологије, генетичка варијабилност може да преобликује конформацију циљног протеина и ослаби везивање лиганда, доприносећи стеченој или инхерентној резистенцији. Овај изазов је добро документован код више гена повезаних са болестима и код различитих класа биолошких циљева [6], где су истакнути примери рецептор за епидермални фактор раста и андрогени рецептор [9,10].

Узето заједно, ове карактеристике одражавају основну премису и основно ограничење фармаколошког модела заснованог на окупираности циљних протеина која гласи да фармаколошка ефикасност зависи од одржавања довољног физичког везивања између лиганда и његовог циљног протеина током времена, што ће бити детаљније разматрано у наставку. У пракси, ово ослањање на окупираност сужава спектар доступних биолошких циљева и компликује напоре ка постизању дубоког, трајног клиничког ефекта у различитим групама пацијената [6]. Као последица тога, поље се све више окреће фармаколошким модалитетима и механизмима који излазе изван оквира пуке окупираности, трагајући за терапијским стратегијама које могу да обухвате шири, за болести релевантан део протеома, на начин који је и прецизан и дуготрајан.

1.2. Проширење терапијских приступа изван инхибиције

Конвенционални приступ усредсређен на инхибиторе еволуирао је појавом метода као што су блокирање екстрацелуларне сигнализације путем моноклонских антитела (mAbs) и деградација циљне иРНК технологијама интерференције РНК (RNAi) [11]. Кључна предност терапија заснованих на mAbs лежи у њиховом снажном афинитету везивања за специфичне биолошке циљеве, удруженом са продуженим полувременом елиминације, што се у великој мери приписује ендозомалном рециклирању [12]. Ове терапије се углавном користе за прекид екстрацелуларних интеракција између протеина или између протеина и лиганда. Ипак, mAbs имају значајна ограничења, укључујући немогућност пенетрације кроз ћелијске мембране [13], потребу за парентералном применом [14] и високе трошкове производње [15]. Насупрот томе, молекули који користе RNAi, као што су мале интерферирајуће РНК (siRNA), могу да пређу ћелијске мембране [16] и да испоље значајне фармаколошке ефекте на иРНК [17]. Захваљујући свом каталитичком механизму дејства, siRNA доводе до одрживе деградације иРНК, задржавајући ефикасност и при ниским дозама, будући да једна siRNA може деградирати више молекула иРНК [18]. Међутим, технологија RNAi ограничена је недовољном оралном биорасположивошћу [19], субоптималном фармакокинетиком [20] и ограниченом дистрибуцијом у ткива [21]. Алати генетичког инжењеринга попут CRISPR-Cas9 имају тенденцију ка продуженим циклусима развоја [22], иреверзибилни механизам дејства [23] и високе трошкове производње [24], што их чини мање погодним за одређене истраживачке примене.

Узевши у обзир ове карактеристике, постаје јасно да интеграција предности традиционалних инхибитора, mAbs, siRNA и CRISPR-Cas9 може довести до развоја готово идеалних терапијских агенаса. Такви молекули би били способни да делују на интрацелуларне и иначе фармаколошки недоступне (енг. *undruggable*) протеине, са високом селективношћу, оралном биорасположивошћу, широком дистрибуцијом у ткива (укључујући пенетрацију у централни нервни систем) и каталитичким механизмом дејства, што би омогућило снажне ефекте при ниским концентрацијама [25]. Међу новонасталим фармаколошким стратегијама, циљана деградација протеина (енг. *Targeted Protein Degradation*, TPD) издваја се по потенцијалу да испуни све наведене пожељне карактеристике [26].

Особине наведених фармаколошких модалитета резимиране су у Табели 1 [11,27–29].

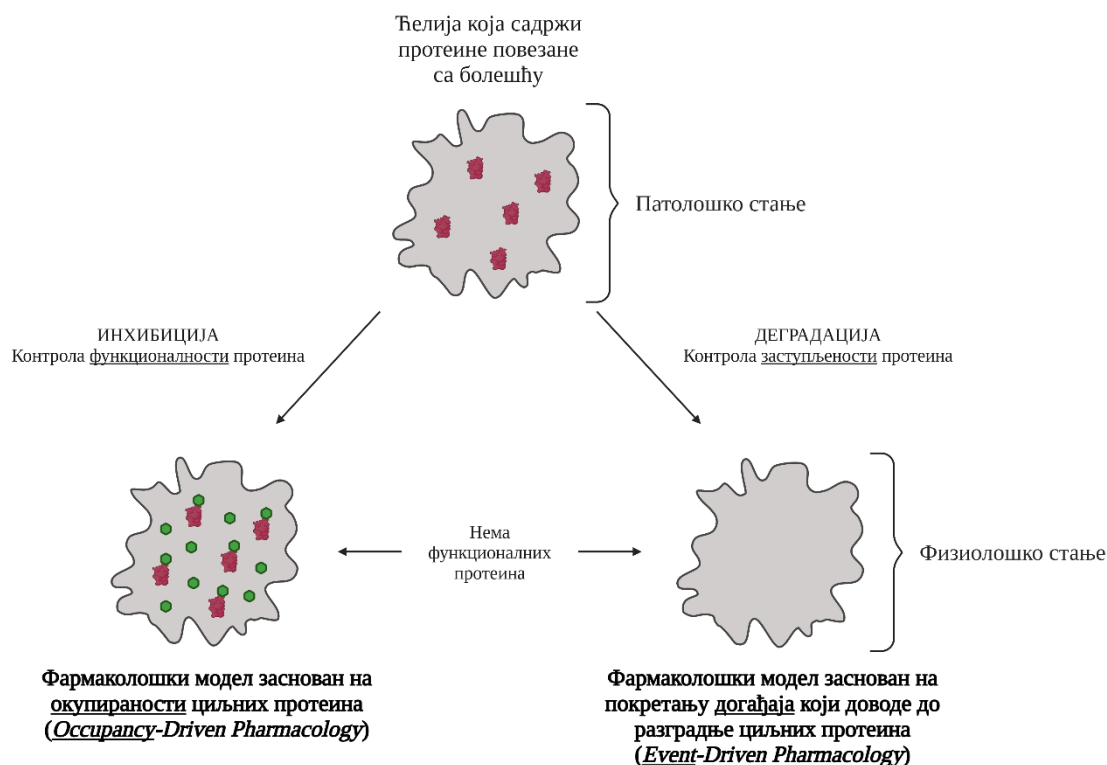
Табела 1. Својства пет различитих фармаколошких модалитета

Својство	Традиционални инхибитори	mAbs	siRNA	CRISPR-Cas9	TPD
Ефекат на интрацелуларне биолошке циљеве	Да	Не	Да	Да	Да
Системска дистрибуција	Да	Да	Не	Да	Да
Пенетрација у ткива	Да	Слаба	Слаба	Да	Да
Ефекат на скафолд протеине	Не	Да	Да	Да	Да
Елиминација патогених протеина	Не	Не	Да	Да	Да
Орална биорасположивост	Да	Не	Не	Не	Да
Способност постизања високе потентности и селективности	Слаба	Да	Да	Да	Да
Каталитички механизам дејства	Не	Не	Да	Да	Да
Пут примене	PO/IV/SC	IV/SC	IV/SC	IV/IM/IP	PO/IV/SC

PO – орална примена; IV – интравенска примена; SC – поткожна примена; IM – интрамускуларна примена; IP – интраперитонеална примена

1.3. Фармаколошки принципи традиционалних и нових терапија

Да би се разумела циљана деградација протеина, неопходно је разјаснити два фундаментална фармаколошка модела приказана на Слици 1: фармаколошки модел заснован на окупираности циљних протеина (енг. *Occupancy-Driven Pharmacology*, ODP) и фармаколошки модел заснован на покретању догађаја који доводе до разградње циљних протеина (енг. *Event-Driven Pharmacology*, EDP) [30].



Слика 1. Фармаколошки модели засновани на окупираности и покретању догађаја [29,31]

Почетак многих болести често је повезан са дисфункцијом специфичних протеина. Традиционално, овај проблем је решаван путем ODP модела. Конкретно, инхибитор, као терапеутик, *окупира* протеин повезан са болешћу, чиме блокира његову активност и на крају се добија терапијски исход. Обим овог терапијског ефекта директно је пропорционалан времену у којем је активност протеина инхибирана. Као што је већ истакнуто, постизање таквог ефекта обично захтева одржавање високих локалних концентрација инхибитора, што може довести до споредних интеракција и нежељених ефеката [4]. Нови, алтернативни приступ познат је као EDP. У овом приступу, лиганд иницира молекулски *догађај* који доводи до смањења нивоа протеина који изазива болест.

Укратко, ODP приступ огледа се у следећим принципима [30]:

- 1) Лиганд делује стехиометријски.
- 2) Лиганд мора да се веже за специфично место које директно утиче на функцију протеина.
- 3) У случају нековалентних инхибитора, лиганд може дисоцирати са свог везивног места, што на крају омогућава наставак функције протеина.
- 4) Селективност лиганда одређена је искључиво његовим карактеристикама везивања.

Супротно томе, EDP приступ функционише по напреднијем скупу принципа [30]:

- 1) Лиганд делује субстехиометријски.
- 2) Лиганд не мора нужно да се веже за место које директно модулира функцију протеина.
- 3) Лиганд индукује деградацију протеина, па је за враћање функције протеина неопходна његова *de novo* синтеза.
- 4) Селективност лиганда условљена је факторима који превазилазе сам профил везивања.

Бројни терапијски приступи засновани на EDP приступу развијени су до данас, при чему је PROTAC (енг. *Proteolysis-Targeting Chimera*) технологија један упечатљив пример који ће бити детаљније образложен.

1.4. Циљана деградација протеина

Циљана деградација протеина омогућава уклањање протеина релевантних за болест уместо једноставне инхибиције њихове функције. За разлику од класичних инхибитора мале молекулске масе који се ослањају на ODP концепт, TPD користи EDP механизме како би се индуковала протеолиза путем ендогених ћелијских система. Овај приступ нуди значајне предности, укључујући каталитичку разградњу протеина од интереса (ПОИ), могућност модулације не-ензимских или фармаколошки недоступних протеина и мање фреквантан режим дозирања услед одрживе деградације протеина [30]. У сржи TPD налазе се молекули који преузимају или имитирају природне сигнале за деградацију протеина.

Један од најважнијих аспеката TPD јесте способност дејства на протеине који су раније сматрани фармаколошки недоступнима у оквиру класичне фармакологије. Традиционални инхибитори мале молекулске масе делују кроз окупирање активних или алостерних места, што их суштински ограничава на ензиме са приступачним џеповима за везивање. Међутим, већина људског протеома – процењује се више од 80% – нема такве карактеристике, укључујући транскрипционе факторе, скафолд протеине и структурне комплексе [11]. TPD заобилази ова ограничења ослањајући се на EDP модалитет. Уместо инхибиције функције, TPD технологије оркестрирају физичко уклањање целог циљног протеина из ћелије. То не само да елиминише све функционалне улоге протеина – ензимске или не – већ и спречава компензаторну сигнализацију која често подрива инхибицију [32,33]. На пример, транскрипциони фактори, као што су STAT3 и Мус, дуго су сматрани недостижним циљевима због недостатка ензимске активности и дубоко укопаних места за везивање ДНК [34–36]. Ипак, TPD приступ је довео до њихове селективне деградације и супресије низводне онкогене сигнализације [37,38]. То отвара путеве у онкологији и имунотерапији тамо где конвенционални инхибитори заостају. Штавише, пошто је деградација по природи каталитичка, TPD молекули могу постићи ефикасност при нижим концентрацијама, смањујући системску токсичност [39]. Поред тога, TPD приступ може неутралисати патогене протеине који одолевају инхибицији због мутација, јер деградација заобилази ензимске механизме резистенције [40]. Компензаторна активација путева, као још један велики изазов, често се јавља када је инхибиција ПОИ делимична или реверзибилна, омогућавајући преусмеравање сигнализације [41]. Предност TPD концепта огледа се у потпуном уклањању кључних чворова ових сигналних мрежа, чиме се смањује резистенција условљена преклапањем биолошких функција.

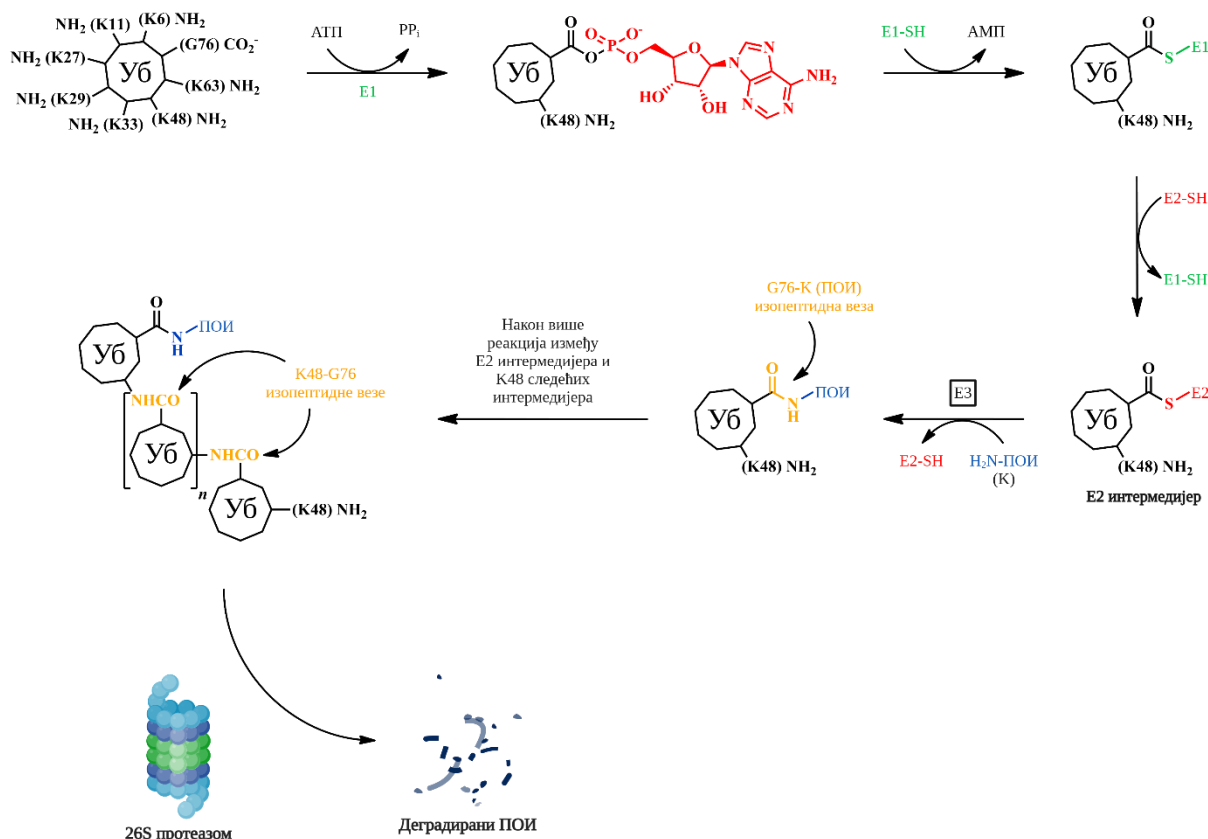
Укратко, проширујући опсег фармаколошки доступних биолошких циљева, TPD не само да комплементира постојеће модалитете већ их и унапређује. Јединствени механизам овог приступа, заснован на уклањању протеина, пружа нови план за превазилажење структурних и функционалних ограничења традиционалног развоја лекова (Табела 2).

Табела 2. Изазови традиционалних инхибитора у односу на предности TRD

Изазови традиционалних инхибитора	Предност TRD
Потреба за континуираном окупираношћу биолошког циља	Могућност одрживе деградације протеина
Ограничени на модулацију активних места	Деградација целог протеина, независно од каталитичке функције
Токсичност услед високих доза и последичног споредног дејства	Ниже дозе довољне за ефикасност, мање нежељених ефеката
Резистенција услед мутација биолошких циљева	Елиминација протеина у целости, заобилазећи компензаторни одговор
Неефикасност против скафолд или регулаторних протеина	Приступ фармаколошки недоступним протеинима без активних места

1.5. Убиквитин-протеазом систем као основа циљане деградације протеина

Убиквитин-протеазом систем (УПС) представља примарни пут за интрацелуларну деградацију протеина у еукариотским ћелијама [42] и заснива се на посттранслационој модификацији протеина путем убиквитинације (Слика 2). Убиквитин је еволутивно очуван полипептид од 76 аминокиселина. Након убиквитинације, циљни протеини бивају препознати и разграђени у 26S протеазому. Механистички, убиквитинација се одвија кроз трослојну ензимску каскаду коју чине следећи ензими: E1 (ензими за активацију убиквитина), E2 (ензими за конјугацију убиквитина) и E3 (убиквитин лигазе) [43]. То је хијерархијски систем у коме људски геном кодира два E1 ензима, око 40 E2 ензима и више од 600 E3 лигаза [44–46], што одражава разноликост супстрата и исхода.



Слика 2. Убиквитин-протеазом систем (К-остаци на свим убиквитинима, осим на првом, изостављени су ради прегледности) [29,47]

1.5.1. E1 ензими: активација убиквитина

Каскада почиње E1 ензимима, који катализују активацију убиквитина зависну од аденозин-трифосфата (АТФ). У првом кораку долази до преноса АМП-а на C-терминални глицин (G76) убиквитина, чиме настаје интермедијер убиквитин-АМП. Потом се активирани убиквитин преноси на каталитички цистеин E1 ензима, формирајући високоенергетску тиоестарску везу. Овим се убиквитин припрема за накнадни пренос на E2 ензим. Иако људски геном кодира мали број E1 ензима, њихова функција је суштинска и строго регулисана. На пример, UBA1 и UBA6 су примарни E1 ензими за канонску убиквитинацију [48], док су други специфични за модификаторе сличне убиквитину (енг. *ubiquitin-like modifiers*). Ниска редундантност E1 ензима вероватно делује као регулатор који контролише проток кроз убиквитински пут [49].

1.5.2. E2 ензими: конјугација убиквитина

Након активације, убиквитин се транстиоестерификацијом преноси са E1 на каталитички цистеин E2 ензима, такође стварајући тиоестарску везу. E2 ензими представљају централна чворишта за пренос убиквитина, јер интеракцијом са различитим E3 лигазама одређују специфичност супстрата и тип полиубиквитинског ланца [50]. Код човека постоји приближно 40 E2 ензима [45], од којих сваки има преференце за одређене E3 лигазе и типове повезивања (нпр. K48 или K63) [51]. Њихова архитектура, често са очуваним UBC (енг. *ubiquitin-conjugating*) доменом, омогућава прецизну регулацију интеракција. Поједини E2 ензими имају додатне регулаторне регионе или докинг мотиве који модулишу формирање комплекса са E3 лигазама [52]. E2 ензими утичу не само на ефикасност, већ и на топологију убиквитинских ланаца, чиме одређују да ли ће супстрат бити усмерен ка протеазомалној деградацији, ендоцитози или регулацији сигнализације [53].

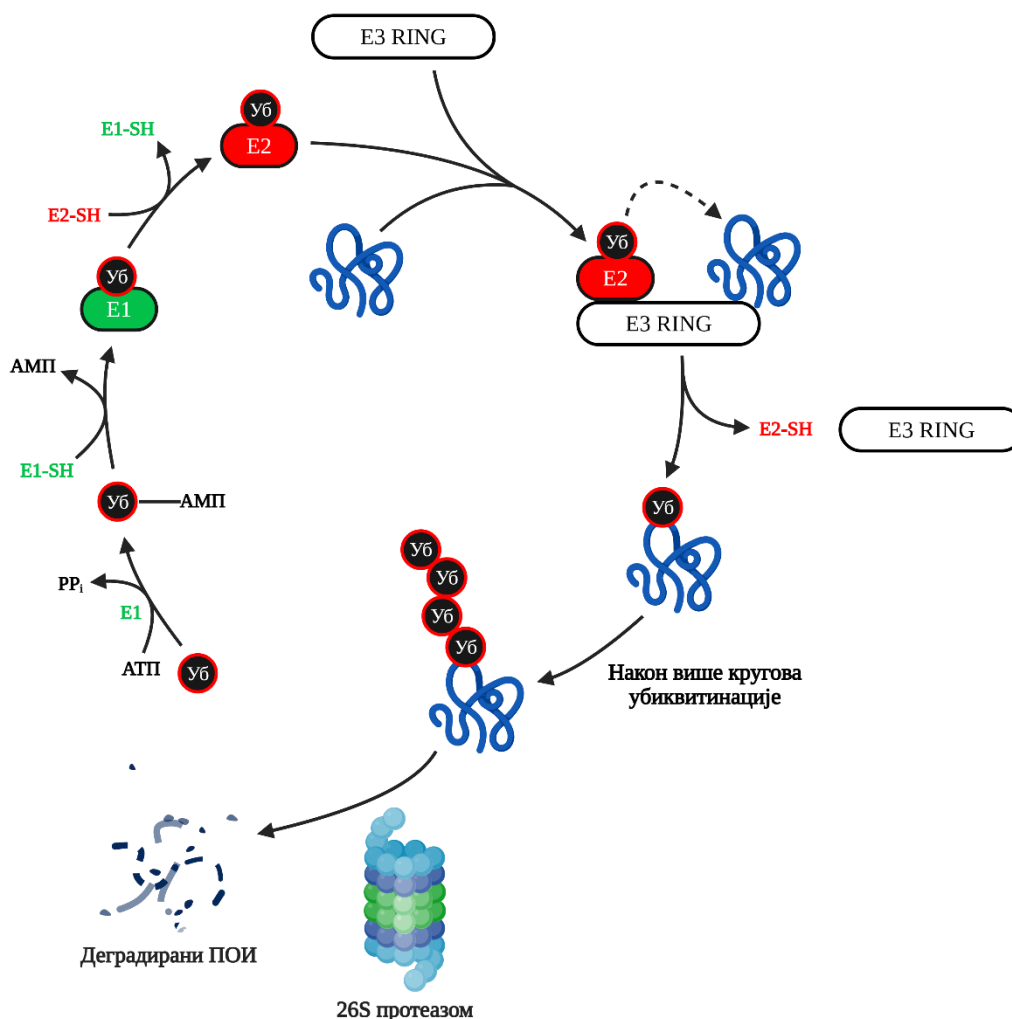
1.5.3. E3 лигазе: завршни пренос убиквитина

E3 убиквитин лигазе катализују завршни и уједно најкритичнији корак у каскади убиквитинације, делујући као кључни фактори специфичности који обележавају одабране протеине за разградњу. Ови ензими посредују у преносу убиквитина са E2 ензима на лизински остатак циљног протеина. E3 лигазе обезбеђују специфичност према супстрату тако што делују као адаптери који истовремено везују и E2~убиквитин конјугат и протеин супстрат. Изопептидна веза која се формира у овом кораку повезује карбоксилну групу G76 остатка убиквитина са ϵ -амино групом лизина на супстрату. Код човека, E3 лигазе чине изузетно бројну и разнолику фамилију ензима, при чему геном кодира више од 600 E3 лигаза [46]. Ова велика разноликост стоји у оштром контрасту са малим бројем E1 ензима и неколико десетина E2 ензима, што одражава потребу за прецизним препознавањем супстрата. E3 лигазе типично препознају специфичне аминокиселинске мотиве или посттранслационе модификације, често назване „дегрони“, на циљним протеинима, и то директно или посредством адаптерских подјединица, чиме одређују који протеини ће бити убиквитинисани. На основу разлика у архитектури домена и каталитичком механизму, хумане E3 лигазе се широко класификују у три главне фамилије: RING, NECT и RBR. Мала подгрупа E3 лигаза која садржи *U-box* домен сматра се варијантом RING класе. Свака од ових класа користи различит начин преноса убиквитина.

RING E3 лигазе

RING-тип E3 лигазе (енг. *Really Interesting New Gene*) представља најзаступљенију фамилију [54]. Садржи RING домен који координише јон цинка (или структурно сличан *U-box* домен који не садржи цинк) [55] и који се везује за E2 ензим конјугован са убиквитином. RING E3 лигазе превасходно делују као молекуларни скелети који доводе у контакт E2~убиквитин комплекс и супстрат, позиционирајући убиквитин повезан тиоестарском везом за директан трансфер на лизински остатак циљног протеина [56]. За разлику од других класа E3 лигаза, RING лигазе не формирају каталитички интермедијер убиквитина са њима самима – уместо

тога, убиквитин се директно преноси са Е2 ензима на супстрат без стварања Е3~убиквитин конјугата (Слика 3) [57].

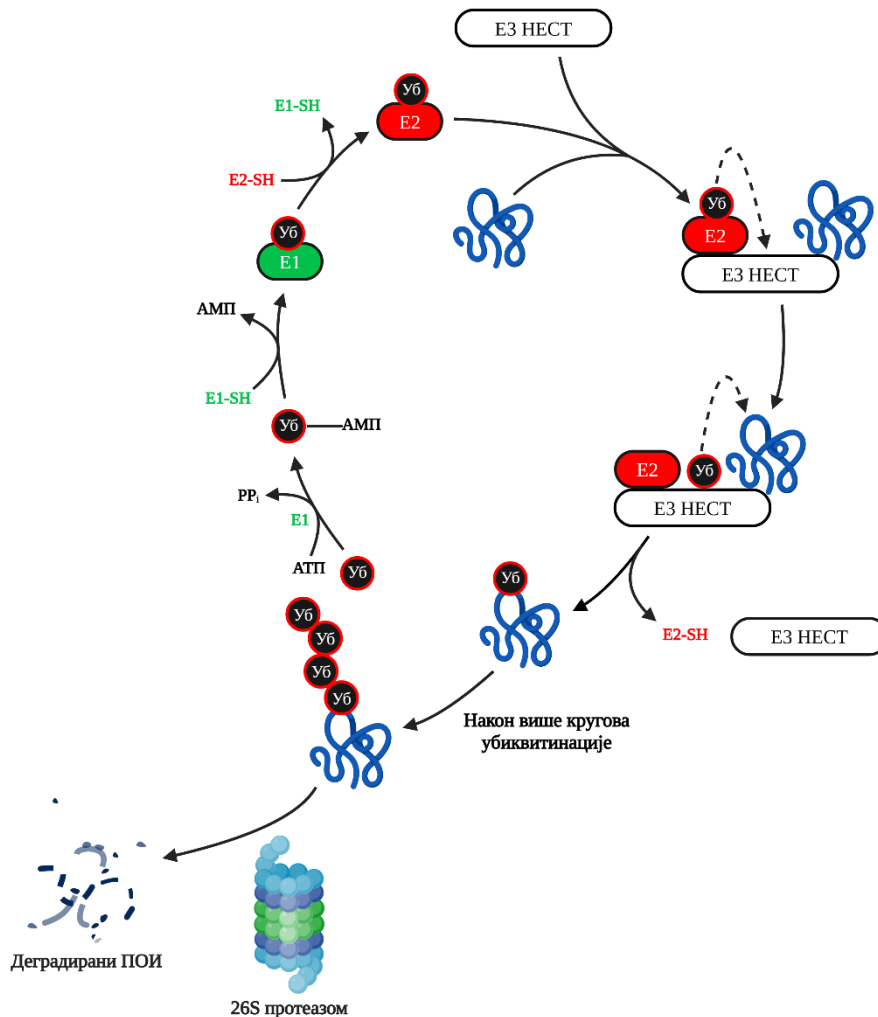


Слика 3. Шема убиквитинације протеина супстрата посредоване RING E3 лигазом

Многе RING E3 лигазе функционишу као мултимери или димери ради побољшања функционалности. На пример, кулин-RING лигазе (енг. *Cullin-RING Ligases*, CRLs) представљају велике асоцијације у којима кулин као скелет организује подјединицу RING домена (нпр. RBX1) и модул за препознавање супстрата (адаптер и рецепторски протеин, као што је *F-box* протеин у SCF комплексима) [58]. Анафаза-промовишући комплекс/циклозом (енг. *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*, APC/C) је још једна мултикомпонентна RING E3 лигаза изграђена од 19 подјединица укључујући скелет сличан кулину (APC2) и каталитичку RING подјединицу (APC11) [59]. Насупрот томе, RING лигазе које имају једну подјединицу садрже интегрисане домене који омогућавају и везивање за E2 ензим и препознавање супстрата у оквиру једног полипептида. Значајне мономерне RING E3 лигазе укључују MDM2 [60] (која се везује за p53 и убиквитинише га [61]) и c-CBL [62] (која делује на рецепторе тирозин-киназе [63]), док друге функционишу као димери (нпр. RING хетеродимер BRCA1-BARD1 [64]). Важно је нагласити да, пошто RING-тип лигаза сам не носи убиквитин као интермедијер, тип везе у полиубиквитинском ланцу који оне формирају углавном зависи од преференција придруженог E2 ензима [65].

НЕСТ Е3 лигазе

НЕСТ тип Е3 лигазе (енг. *Homologous to E6AP Carboxyl Terminus*) функционише путем двостепеног каталитичког механизма који се разликује од механизма RING Е3 лигаза. У првом кораку, молекул убиквитина се преноси са цистеина у активном месту Е2 ензима на активни цистеин унутар НЕСТ Е3 лигазе, при чему настаје пролазни Е3~убиквитин тиоестарски интермедијер. У другом кораку, убиквитин се пребацује са цистеина Е3 лигазе на лизин у протеину супстрату (Слика 4) [66].



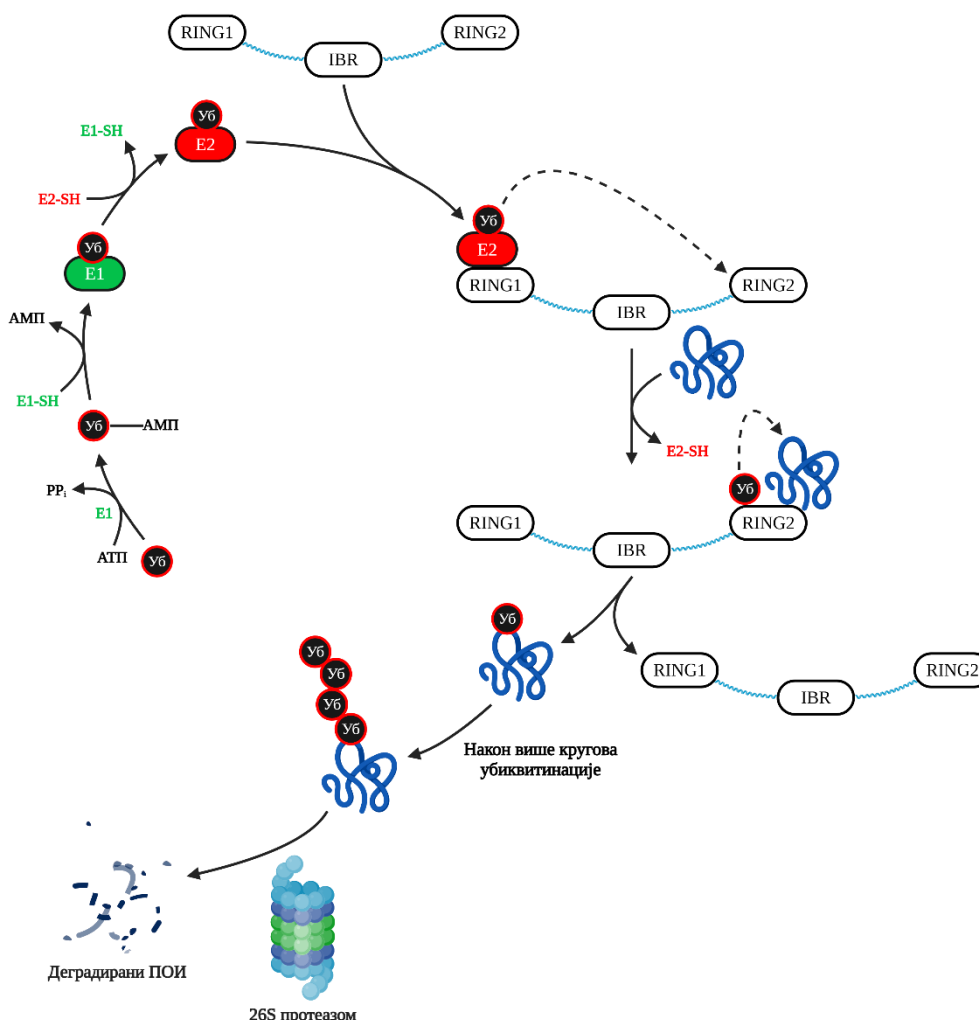
Слика 4. Шема убиквитинације протеина супстрата посредоване НЕСТ Е3 лигазом

Овај механизам је омогућен НЕСТ доменом – очуваним модулom од око 350 аминокиселина који се налази на *C*-терминусу Е3 лигазе и има јединствену билобалну архитектуру: *N*-терминални лобус који везује Е2~убиквитин и *C*-терминални лобус који садржи каталитички цистеин. Флексибилна структура између ова два лобуса омогућава конформационе промене које позиционирају *C*-лобус са убиквитином прво у непосредну близину Е2 ензима (ради прихватања убиквитина), а потом у близину супстрата ради коначног преноса убиквитина. Док НЕСТ домен изводи катализу, *N*-терминални региони НЕСТ лигаза омогућавају специфичност према супстрату и регулаторну контролу [67]. На основу својих *N*-терминалних мотива, хумане НЕСТ Е3 лигазе разврставају се у подфамилије. На пример, подфамилија NEDD4 (9 чланова) садржи више WW домена који препознају пролином богате мотиве на супстратима (често PPxY секвенце) [68] и *N*-терминални С2 домен који усмерава везивање за мембране [69].

Подфамилија HERC (6 чланова) разликује се по присуству једног или више RCC1-сличних домена [70]. Преостале НЕСТ лигазе (нпр. E6AP, HUWE1) садрже различите домене као што су цинк-прсти (енг. *zinc-finger*) [71] или WWE и UBA мотиви [72]. Ови додатни домени омогућавају НЕСТ лигазама да препознају специфичне супstrate или регулаторне протеине. НЕСТ E3 лигазе се често држе у аутоинхибираном стању услед интрамолекуларних интеракција и активирају се ћелијским сигнаlima онда када је убиквитинација потребна [73]. Значајне НЕСТ лигазе укључују NEDD4-1 (регулише промет мембранских протеина [74]), E6AP (укључена у дејство на p53 у присуству HPV E6 протеина [75]) и HUWE1 (велика НЕСТ лигаза која убиквитинише Мус [76], MCL-1 [72] и друге протеине).

RBR E3 лигазе

RBR лигазе (енг. *RING-Between-RING*, познате и као *RING-in-Between-RING*) представљају хибридную класу која комбинује карактеристике RING и НЕСТ механизма. Породица хуманих RBR лигаза је релативно мала (14 чланова), али функционално разноврсна [77]. Све RBR E3 лигазе имају карактеристичну архитектуру домена која се огледа у три узастопна домена способна за везивање цинка – названих RING1, IBR (енг. *In-Between RING*) и RING2 – који се заједно називају RBR модул [56] (Слика 5).



Слика 5. Шема убиквитинације протеина супстрата посредоване RBR E3 лигазом

RING1 домен представља канонски RING-прст домен који регрутује и везује E2~убиквитин конјугат, слично RING-типу E3 ензима [78]. Међутим, за разлику од правих RING E3 лигаза,

RBR лигазе у овој фази не омогућавају директан пренос убиквитина на супстрат. Уместо тога, оне изводе реакцију у два корака: RING2 домен садржи каталитички цистеин који прима убиквитин од E2 ензима, формирајући E3~убиквитин тиоестарски интермедијер, након чега се овај убиквитин преноси на супстрат [79]. IBR домен, смештен између RING1 и RING2 домена, добија структуру сличну RING2 домену, али нема каталитички цистеин [80]. Механистички, RBR лигазе су, стога, RING/HECT хибриди – RING1 координише преношење убиквитина на E3 ензим, а RING2 затим делује аналогно активном месту HECT E3 лигаза и довршава пренос убиквитина.

RBR ензими често садрже додатне домене изван језгра RBR модула који регулишу њихову активност или помажу у локализацији или препознавању супстрата. Многи од њих су аутоинхибирани сопственим доменима и захтевају активацију путем везивања протеина-партнера или фосфорилације. На пример, паркин, RBR лигаза чије су мутације повезане са фамилијарним обликом Паркинсонове болести [81], држи се у неактивном стању унутрашњим доменом сличним убиквитину [82] и постаје у потпуности активан тек након фосфорилације од стране PINK1 и везивања за фосфорилисани убиквитин [83]. Други пример је HOIP, каталитичка RBR подјединица комплекса LUBAC, која искључиво формира линеарне (M1-повезане) полиубиквитинске ланце на супстратима укљученим у NF- κ B сигнализацију [84]. У целини, иако малобројне, RBR лигазе уносе додатни слој комплексности у процес убиквитинације, често проширујући спектар архитектура убиквитинских ланаца који могу бити изграђени.

Сажетак главних класа ензима у убиквитинској каскади, са репрезентативним члановима и механистичким разликама, дат је у Табели 3.

Табела 3. Класификација и функционалне улоге кључних E1, E2 и E3 ензима

Класа ензима	Репрезентативни чланови	Кључна функција	Механизам
E1	UBA1, UBA6	Активација убиквитина	АТП-зависна аденилација и формирање тиоестра
E2	UBE2D, UBE2N	Конјугација убиквитина	Пренос тиоестра са E1
E3 (RING)	MDM2, CBL	Завршни пренос убиквитина	Доводе E2 и супстрат у близину
E3 (HECT)	NEDD4, E6AP	Формирање интермедијера убиквитина	Грађење тиоестра са E3 пре преноса на супстрат
E3 (RBR)	Паркин, HOIP	Секвенцијална RING/HECT активност	Два активна места

Топологија убиквитинских ланаца и усмеравање ка протеазому

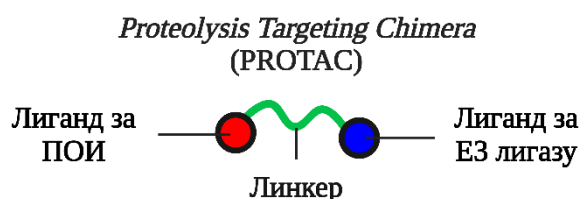
Убиквитин садржи више лизина (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) и N-терминални метионин (M1) који могу да се укључе у формирање ланаца [85], а било који од ових седам лизина може да служи као акцепторско место за формирање полиубиквитинских ланаца [86]. Поред селекције супстрата, E3 лигазе утичу и на тип његове убиквитинске модификације, што потом одређује његову судбину. Различите комбинације E3/E2 ензима преференцијално формирају одређене типове веза. Класични полиубиквитински ланци повезани преко K48 представљају главни сигнал за протеазомалну деградацију [87]. Ланац од четири или више K48-повезаних убиквитина на супстрату ствара ознаку високог афинитета која се препознаје од стране убиквитинских рецептора на 26S протеазому, усмеравајући означени протеин ка денатурацији (енг. *unfolding*) и протеолизи [88]. Ланци повезани преко K11, такође, превасходно сигнализирају деградацију путем 26S протеазома [89], док K63-повезани ланци [90–92] и M1-повезани (линеарни) ланци [93] типично не усмеравају протеине ка протеазому, већ

функционишу у процесима као што су сигнална трансдукција, поправка ДНК или ендоцитни транспорт. У складу са овим недеградационим улогама, К63-повезани ланци [94,95] и моноубиквитинација [96,97] учествују у ППИ, одговорима на оштећење ДНК и другим биолошким догађајима. Такође је важно напоменути да неки протеини пролазе кроз моноубиквитинацију (један убиквитин на једном лизину) [98] или мулти-моноубиквитинацију (по један убиквитин на више лизина) [99], али само полиубиквитинација доводи до протеазомалне деградације.

Е3 лигазе помажу у одређивању ових исхода бирајући одређене Е2 ензиме или путем геометрије својих каталитичких места. RING тип Е3 лигаза често се ослања на урођену преференцију Е2 ензима према одређеним типовима веза (на пример, удруживање са Ubc13 резултира формирањем К63 ланаца [100], док удруживање са Cdc34 [101] доводи до формирања К48 ланаца). Насупрот томе, НЕСТ и RBR Е3 лигазе имају директнију контролу над специфичношћу веза, јер убиквитин пролази кроз активно место Е3 лигазе. Многе НЕСТ и RBR лигазе преференцијално граде одређене типове ланаца у зависности од тога како њихово активно место или придружени домени оријентишу акцепторски убиквитин. На пример, RBR лигаза HOIP, у оквиру комплекса LUBAC, специфично генерише М1-повезане убиквитинске ланце [102], док неке НЕСТ лигазе (попут чланова NEDD4 фамилије) углавном формирају К63-повезане ланце укључене у сигнализацију [103]. На крају, одређивањем да ли ће супстрат бити означен К48 (или К11) ланцем који га усмерава ка протеазому или недеградационим типом везе, Е3 лигазе управљају судбином протеина у ћелијама.

1.6. PROTAC молекули

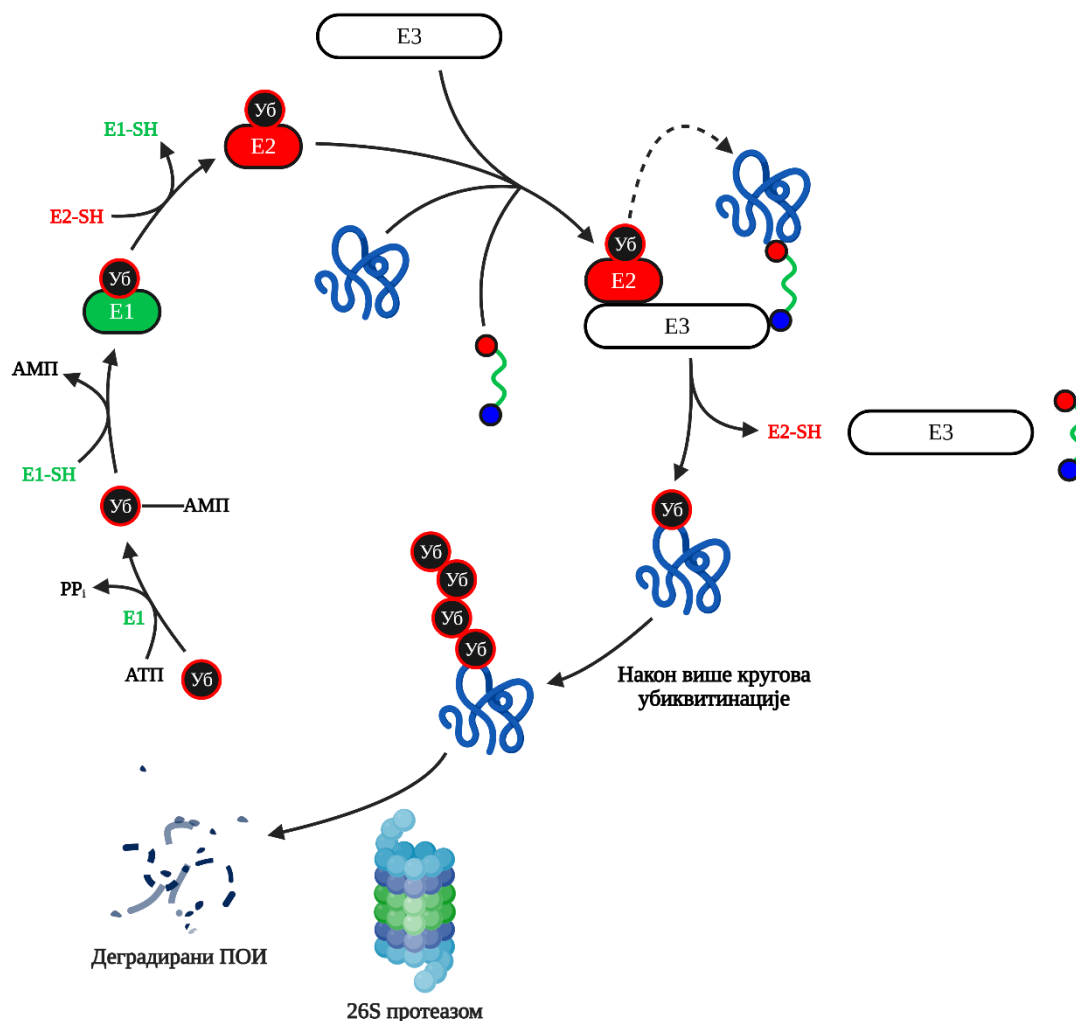
PROTAC молекули су хетеробифункционални мали молекули дизајнирани да усмере интрацелуларне протеине ка протеазомалној деградацији. За разлику од конвенционалних инхибитора који захтевају трајно везивање да би модулисали функцију протеина, PROTAC молекули делују каталитички искоришћавајући УПС да би протеин у потпуности био уклоњен. То омогућава наступ EDP фармаколошког модела – пролазно везивање за одговарајуће протеине које иницира дуготрајан низводни ефекат [30]. Типичан PROTAC молекул се састоји од три модуларне компоненте: лиганда који везује ПОИ, лиганда који регрутује Е3 убиквитин лигазу и линкера који их спаја (Слика 6).



Слика 6. Општа шематска представа PROTAC молекула. Лиганд за ПОИ је приказан црвеном бојом, линкер је приказан зеленом бојом и лиганд за Е3 лигазу је приказан плавом бојом. Ове боје биће доследно коришћене у читавом тексту ради означавања одговарајућих компоненти свих PROTAC молекула који ће бити представљени.

Након уласка у ћелију, PROTAC молекул посредује у формирању тернарног комплекса (ТК), позиционирајући циљни протеин у близину регрутоване Е3 лигазе. Овај вештачки комплекс имитира природне супstrate УПС-а, омогућавајући пренос молекула убиквитина са Е2-конјугујућег ензима на лизинске остатке ПОИ. Полиубиквитинација означава протеин за деградацију од стране 26S протеазома. Кључно је да се PROTAC молекул не троши током процеса – након обраде супстрата ослобађа се и може покренути нов круг формирања ТК-а.

Овакав каталитички начин дејства подупире ефикасност ових молекула и чини их делотворним чак и у субстехиометријским концентрацијама (Слика 7).



Слика 7. Механизам дејства PROTAC молекула [29,47]

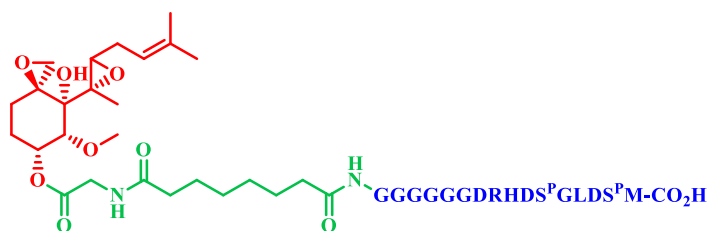
Пошто PROTAC молекул не бива деградиран током циклуса деградације ПОИ, његова судбина зависи од хемијских карактеристика [104]:

- 1) Нековалентни PROTAC молекули могу да се одвоје од ТК-а и иницирају поновљене циклусе деградације, делујући каталитички.
- 2) Када PROTAC молекул формира ковалентну везу са Е3 лигазом, а остаје нековалентно везан за ПОИ, и даље може деловати каталитички и омогућити више циклуса деградације.
- 3) PROTAC молекул који је ковалентно везан за ПОИ не може учествовати у накнадним циклусима деградације.
- 4) PROTAC молекули који се ковалентно, али реверзибилно везују за ПОИ или Е3 лигазу такође могу деловати каталитички.

1.6.1. Историјска позадина и еволуција PROTAC молекула

Идеја која стоји иза PROTAC молекула проистекла је из настојања да се на циљан начин искористи природна ћелијска машинерија за деградацију протеина. Научници су уочили да обележавање протеина убиквитином служи као сигнал за његово уништавање путем

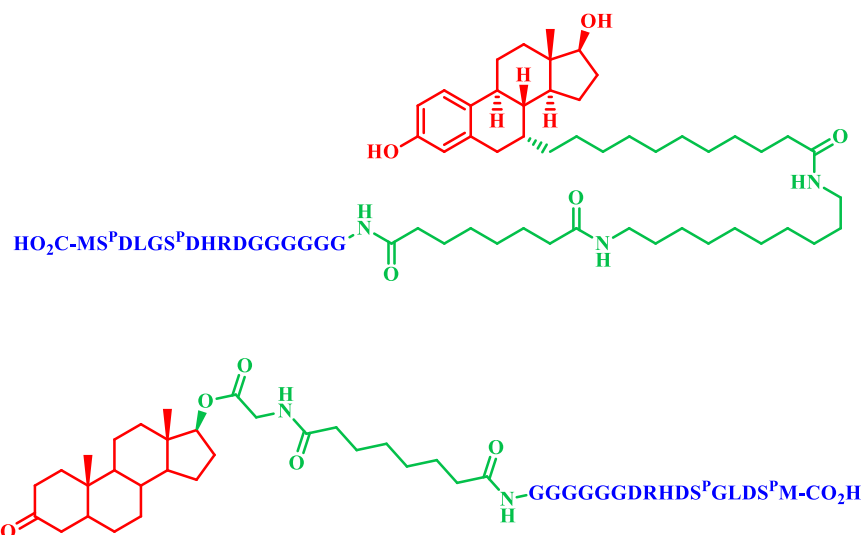
протеазома [105,106], као и да је убиквитинација диригована Е3 убиквитин лигазама које препознају специфичне мотиве у структури протеина [107,108]. Крајем 1990-их, хемијски биолози већ су показали да синтетички мали молекули могу индуковати блискост између два протеина (што је приказано на примеру бифункционалних лиганда, попут аналога рапамицина који димеризују протеине-партнере) [109]. Вођени овим сазнањима, истраживачи су настојали да створе бифункционалне молекуле који би регрутовали Е3 лигазу као одабраном ПОИ, изазивајући његову убиквитинацију и деградацију. Овај концепт први пут је остварен 2001. године, када су *Sakamoto* и сар. описали „химеру усмерену на протеолизу“ названу Protac-1 [110]. Protac-1 је представљао хетеробифункционални молекул састављен од два различита лиганда повезана линкером: један крај био је фосфопептидни миметик изведен из IкВа (секвенце која природно везује *F-box* протеин β -TRCP, адаптер Е3 убиквитин лигазе), док је други крај чинио мали молекул овалицин, који се ковалентно везује за ензим MetAP-2 (Слика 8). Истовременим везивањем за β -TRCP и MetAP-2, Protac-1 је био осмишљен тако да приближи MetAP-2 комплексу SCF ^{β -TRCP}, чиме би омогућио тој лигази да означи MetAP-2 убиквитином. У ћелијски независном систему, Protac-1 је заиста индуковао убиквитинацију и последичну протеазомалну деградацију MetAP-2, чиме је пружен доказ концепта да довођење циљног протеина у близину Е3 лигазе може покренути његову деградацију. Овај пионирски експеримент увео је термин „PROTAC“ и увео концепт који омогућава смањивање нивоа протеина помоћу химерних молекула. Дакле, *Sakamoto* и сар. указали су на аналогност ове стратегије са синтетичким молекулима за димеризацију који регулишу сигналне путеве индуковањем интеракција између протеина.



Слика 8. Хемијска структура првог описаног PROTAC молекула. Фосфорилисани серин означен је као „S^P“.

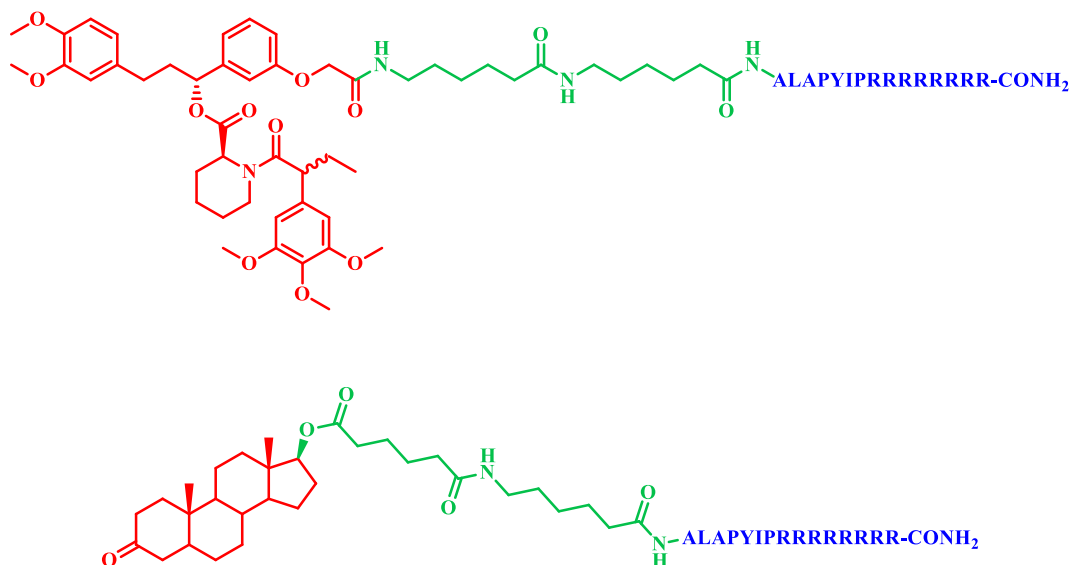
Иницијални пептидни PROTAC молекули и њихова ограничења

Након иницијалног молекула Protac-1, истраживачи су проширили овај приступ користећи пептидне елементе за регрутовање Е3 лигаза. У 2003. години, лабораторије *Crews*-а и *Deshai*-а показале су да PROTAC молекули могу деловати на интрацелуларне сигналне протеине као што су хормонски рецептори. Ови молекули су повезали исти IкВа фосфопептид (који се везује за β -TRCP) са познатим лигандима естрогеног рецептора (ER) и андрогеног рецептора (AR). У овим химерним молекулима, естрадиол је служио као део који се везује за ER, а дихидротестостерон као део који се везује за AR, при чему су били повезани линкером за фосфопептид. Добијени бифункционални молекули (Слика 9) успешно су индуковали убиквитинацију и деградацију ER-а и AR-а [111]. Ове студије доказале су да се PROTAC молекули могу применити на различите биолошке циљеве заменом лиганда за ПОИ.



Слика 9. Хемијске структуре PROTAC молекула који делују на ER (горња структура) и AR (доња структура). Фосфорилисани серин означен је као „S^P“.

Главна препрека за ове ране PROTAC молекуле била је ћелијска пермеабилност. PROTAC молекули прве генерације ослањали су се на крупне пептидне сегменте за регрутовање E3 лигаза, што је спречавало ефикасан улазак у ћелију. Године 2004. *Schneekloth* и сар. развили су први пермеабилан PROTAC молекул увођењем модификације која омогућава улазак у ћелију. Дизајнирали су PROTAC молекул који регрутује фон Хипел-Линдау (VHL) E3 лигазу користећи кратак пептид (ALAPYIP) познат по везивању за VHL и повезали су га са лигандом за циљни протеин (у њиховом случају, коришћени су лиганди за деловање на AR и FKBP12 протеине, Слика 10). Кључно је да су ови PROTAC молекули садржали поли-*D*-аргинин ознаку на крају пептида како би се омогућила мембранска транслокација и спречила протеолиза унутар ћелије. Са овом модификацијом, PROTAC молекули су били у стању да уђу у ћелије и индукују деградацију AR и FKBP12 протеина [112].

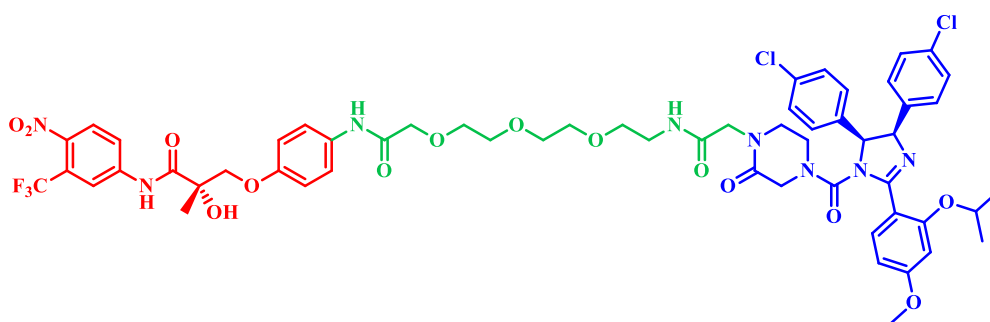


Слика 10. Хемијске структуре PROTAC молекула који делују на FKBP12 (горња структура) и AR (доња структура)

Ови пептидни PROTAC молекули били су пионирски примери који су валидирани циљану деградацију протеина у *in vitro* условима. Међутим, имали су неповољне физичко-хемијске особине карактеристичне за пептиде, пре свега велику моларну масу и поларни карактер који доводе до слабе ћелијске пермеабилности, као и синтетичку комплексност приликом добијања крупних бифункционалних молекула. Иако су пептидни PROTAC молекули биолошки компатибилни и релативно нетоксични, немогуће је занемарити ограничену ћелијску пермеабилност и синтетички изазов који проистиче из велике моларне масе ових конструктора. Слаб улазак у ћелију значио је да су биле потребне релативно високе концентрације, а *in vivo* примена била је ограничена брзим клиренсом и слабом оралном биорасположивошћу – изазовима који су захтевали нови правац у дизајну PROTAC молекула.

PROTAC молекули мале молекулске масе

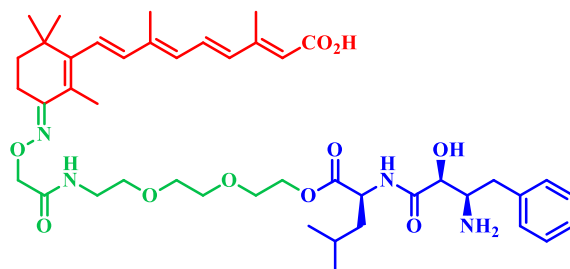
Да би превазишли ограничења молекула заснованих на пептидима, научници су средином 2000-их почели проучавање PROTAC молекула који су у потпуности сачињени од малих молекула. Кључни корак било је идентификовање малих, леколиких (енг. *drug-like*) лиганда који могу да се вежу за Е3 лигазе, замењујући гломазне пептиде. Откривен је низ малих молекула који препознају Е3 лигазе, укључујући лиганде за MDM2, cIAP1 и друге. Један од првих значајних успеха постигла је лабораторија Crews-а 2008. године. Створен је PROTAC молекул у потпуности састављен од малих молекула повезивањем лиганда за AR са лигандом за Е3 убиквитин лигазу MDM2. Конкретно, употребљен је селективни модулатор андрогеног рецептора (енг. *Selective Androgen Receptor Modulator*, SARM) као фрагмент који се везује за AR и једињење нутлин (познати мали молекул и инхибитор интеракције p53-MDM2) као фрагмент који се везује за Е3 лигазу, који су повезали кратким полиетилен-гликолским (ПЕГ) линкером (Слика 11). Овај SARM-нутлин молекул био је први PROTAC молекул у потпуности заснован на малим молекулима и показао је изразито побољшање ћелијске активности. У ћелијским тестовима, бифункционални молекул је успешно регрутовао MDM2 ка AR-у и индуковао протеазомалну деградацију AR-а, нешто што су претходни пептидни PROTAC молекули постигали само са тешкоћом. Ово је потврдило да мали молекул у облику химерног конструктора може ефикасно елиминисати циљни протеин [113]. Добијени резултат представљао је значајну прекретницу, показујући да велики пептиди нису строго неопходни за регрутовање Е3 лигаза. Адекватно изабран мали молекул могао је да изврши ту улогу, омогућивши PROTAC молекулима знатно мању моларну масу, као и својства која су ближа карактеристикама лекова.



Слика 11. Хемијска структура првог PROTAC молекула мале молекулске масе усмереног на AR

У исто време, истраживања у Јапану довела су до сличне стратегије познате као SNIPER молекули (енг. *Specific and Non-Genetic IAP-Dependent Protein Erasers*). Уместо да користе MDM2 или VHL, SNIPER молекули регрутују Е3 лигазу cIAP1. Први SNIPER молекул, који су описали Itoh и сар. 2010. године, имао је мали молекул метил-бестатин, као лиганд који се везује за cIAP1, повезан са дериватом *all-trans* ретиноинске киселине, који се везује за

CRABPII (енг. *Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II*) (Слика 12). Овај химерни молекул ефикасно је индуковао убиквитинацију и селективну деградацију CRABPII у ћелијској култури [114]. Важно је напоменути да је сам метил-бестатин познат по томе што индукује ауто-убиквитинацију cIAP1 [115]. Комбиновањем овог лиганда са лигандом за биолошки циљ, истраживачи су преусмерили убиквитинациону активност cIAP1 ка CRABPII. SNIPER приступ показао је да је могуће регрутовати више различитих E3 лигаза малим молекулима, чиме се проширује репертоар изван првобитно коришћених β -TRCP и MDM2.



Слика 12. Хемијска структура PROTAC молекула усмереног на CRABP

Успех ових иницијалних PROTAC молекула мале молекулске масе подстакао је велики број открића лиганата који се везују за E3 лигазе. Почетком 2010-их истраживачи су идентификовали лиганде мале молекулске масе за многе E3 лигазе, укључујући не само MDM2 и cIAP1 већ и VHL, CRBN и различите DCAF протеине. То је отворило пут ери PROTAC молекула мале молекулске масе, у којој оба дела PROTAC молекула могу бити мали органски молекули. PROTAC молекули засновани искључиво на малим молекулима генерално су показивали знатно побољшана физичко-хемијска и фармакокинетичка својства. Ефикасно су продирали у ћелије и могла им се оптимизовати стабилност, па чак и орална биорасположивост, што није било могуће са иницијалним пептидним PROTAC молекулима.

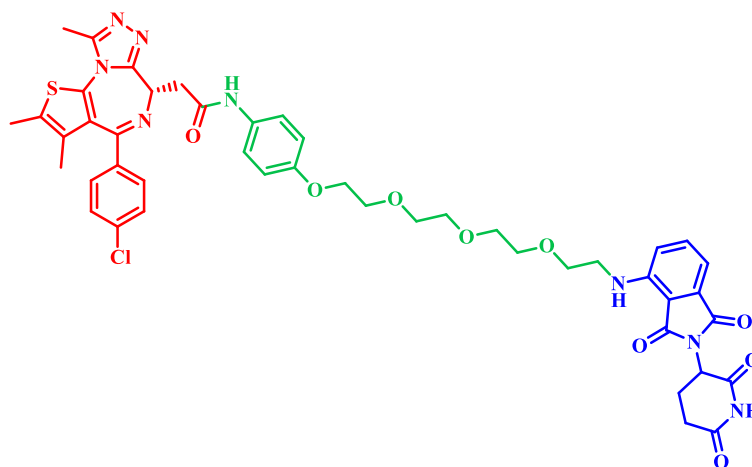
Проширивање репертоара E3 лигаза: лиганди за CRBN и VHL

Два догађаја су посебно значајна за дизајн PROTAC молекула током 2010-их година: коришћење лигазе цереблон (CRBN) путем деривата талидомида и откриће синтетичких лиганата високог афинитета за VHL. Ови напреси омогућили су истраживачима да добију робусне модуле за регрутовање E3 лигаза који су у потпуности засновани на малим молекулима.

CRBN и PROTAC молекули засновани на имуномодулаторним лековима

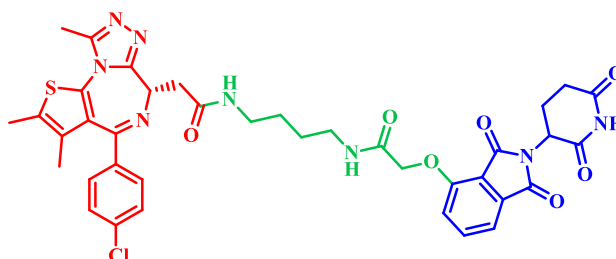
Талидомид, лек са трагичном историјом као тератоген [116], је поново ушао у сферу интересовања 2010. године као једињење које се веже за протеин цереблон, рецептор за супстрат CUL4-RBX1-DDB1-CRBN комплекса E3 убиквитин лигазе [117]. Убрзо након тога, откривено је зашто талидомид изазива тако драматичне биолошке ефекте. Наиме, када је везан за CRBN, талидомид, као и његови аналози леналидомид и помалидомид, индукују регрутовање и убиквитинацију одређених транскрипционих фактора са цинк-прст доменима (нарочито лимфоидних фактора IKZF1 и IKZF3), обележавајући их за деградацију [118]. Медицински хемичари су брзо препознали да се аналози талидомида, често називани имуномодулаторним лековима (енг. *Immunomodulatory Drugs*, IMiDs), могу пренаменити као елемент за везивање E3 лигазе у PROTAC молекулима. Лабораторија Crews-а и други истраживачи прихватили су ову идеју и до 2015. године приказали потентне PROTAC молекуле засноване на CRBN-у. Репрезентативан пример био је ARV-825 (Слика 13), бифункционални молекул који повезује помалидомид са инхибитором бромодомена OTX015 да би се деловало

на BRD4, транскрипциони коактиватор. ARV-825 је могао ефикасно да деградира BRD4 у ћелијама карцинома при субмикромоларним концентрацијама [119].



Слика 13. Хемијска структура ARV-825

Отприлике у истом периоду, *Winter* и сар. обелоданили су сличан деградер, означен као dBET1 (Слика 14), који, такође, садржи помалидомид и лиганд за бромодомене BET протеина, али другачији линкер. Овај молекул је на сличан начин довео до брзе деградације BRD4 у ћелијама леукемије [120].



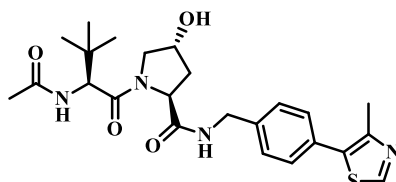
Слика 14. Хемијска структура dBET1

Захваљујући високом афинитету IMiD молекула према CRBN-у и њиховој ћелијској пермеабилности, PROTAC молекули који регрутују CRBN постигли су снажну деградацију различитих класа протеина (киназа, транскрипционих фактора, итд.) и показали обећавајућу активност *in vivo*. Заправо, PROTAC молекули засновани на IMiD лигандима били су међу првима који су ушли у животињске моделе, а касније и у клиничка испитивања.

Лиганди за VHL и PROTAC молекули засновани на VHL-у

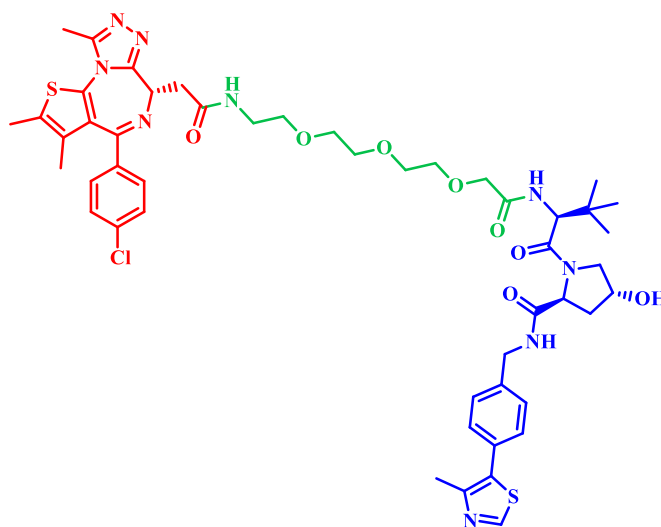
Тумор-супресорски протеин фон Хипел-Линдау представља подјединицу за препознавање супстрата у комплексу Е3 лигазе CUL2-RBX1-*Elongin B/C*-VHL [121,122] који усмерава ка деградацији хипоксијом-индуковани фактор-1 α (енг. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* , HIF-1 α) [123–125]. VHL је представљао привлачну Е3 лигазу за регрутовање јер је његова биологија била добро позната, али је у почетку био доступан само пептидима (попут ALAPYIP/HIF пептида коришћеног 2004. године). Напредак је остварен 2012. године, када су тимови *Crews*-а и *Ciulli*-а идентификовали прве лиганде мале молекулске масе који се везују за везивни цеп VHL-а за HIF-1 α . Скринингом и дизајном заснованим на структури (енг. *Structure-Based*

Design), открили су фамилију малих молекула који садрже хидроксипролин (инспирисани кључним хидроксипролином у мотиву HIF-1 α), а који могу да имитирају интеракцију HIF пептида са VHL-ом [126,127]. Иницијални лиганд за VHL имао је само микроларни афинитет, али је оптимизација у домену медицинске хемије довела до лиганда друге генерације са наномоларним афинитетом познатог под називом VH032 (Слика 15). Ово достигнуће сматрано је прекретницом у развоју PROTAC технологије, јер је омогућило конструисање PROTAC молекула заснованих на VHL-у који су били у потпуности мали молекули и високо потентни. *Ciulli* и сар. добили су ко-кристалну структуру комплекса VH032-VHL, пруживши детаљан оквир за повезивање овог лиганда са различитим лигандима за циљне протеине [128].



Слика 15. Хемијска структура VH032

Године 2015. обелодањен је први такав PROTAC молекул, назван MZ1 (Слика 16), који је повезивао VH032 са инхибитором BET протеина. MZ1 је селективно деградирао BRD4 у односу на блиско сродне BRD2 и BRD3, показујући да PROTAC молекули могу постићи селективност која превазилази селективност самог лиганда за циљни протеин [129].



Слика 16. Хемијска структура MZ1

Још значајнија била је кристална структура ТК-а BRD4-MZ1-VHL одређена X-зрацима коју су 2017. године решили *Gadd* и сар. Структура је открила да MZ1 делује као молекулски „лепак“ између VHL-а и BRD4 и, што је посебно занимљиво, да индукује нове интеракције између ова два протеина које не постоје у одсуству PROTAC молекула [130]. Ова појава кооперативног везивања показала је да добро дизајниран PROTAC молекул може стабилизovati ТК тако да целина постаје функционално супериорна у односу на збир њених делова.

Проширивањем репертоара Е3 лигаза на CRBN, VHL, MDM2, cIAP1 и друге, истраживачи су отворили могућност деградације све ширег спектра протеина. Многи протеини који су раније

сматрани фармаколошки недоступним (на пример скафолд протеини или транскрипциони фактори који немају јасно дефинисане цепове за везивање) сада су постали потенцијалне мете PROTAC молекула, јер је за деградацију довољно пронаћи лиганд који се веже за било који погодан регион на циљном протеину. Ова промена значајно је проширила могућности у области откривања нових лекова, јер PROTAC молекули не захтевају функционалну инхибицију циљног места. Током касних 2010-их година повећавао се репертоар лиганата за E3 лигазе (укључујући KEAP1, DCAF15, DCAF16 и друге), као и разноврсност биолошких циљева за које је показано да могу бити деградирани PROTAC молекулима.

PROTAC молекули као терапијски модалитет

Оно што је 2001. године започело као биохемијски алат, током две деценије се развило у обећавајућу терапијску стратегију. До 2020. године, деградери протеина прешли су пут од академских лабораторија до клинике, при чему је више фармацеутских компанија инвестирало у развој PROTAC молекула. Један од првих PROTAC молекула у клиничкој фази био је ARV-110 (бавдегалутамид), деградер усмерен ка AR-у за лечење карцинома простате, који је развила компанија *Arvinas*. ARV-110 је ушао у клиничка испитивања 2019. године [131], а затим је 2020. године уследио ARV-471 (вепдегестрант), деградер ER α намењен лечењу карцинома дојке [132]. Иницијални клинички подаци показали су да ови PROTAC молекули могу да постигну прихватљив безбедносни профил и изложеност, уз доказе о делотворности на циљни протеин. На пример, ARV-110 је изазвао пад вредности простата-специфичног антигена код дела пацијената са карциномом простате [133–135]. До краја 2022. године, најмање 20 PROTAC молекула доспело је до клиничких испитивања у различитим индикацијама, укључујући деградере AR, ER, BTK, IRAK4, STAT3, BCL-X_L, EGFR и других биолошких циљева.

Кључне прекретнице у развоју PROTAC технологије представљене су на Слици 17.



Слика 17. Кључне прекретнице у развоју PROTAC технологије, приказујући еволуцију PROTAC молекула од конструктора заснованих на пептидима до дизајна који се у потпуности заснива на малим молекулима

1.6.2. Функције структурних елемената PROTAC молекула

Као што је већ наведено, PROTAC молекули су модуларни мали молекули чију архитектуру чине три компоненте: лиганд за ПОИ, линкер који обезбеђује структурну и просторну флексибилност и лиганд који регрутује E3 убиквитин лигазу. Свака од ових компоненти је важна за формирање и стабилизацију ТК-а неопходног за убиквитинацију и деградацију протеина. Успешан дизајн PROTAC молекула ослања се на синергију ових елемената, а не само на појединачне афинитете [136].

Лиганд за ПОИ

Лиганд који везује ПОИ најчешће је изведен из познатих инхибитора, супстрата или високоафинитетних лиганата идентификованих скринингом фрагмената или рационалним дизајном. Он мора да задржи специфичност везивања, али и да омогући везивање линкера на месту које не нарушава интеракцију са ПОИ. Показано је да дериватизација на позицијама изложеним растварачу одржава везивање, док коришћење унутрашњих или дубоких тачака везивања често доводе до стерних сметњи и губитка афинитета. Фармакодинамички услов није апсолутна инхибиција ПОИ, већ представљање протеина у геометрији повољној за регрутовање Е3 лигазе. Стога, чак и лиганди умереног афинитета могу бити делотворни ако настали ТК показује кооперативност [137]. Селективност PROTAC молекула није одређен искључиво профилем везивања лиганата за ПОИ. Формирање ТК-а и регрутовање Е3 лигазе такође значајно утичу на коначну селективност деградације посредоване PROTAC молекулом [138].

Архитектура линкера

Ефикасност деградације посредоване PROTAC молекулима зависи не само од афинитета лиганата према ПОИ и Е3 убиквитин лигази, већ и од њихове међусобне усаглашености и својстава линкера. Ови фактори заједно управљају формирањем ТК-а, полиубиквитинацијом ПОИ и накнадном деградацијом [27,139]. Утврђено је да хемијски састав и дужина линкера снажно утичу на формирање ТК-а, интензитет деградације и селективност. У том смислу, линкер није пасивни конектор, већ подесив структурни елемент који значајно одређује геометрију ТК-а, кооперативност и интрацелуларно понашање [140]. Кључни параметри дизајна су дужина, ригидност, поларност и оријентација лиганата. Прекратак линкер може онемогућити формирање ТК-а, док предугачак повећава ентропију и повећава ризик од споредних ефеката. Оптималан линкер постиже равнотежу између флексибилности и конформационог ограничења, подстичући продуктиван однос између Е3 лигазе и ПОИ. Важно је да се специфичност према супстрату понекад може модулисати већ самим мењањем дужине или положаја везивања линкера [141]. Линкери такође учествују у специфичним интеракцијама унутар ТК-а и тиме доприносе позитивној кооперативности при њиховом настанку [130,142]. Ове појаве се могу искористити за дизајн PROTAC молекула који постижу изоформску селективност међу структурно сродним ПОИ [143], као и за повећање привидног афинитета према ПОИ чак и када сам лиганд за ПОИ има низак афинитет [142]. Главни дизајнерски параметри линкера и њихови функционални ефекти обједињени су у Табели 4.

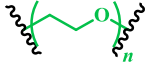

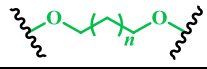


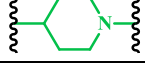
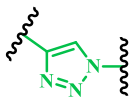
Табела 4. Уобичајене варијабле у дизајну линкера за PROTAC молекуле

Параметар	Утицај дизајна	Репрезентативне карактеристике
Дужина	Одређује просторни домет ТК-а	Јединице ПЕГ-а, алкилни ланци
Ригидност	Утиче на ентропију	Алкини, пиперазини, арилни прстенови
Поларност	Утиче на растворљивост и мембранску пермеабилност	Етарске везе, поларни бочни ланци
Место везивања	Мења оријентацију ПОИ или Е3 лигазе	Мета- наспрам пара-супституције на бензену

Тренутно не постоје универзална правила која гарантују дизајн ефективног линкера за дати пар лиганата за ПОИ и Е3 лигазу. Развој је и даље у великој мери емпиријски и заснован на итеративном приступу. Ипак, анализе постојећих PROTAC молекула откривају понављајуће мотиве. Често се користе ПЕГ, алкилни или модификовани гликолски ланци, као и ригиднији мотиви попут алкина, пиперазина, пиперидина и триазола. Састав линкера, укључујући дужину и тачке везивања, мора се оптимизовати за сваки конкретан пар ПОИ/Е3 лигаза. С

обзиром на структурну сложеност и динамику ТК-а, тешко је унапред предвидети која ће комбинација пружити оптималну деградацију ПОИ. Пошто литература не нуди дефинитивне смернице за линкере, биолошка активност се најчешће постиже и усавшава постепеним мењањем линкера, при чему се ПЕГ или алкилни линкери често бирају као почетна опција. Структурна разноликост неколико типова линкера приказана је у Табели 5 [29,140].

Табела 5. Типични структурни мотиви линкера и њихове кључне одлике

Структура линкера	Структурни мотив	Кључне одлике
	ПЕГ низ	Синтетичка изводљивост и комерцијална доступност
	Алкилни низ	Прецизно подешавање дужине
	Модификовани гликолски низ	Флексибилност
	Алкин	Могуће повећање потентности PROTAC молекула
	Пиперазин	Побољшање физичко-хемијских својстава
	Пиперидин	Ограничавање конформације
	Триазол	Олакшава синтезу PROTAC молекула Потенцијално високи приноси у синтези Могућност успостављања додатних водоничних веза унутар ТК-а

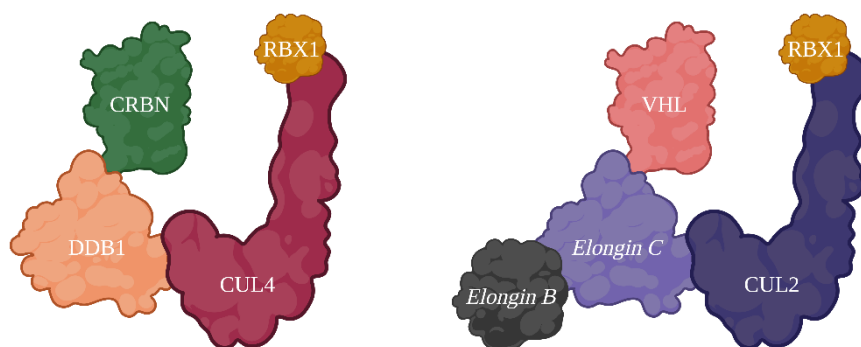
Регрутер Е3 лигазе

У механизму циљане деградације протеина путем хетеробифункционалних деградера, регрутовање Е3 убиквитин лигазе представља кључан корак. У PROTAC молекулима, регрутер Е3 лигазе је ковалентно или нековалентно везан за Е3 лигазу једним крајем бифункционалног молекула, док се другим крајем везује за циљни протеин. Таква индукована близина између ПОИ и Е3 лигазе омогућава да УПС убиквитинише ПОИ и усмери га ка протеазомалној деградацији. Избор Е3 лигазе и њеног регрутера намеће значајна ограничења у дизајну деградера. Лиганд мора да се веже за Е3 лигазу са довољним афинитетом и селективношћу, Е3 лигаза мора бити експримирана и функционална у релевантном ћелијском контексту, а геометрија индукованог комплекса мора погодовати убиквитинацији и накнадној протеазомалној обради. Поред тога, репертоар Е3 лигаза са валидираним лигандима мале молекулске масе погодним за дизајн PROTAC молекула и даље је веома ограничен упркос постојању великог броја хуманих Е3 лигаза у геному. У пракси, развој нових регрутера Е3 лигаза обухвата откриће лиганада мале молекулске масе који се везују за Е3 лигазу на начин компатибилан са формирањем ТК-а, убиквитинацијом ПОИ и протеазомалном деградацијом. Регрутер тиме врши двоструку улогу: а) везује се за Е3 лигазу и б) подстиче формирање продуктивног комплекса Е3-ПОИ. Структурне и биохемијске карактеристике Е3 лигаза, као што су архитектура домена, модули рецептора за супstrate, образац експресије и интеракције са кофакторима, стога постају важни параметри дизајна ефикасних PROTAC молекула.

Избор регрутера Е3 лигазе у великој мери обликује резултујући деградер. С тим у вези, у наредном одељку представљене су специфичне Е3 лигазе, њихови лиганди, обрасци примене у дизајну PROTAC молекула и њихова класификација на основу архитектуре.

1.6.3. Архитектура Е3 лигаза у функцији PROTAC молекула

PROTAC молекули користе специфичне Е3 убиквитин лигазе да би обележили циљне протеине за деградацију. Људски геном кодира стотине Е3 лигаза различитих структура, али само неколико њих до сада је успешно искоришћено PROTAC молекулима. Међу њима су кулин-RING лигазе попут CRL4^{CRBN} и CRL2^{VHL}, које представљају мулти-подјединичне комплексе [117,144], као и самосталне лигазе RING типа, попут MDM2 [61] и чланова IAP фамилије [145]. Код кулин-RING Е3 лигаза, рецептор за супстрат (нпр. CRBN или VHL) обезбеђује специфичност ка биолошком циљу препознајући дегрон-мотив (енг. *degron motif*) [146,147] или лиганд мале молекулске масе. Овај рецептор се повезује са скелетом кулина који је везан за RING прстасти протеин (енг. *RING finger protein*) (RBX1), који регрутује Е2 ензиме који садрже убиквитин. На пример, CRBN представља рецептор за супстрат у комплексу CUL4-RBX1-DDB1-CRBN (CRL4^{CRBN}) [148], док VHL има аналогну улогу у комплексу CUL2-RBX1-Elongin B/C-VHL (CRL2^{VHL}) [121] (Слика 18). Насупрот томе, MDM2 и cIAP1 су RING лигазе које постоје као један полипептидни ланац и димеризују (MDM2 са самом собом [60] или са MDMX [149]; IAP протеини као хомо- [150] или хетеродимери [151]), а директно делују и као рецептори за супстрат и као каталитичке подјединице [145,152].



Слика 18. Архитектура CRL4^{CRBN} (лево) и CRL2^{VHL} (десно) комплекса

Ове архитектонске разлике утичу на начин на који лиганди ступају у интеракцију са Е3 лигазама. Рецептори за супстрат кулин-RING лигаза углавном поседују добро дефинисане џепове за специфичне мотиве, док MDM2/IAP протеини имају природне жлебове за везивање малих молекула који се могу циљати инхибиторима на компетитиван начин. У наставку су сумиране особине најчешће коришћених Е3 лигаза регрутованих PROTAC молекулима и њихових лиганата.

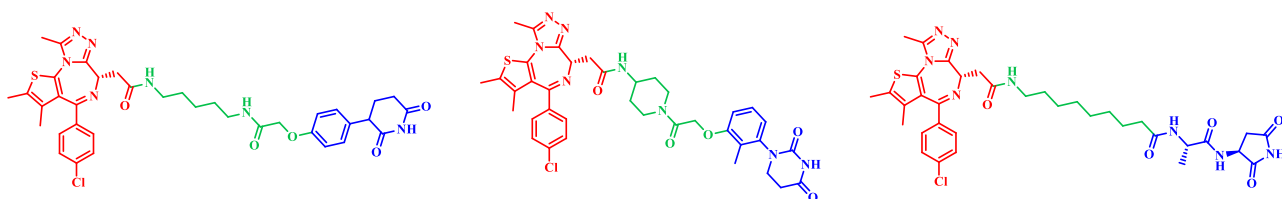
Цереблон (CRBN)

Архитектура. CRBN је протеин од 442 аминокиселине [153] који служи као подјединица за препознавање супстрата у оквиру Е3 убиквитин лигазе CRL4^{CRBN}. CRBN садржи *N*-терминални домен који је хомологан домену *Lon* протеазе [154] и *C*-терминални домен за везивање талидомида (енг. *Thalidomide-Binding Domain*, TBD) [117]. TBD поседује јединствени хидрофобни џеп „три-Трп“ формиран од три конзервирана остатка триптофана (Trp380, Trp386 и Trp400), а који обухвата глутаримидни прстен талидомида и његових аналога [155]. Јон цинка координиран је унутар TBD-а посредством четири остатка цистеина (из два CXXC мотива), што доприноси стабилизацији структуре [156]. Када се мали молекул, попут талидомида, веже

за CRBN, он заузима овај цеп и ефективно блокира природне интеракције CRBN-a са супстратима.

Уобичајени лиганди за CRBN. Талидомид и његови деривати (леналидомид, помалидомид, итд.), колективно познати као имуномодулаторни лекови (IMiDs), везују се за CRBN високим афинитетом [148] и мењају његову специфичност према супстратима, делујући као тзв. молекулски лепкови (енг. *Molecular Glues*, MGs) који индукују регрутовање нео-супстрата, о чему ће касније бити више речи. Структурно, IMiDs деле фталимидни фрагмент и glutаримидни прстен. Glutarимид је кључан за везивање за CRBN, јер се чврсто уклапа у „три-Trp“ место CRBN-a [155]. Кристалографске студије комплекса CRBN-DDB1 везаних за талидомид, леналидомид или помалидомид потврђују да сви IMiDs заузимају исти цеп CRBN-a, при чему њихов glutаримидни прстен остварује водоничне везе и хидрофобне контакте у оквиру TBD-a. Ова везивања високог афинитета (дисоцијационе константе од 250 nM, 178 nM и 157 nM за талидомид, леналидомид и помалидомид) [148] учинила су IMiDs погодним избором лиганата за регрутовање Е3 лигазе у дизајну PROTAC молекула. Године 2015. више истраживачких група показало је да конјугација аналога талидомида са лигандом за циљни протеин даје PROTAC молекул способан да регрутује CRBN ка том циљу и индукује његову деградацију. На пример, ARV-825 (Слика 13) спаја помалидомид са инхибитором ВЕТ протеина и изазива снажну, субмикромоларну деградацију BRD4 у ћелијама карцинома [119]. Ови иницијални успеси су установили CRBN као Е3 лигазу применљиву за PROTAC молекуле, пре свега захваљујући његовој свеопштој експресији и добро дефинисаном, фармаколошки приступачном везивном цепу.

Нови лиганди за CRBN. Најшире коришћени лиганди за CRBN у PROTAC молекулима су IMiDs једињења (најчешће талидомид, леналидомид или помалидомид). Њихов glutаримидни прстен је неопходан за везивање. Међутим, IMiDs су хемијски нестабилни, подлежу хидролизи у воденим условима, што доводи до отварања glutаримидног прстена [157]. Ово може ограничити стабилност PROTAC молекула и њихову ефикасност у биолошким системима. Да би се овај проблем превазишао, истраживачи су развили нестандартне лиганде за CRBN са робуснијим скелетима. Једна таква класа су фенил-glutarимиди (енг. *Phenyl Glutarimides*, PGs), у којима је бензенов прстен прикачен на glutаримидно језгро. Ови PG аналози задржавају висок афинитет за CRBN и показују знатно побољшану отпорност на хидролизу. *Min* и сар. показали су да прототипни PROTAC молекул заснован на PGs може изазвати изузетно снажну деградацију ВЕТ протеина ($DC_{50}^{BRD4} = 0,87 \text{ nM}$; DC_{50} – концентрација једињења при којој је 50% циљног протеина деградирано) (Слика 19) [158]. Други нови хемотип су фенил-дихидроурацили (енг. *Phenyl Dihydrouracils*, PDHUs) који, у односу на PGs, имају додатни атом азота и ахирални су. *Zhao* и сар. показали су да супституисани PDHUs могу деловати као ефикасни лиганди за регрутовање CRBN-a у PROTAC молекулима (Слика 19) [159]. Недавно, истраживачи су описали и „циклимидне“ скелете (цикличне имиде инспирисане дегрон-мотивима) који се везују за CRBN и испољавају јединствена својства формирања ТК-a (Слика 19) [160]. Укупно, ова открића показују да алтернативни лиганди за CRBN могу понудити одређене фармакокинетичке и биохемијске предности.

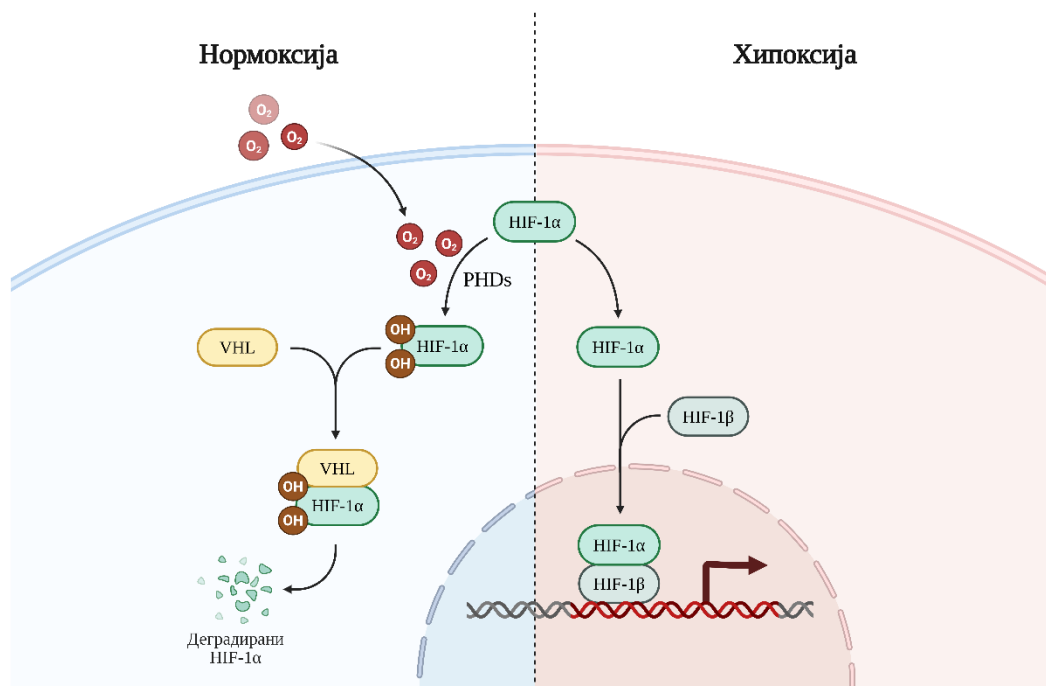


Слика 19. Хемијске структуре PROTAC молекула који садрже фенил-glutarимид (лево), фенил-дихидроурацил (средина) и циклимид (десно) као лиганд за CRBN

Фон Хипел-Линдау (VHL)

Архитектура. VHL функционише као јединица за препознавање супстрата у саставу кулин-2 RING E3 лигазе (CRL2^{VHL}), формирајући комплекс са протеинима *Elongin B*, *Elongin C*, кулин-2 (CUL2) и RBX1 [121]. У оквиру овог комплекса, VHL ступа у контакт са *Elongin B/C* преко очуваног *BC-box* мотива [161], док CUL2 обезбеђује структурну подлогу [162], а RBX1 регрутује E2 ензим који садржи убиквитин [163]. Сам VHL се састоји из два домена: *N*-терминалног β-домена (аминокиселине 63-154) који формира површину за препознавање супстрата [164], и *C*-терминалног α-домена (аминокиселине 155-192) који углавном остварује интеракцију са протеином *Elongin C* [165]. Активација CRL2^{VHL} комплекса одвија се путем недилације кулина, што доводи до конформационих промена које погодују преносу убиквитина [166]. Денедилацију посредује COP9 сигналозом [167], док протеин CAND1 својим везивањем поново доводи комплекс у неактивно стање [168]. Виши ниво структурне организације приказује CRL2^{VHL} комплекс са архитектуром налик треношцу, где се *Elongin C* налази централно, а остале подјединице распоређене су на три крака. CUL2 препознаје површину између VHL и *Elongin C* путем хидрофобних и електростатичких интеракција. Везивање CUL2 уређује једну петљу *Elongin C* протеина (аминокиселине 48-57) која је у комплексу VHL-*Elongin B/C* (VCB) неуређена. *N*-терминална екстензија CUL2 има кључну улогу у стабилизацији интеракције, док елементи *BC-box*-а VHL-а такође успостављају везе са CUL2 путем водоничних веза и јонских интеракција. Додатно, *VHL-box* садржи и *BC-box* (за везивање *Elongin B/C*) и *CUL2-box* (који одређује специфичност ка CUL2) [169].

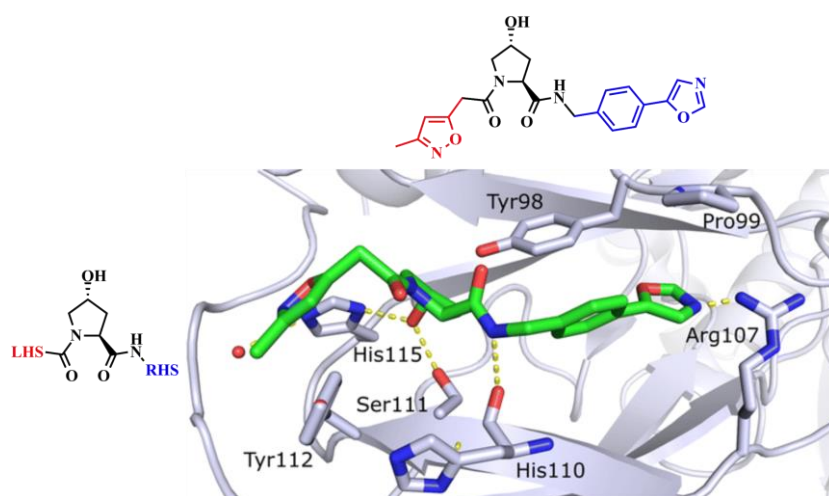
Природни супстрати VHL-а и њихово препознавање. HIF-α протеини представљају најбоље окарактерисане супстрате VHL-а. У условима нормоксије, ензими који садрже домен пролил-хидроксилазе (енг. *Prolyl Hydroxylase Domain Enzymes*, PHDs) хидроксилишу два пролина у HIF-α протеинима (Pro402 [170] и Pro564 [147,171] у HIF-1α). β-домен VHL протеина стереоселективно препознаје хидроксипролин у кисеоник-зависном домену за деградацију HIF-1α [172], што доводи до полиубиквитинације од стране CRL2^{VHL} комплекса и протеазомалне деградације [124]. У условима хипоксије, одсуство хидроксилације спречава ангажовање VHL протеина, што омогућава акумулацију HIF-α и покретање транскрипције гена који одговарају на хипоксију (Слика 20) [173].



Слика 20. Деградација HIF-1α у условима нормоксије и стабилизација у условима хипоксије

Структурне студије са HIF-1 α пептидима установиле су начин везивања хидроксипролина на β -површини VHL протеина [172,174]. Поред HIF- α , за комплекс CRL2^{VHL} је обелодањено да препознаје и неколико додатних протеина, укључујући *Sprouty2* (чија је регулација условљена хидроксилацијом зависном од PHD) [175], субјединце РНК полимеразе II (RPB1 [176], hsRPB7 [177]), атипичне изоформе протеин киназе Ц [178], као и EGFR у одређеним контекстима [179]. Деловање на супстрат је повезано са недилацијом кулина-2. Прецизније, интеракција VHL са HIF-1 α погодује регрутовању DCNL1, што иницира недилацију CUL2 и на тај начин подржава убиквитинацију и деградацију HIF-1 α [180].

Лиганди за VHL мале моларне масе. Иницијални приступи користили су пептиде изведене из HIF-1 α (нпр. ALAPYIP) за регрутовање VHL протеина, али су ови пептиди имали лошу ћелијску пермеабилност [112], што је подстакло развој непептидних лиганата. Дизајн вођен структуром (енг. *Structure-Guided Design*), усредсређен на имитирање фармакофора хидроксипролина из HIF протеина, довео је до стварања лиганата за VHL који су представљали мале молекуле. Ко-кристалне структуре и студије односа структуре и активности (енг. *Structure-Activity Relationship, SAR*) дефинисале су кључне контакте у оквиру VHL-а. Хидроксилна група на C4 положају хидроксипролина ствара водоничне везе са Ser111 и His115, карбонилна група лиганда интерагује са Tyr98, а амидна -NH- група успоставља водоничну везу са карбонилном групом на главном ланцу (енг. *backbone*) остатка His110 [128]. Хидрофобни цепови који оивичавају хидроксипролин прихватају супституенте на левој (енг. *Left-Hand Side, LHS*) и десној (енг. *Right-Hand Side, RHS*) страни молекула. На десној страни, издужени цеп обухвата остатке као што су Phe76, Tyr98, Ile109, Trp117, Pro86, Pro99, Leu101 и Arg107 [181]. Супституенти (нпр. *p*-хетероарил-бензил групе) појачавају π - π и хидрофобне интеракције и могу да остваре додатне водоничне везе (нпр. са Arg107) (Слика 21).

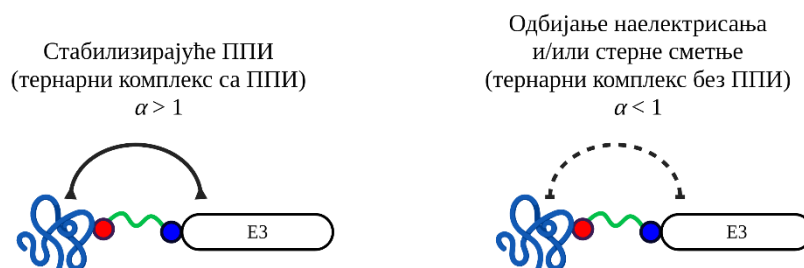


Слика 21. Приказ положаја супституената на хидроксипролину са леве (LHS) и десне (RHS) стране и интеракције једног лиганда за VHL за аминокиселинама везивног места [182]

Основни инхибитори изграђени на скелету хидроксипролина, који садрже изоксазол са леве и бензилне хетероцикле са десне стране, показали су афинитет за VHL у тестовима везивања, а кристалографија је потврдила очуваност мреже водоничних веза око хидроксипролина. Додатно, оптимизовани супституенти са десне стране (нпр. 4-(оксазол-5-ил)бензил или 4-(4-метилтиазол-5-ил)бензил) побољшали афинитет бољим уклапањем у цеп испод Pro99. Први описани инхибитори интеракције VHL/HIF-1 α мале моларне масе били су усмерени управо на ово место и валидирани биофизичким тестовима и ко-кристалним структурама. Ова једињења су репродуковала кључне контакте хидроксипролина и имала додатне интеракције са бочним ланцима VHL протеина, као што су Tyr98, Pro99 и Arg107 [126].

1.6.4. Улоге формирања тернарног комплекса и кооперативности у дејству PROTAC молекула

Дефинишућа карактеристика деловања PROTAC молекула јесте формирање ТК-а који се састоји од циљног протеина, PROTAC молекула и Е3 лигазе. Формирање ТК-а односи се на интеракције ПОИ, PROTAC молекула и Е3 лигазе које воде настанку стабилног комплекса. Јачина ове асоцијације може се квантификовати равнотежном дисоцијационом константом (често означеном као K_{LPT} за комплекс лигаза-PROTAC молекул-биолошки циљ) која одражава укупност интеракција између три партнера [136]. Насупрот томе, кооперативност описује начин на који везивање једног протеинског партнера (нпр. Е3 лигазе) утиче на афинитет везивања другог (циљног протеина) за PROTAC молекул (и обрнуто). Кооперативност се обично изражава као бездимензиони фактор α , математички дефинисан као однос бинарних афинитета и афинитета ТК-а [142], о чему ће касније бити више речи. Привлачне или одбијајуће ППИ између ПОИ и Е3 убиквитин лигазе могу усмерити формирање ТК-а, што се одражава у вредности α . Наиме, позитивна кооперативност ($\alpha > 1$) настаје када ове ППИ погодују асоцијацији ТК-а, док негативна кооперативност ($\alpha < 1$) одражава ППИ које томе не погодују (Слика 22). Важно је истаћи да већа позитивна кооперативност ублажава појаву ефекта сатурације (енг. *hook effect*) и на тај начин повећава формирање продуктивног ТК-а [183].



Слика 22. Позитивна и негативна кооперативност [29,184]

У практичном смислу, $\alpha > 1$ означава позитивну кооперативност, при чему регрутовање једног протеина-партнера побољшава везивање другог, доводећи до ТК-а стабилнијег него што би се очекивало на основу независних бинарних интеракција. Супротно томе, $\alpha < 1$ указује на негативну кооперативност, где један догађај везивања отежава други, што резултира ТК-ом мање стабилности од предвиђене. Важно је нагласити да су афинитети везивања унутар ТК-а и кооперативност, иако повезани, различити параметри. Наиме, PROTAC молекул може индуковати формирање ТК-а високих афинитета везивања унутар њега и у одсуству снажне позитивне кооперативности, и обрнуто [143]. Кооперативност специфично одражава синергизам (или антагонизам) између две површине везивања, док афинитет везивања унутар ТК-а обухвата све интеракције протеин-PROTAC молекул и протеин-протеин које одржавају комплекс. Ове карактеристике заједно регулишу фармаколошки модел заснован на покретању догађаја специфичан за PROTAC молекуле, одређујући колико ефикасно PROTAC молекул може да регрутује Е3 лигазу ка биолошком циљу и покрене убиквитинацију.

1.6.5. Тестови за испитивање тернарних комплекса и кооперативности

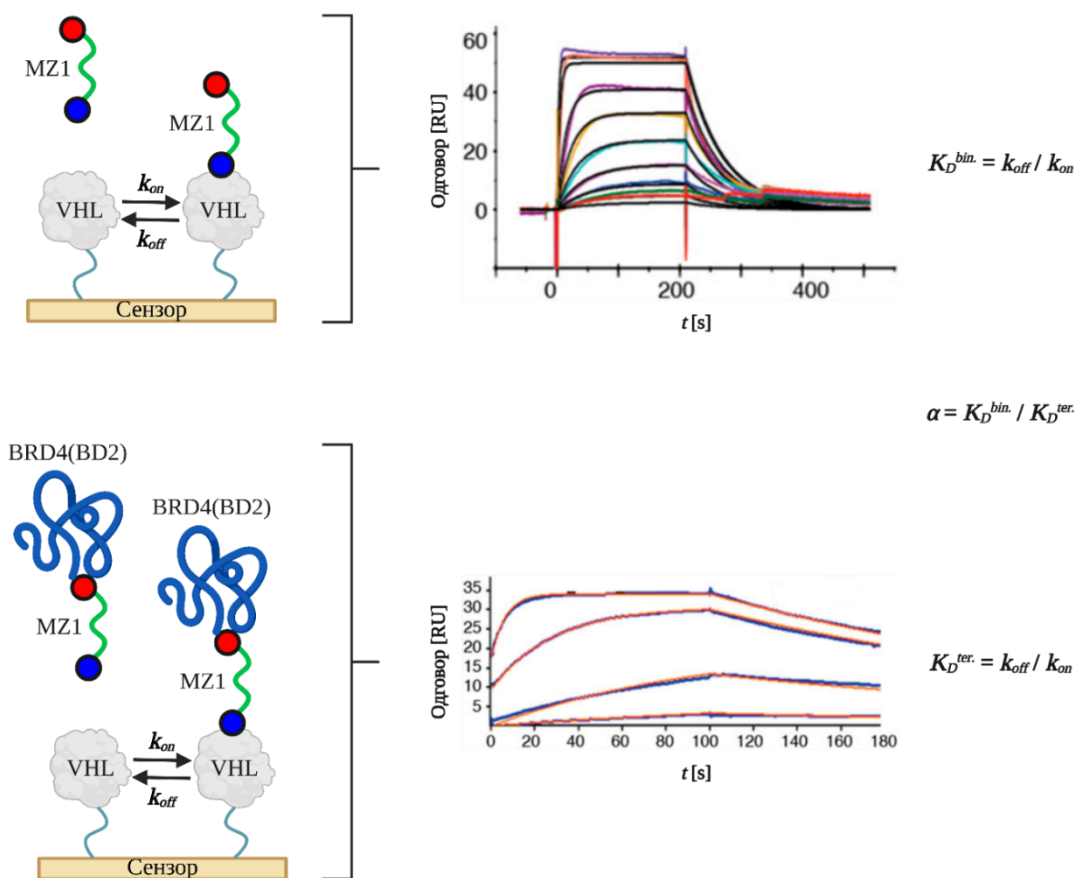
Рендгенска кристалографија

Разноврсне биофизичке и структурне методе развијене су за експерименталну потврду формирања ТК-а и за одређивање кооперативности. Рендгенска кристалографија (енг. *X-ray crystallography*) пружа директан визуални доказ формирања ТК-а на атомској резолуцији. Један од преломних примера јесте кристална структура комплекса BRD4(BD2)-MZ1-VHL обелодањена 2017. године, која је представљала први високорезолуциони снимак ТК-а чије је

формирање индуковано PROTAC молекулом. Ова структура је показала да PROTAC молекул MZ1 делује као „молекулски лепак“ између бромодомена и VHL-а, индукујући нове ППИ које не постоје када BRD4 или VHL везују своје лиганде независно један од другог. Овакви кристалографски подаци не само да потврђују формирање ТК-а, већ омогућавају и мерење новоформиране површине за ППИ (у примеру BRD4-VHL, око 688 \AA^2 нове површине бива укључено у ППИ по формирању ТК-а) [130].

Површинска плазмонска резонанца

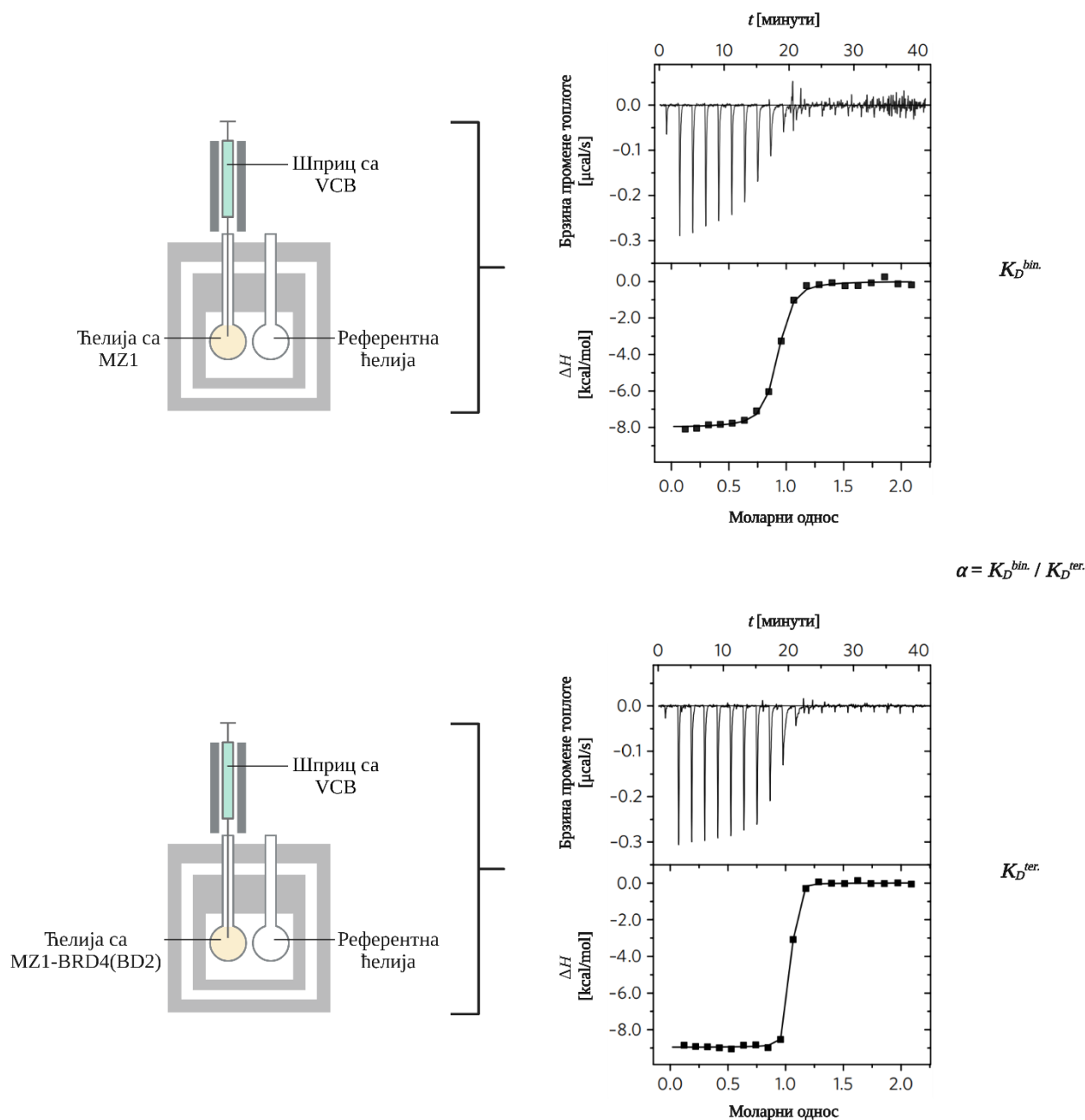
Технике које користе растворе примењују се за праћење формирања ТК-а у реалном времену и за израчунавање вредности кооперативности. Површинска плазмонска резонанца (енг. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) показала се као добра метода за карактеризацију интеракција индукованих PROTAC молекулима. У типичном експерименту, један протеин-партнер (нпр. Е3 лигаза) имобилизује се на сензору, док се циљни протеин пропушта преко површине у присуству различитих концентрација PROTAC молекула. Појава ТК-а може се детектовати као сигнал само када се све три компоненте заједно нађу на површини. Кинетичка анализа добијених података омогућава одређивање константи брзина асоцијације и дисоцијације, из којих се могу израчунати дисоцијационе константе. *Ciulli* и сар. развили су такве тестове који омогућавају, по први пут, квантитативно одређивање стабилности ТК-а индукованих PROTAC молекулима директним мерењем кинетике њиховог формирања и дисоцијације у реалном времену. SPR се додатно може користити у компетитивним форматима за одређивање фактора кооперативности α поређењем афинитета PROTAC молекула ка једном протеину-партнеру у присуству и одсуству другог протеина-партнера (Слика 23) [142].



Слика 23. Површинска плазмонска резонанца као алат за карактеризацију формирања ТК-а индукованог PROTAC молекулом и кинетике (k_{on} – константа брзине асоцијације; k_{off} – константа брзине дисоцијације; K_D^{bin} – дисоцијациона константа за бинарни комплекс; K_D^{ter} – дисоцијациона константа за тернарни комплекс; RU – јединице одговора) [142]

Изотермална титрациона калориметрија

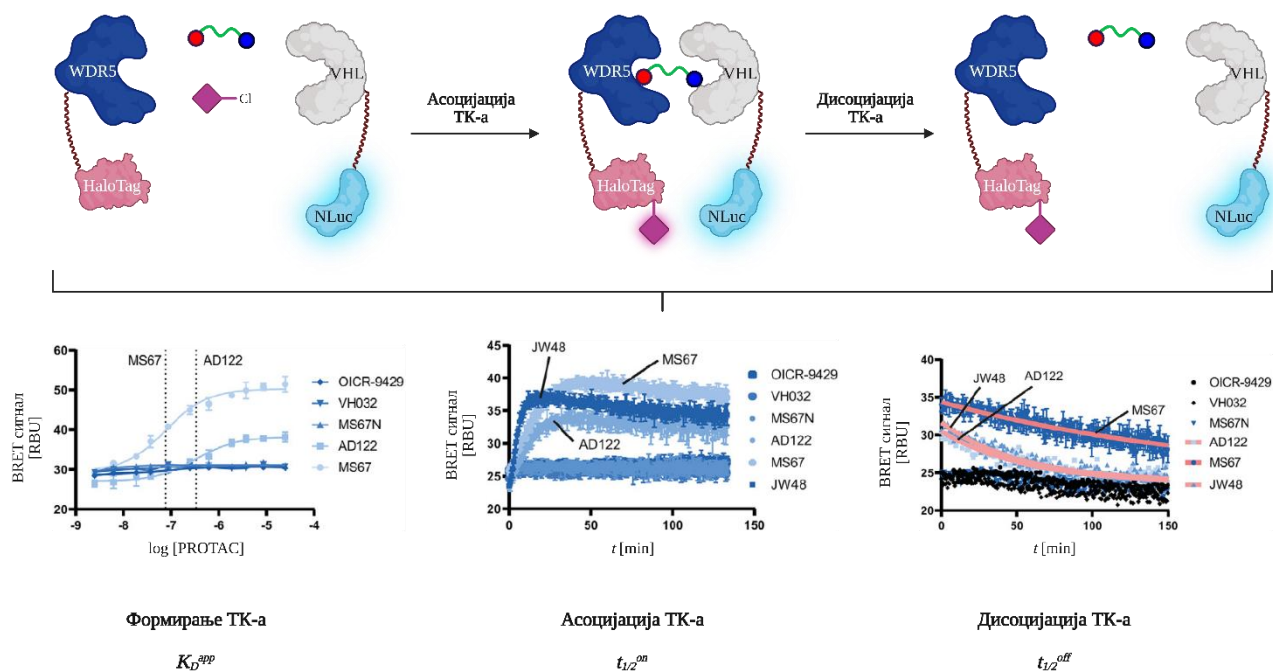
Још једна метода која користи растворе је изотермална титрациона калориметрија (енг. *Isothermal Titration Calorimetry*, ИТС), која омогућава раздвајање доприноса енергија бинарних и тернарних интеракција. Спровођењем секвенцијалних титрација (нпр. титрација PROTAC молекула у раствор који садржи само циљни протеин, у поређењу са титрацијом у претходно формирану смешу циљног протеина и ЕЗ лигазе) могу се уочити промене у енталпији везивања које указују на формирање ТК-а и израчунати вредности α параметра на основу разлика у топлотним профилима (Слика 24) [130]. SPR и ИТС, стога, пружају квантификацију афинитета у оквиру ТК-а и кооперативности у строго дефинисаним *in vitro* условима.



Слика 24. Изотермална титрациона калориметрија као алат за карактеризацију формирања ТК-а индукованог PROTAC молекулом ($K_D^{bin.}$ – дисоцијациона константа за бинарни комплекс; $K_D^{ter.}$ – дисоцијациона константа за тернарни комплекс; ΔH – промена енталпије) [130]

NanoBRET тест

Комплементарне аналитичке методе користе пренос енергије или ефекте просторне блискости за детекцију формирања ТК-а, често у условима који омогућавају већи проток узорака (енг. *high-throughput*) или су физиолошки релевантнији. NanoBRET (енг. *Nanoluciferase Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) представља тест који се изводи у живим ћелијама, у коме је Е3 лигаза или циљни протеин фузионисан са *NanoLuc* (NLuc) луциферазом (донор енергије), док је други протеин означен флуоресцентним акцептором. Када PROTAC молекул индукује блискост између ова два протеина, BRET сигнал се повећава, што омогућава праћење формирања ТК-а у реалном времену унутар живих ћелија. NanoBRET тест омогућава праћење кинетике формирања и дисоцијације комплекса мерењем пораста и пада сигнала и коришћен је за поређење стабилности ТК-а које различити PROTAC молекули формирају у ћелијама. На пример, једна недавна студија користила је фузионе протеине NLuc-VHL и HaloTag-WDR5 да покаже да ефикаснији PROTAC молекули усмерени на WDR5 индукују више BRET сигнале и дуготрајније ТК-е у ћелијама, док мање активни аналози производе ниже или пролазније сигнале. Ова запажања у живим ћелијама блиско су одговарала исходима деградације које PROTAC молекули постижу, наглашавајући да је стабилно формирање ТК-а у ћелијама кључна детерминанта ефикасности. Подаци добијени током временског интервала даље илуструју ове ефекте. Високо ефикасан PROTAC молекул индукује брз пораст BRET сигнала (што указује на убрзано формирање ТК-а) и одржава комплекс (спор пад сигнала), што корелира са снажном деградацијом WDR5. Насупрот томе, мање ефикасан аналог производи умерен пораст BRET сигнала и брзо опадајући сигнал, што одражава нестабилан комплекс где не долази до ефикасне убиквитинације циљног протеина (Слика 25) [185].

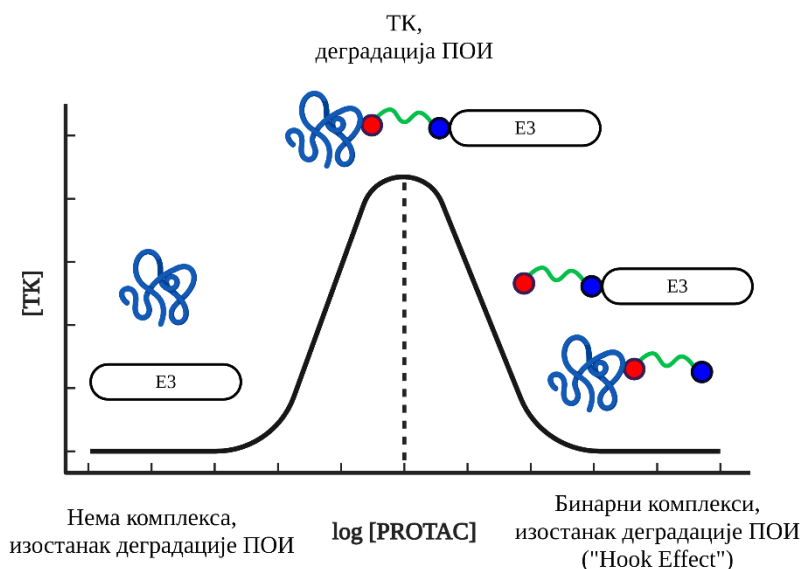


Слика 25. Карактеризација ТК индукованих PROTAC молекулима помоћу NanoBRET теста у живим ћелијама (K_D^{app} – привидни афинитет ТК-а; $t_{1/2}^{on}$ – полувреме асоцијације ТК-а; $t_{1/2}^{off}$ – полувреме дисоцијације ТК-а; RBU – релативне BRET јединице) [185]

TR-FRET тест

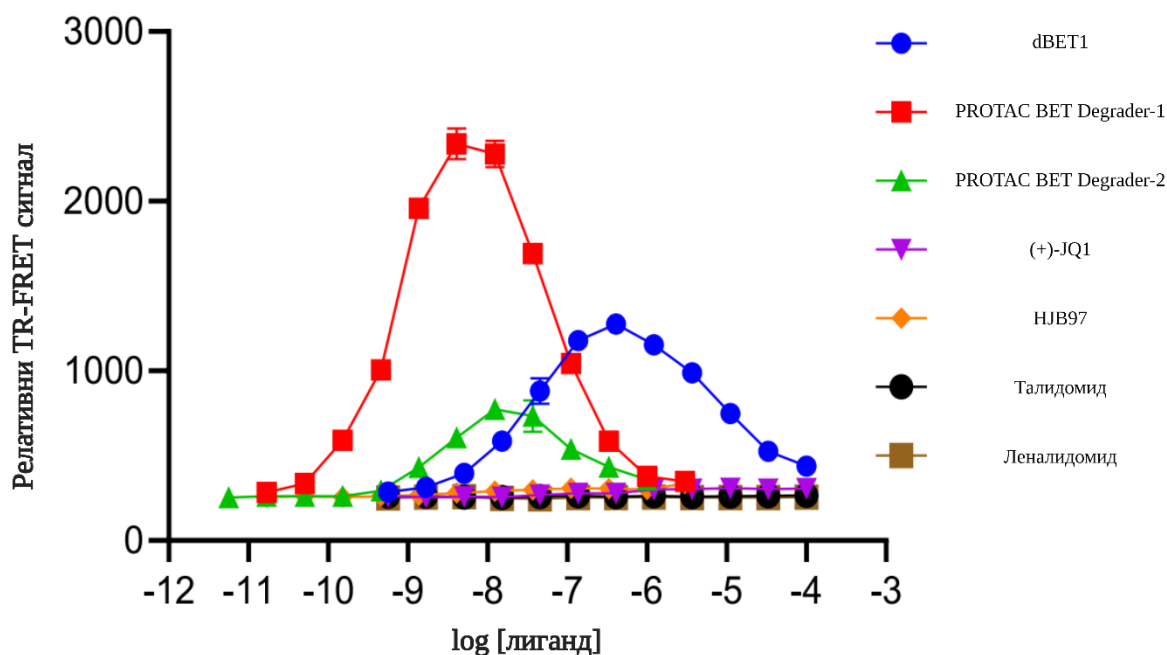
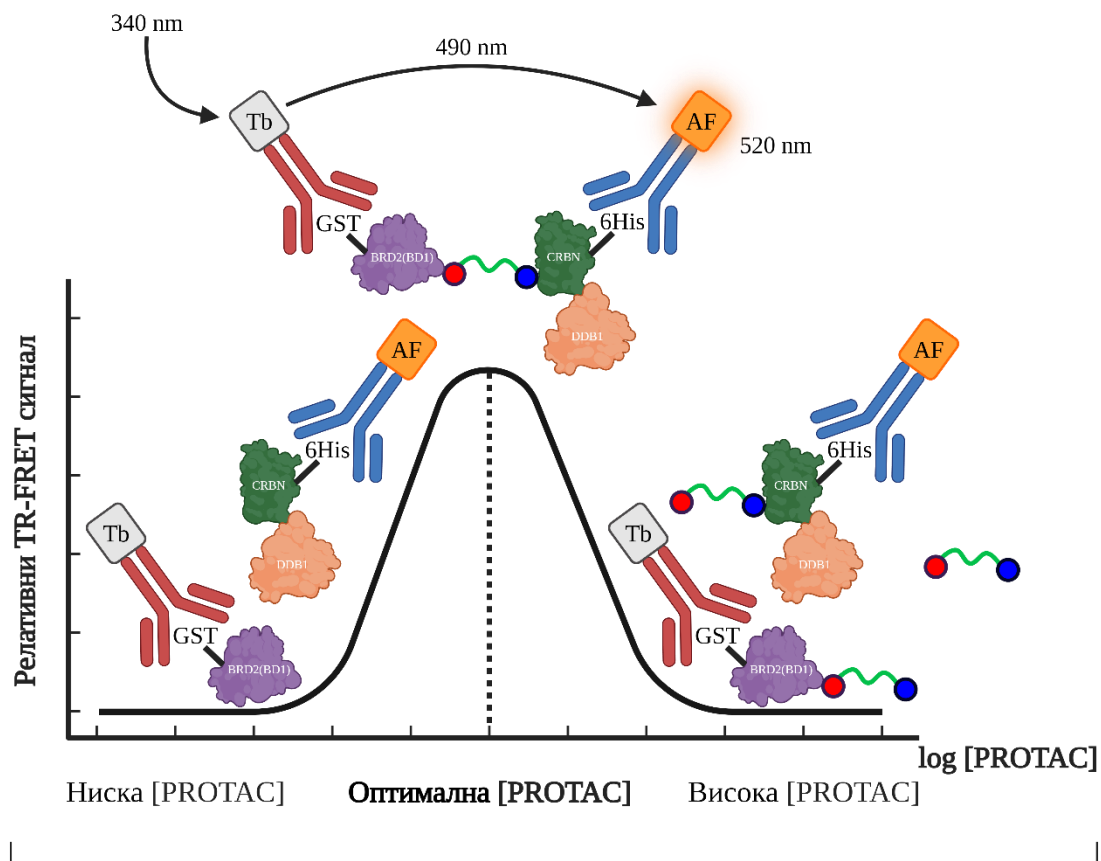
Друга метода заснована на просторном приближавању протеина укључује TR-FRET (енг. *Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer*) тест. У овом тесту за карактеризацију ТК-а

користе се циљни протеини и Е3 лигазе у облику обележених донора и акцептора. Формирање ТК-а доводи обележене протеине у просторну близину, чиме се производи FRET сигнал. Посебно је запажено да титрација PROTAC молекула у оваквим тестовима често доводи до карактеристичне криве у облику звона. При ниским концентрацијама PROTAC молекула, сигнал од ТК-а расте, али при високим концентрацијама опада услед засићења циљног протеина или Е3 лигазе вишком PROTAC молекула, чиме се формирају нефункционални бинарни комплекси (Слика 26).



Слика 26. Кинетика формирања ТК-а [29,184]

Висина пика и степен његовог опадања пружају увид у кооперативност. Виши пик указује на већи удео истовремено ангажованих циљних протеина и Е3 лигазе, што се често повезује са позитивном кооперативношћу, док изражен ефекат сатурације при нижим концентрацијама може указивати на слабу кооперативност или чак конкуренцију између догађаја везивања PROTAC молекула за одговарајуће протеине. У једној студији развијен је TR-FRET тест за праћење формирања ТК-а између BRD2(BD1), Е3 лигазе CRBN и различитих PROTAC молекула који регрутују CRBN. Тест је користио анти-GST (глутатион S-трансфераза) антителио обележено тербијумом као донорску флуорофору и анти-His (полихистидинска ознака) антителио обележено *Alexa Fluor 488* (AF) као акцептор, што је омогућило детекцију просторне близине између BRD2(BD1) обележеног GST и CRBN(DDB1) обележеног His. Када је PROTAC dBET1 титриран, TR-FRET сигнал је прво растао, а затим опадао, дајући доза-одговор криву у облику звона карактеристичну за формирање ТК-а. Пик ове криве одговарао је концентрацији PROTAC молекула која омогућава максимално формирање ТК-а, док су и ниже и више концентрације давале ниже сигнале услед непотпуног стварања ТК-а или стварања нефункционалних комплекса. Примена истог теста на друге PROTAC молекуле који регрутују CRBN, као што су PROTAC BET Degradер-1 и PROTAC BET Degradер-2, открила је сличне профиле у облику звона. Међу њима, PROTAC BET Degradер-1 произвео је највиши и најшири пик сигнала, што указује на формирање већег и стабилнијег удела ТК-а под упоредивим условима. Овакво понашање је у складу са повољнијом кооперативношћу између BRD2(BD1) и CRBN у присуству овог деградера. Заједно, ова открића показују како TR-FRET тестови за карактеризацију ТК-а могу квантификовати интеракцију биолошког циља и лигазе индуковану PROTAC молекулом и дати квалитативни увид о кооперативности у формирању ТК-а (Слика 27) [186].

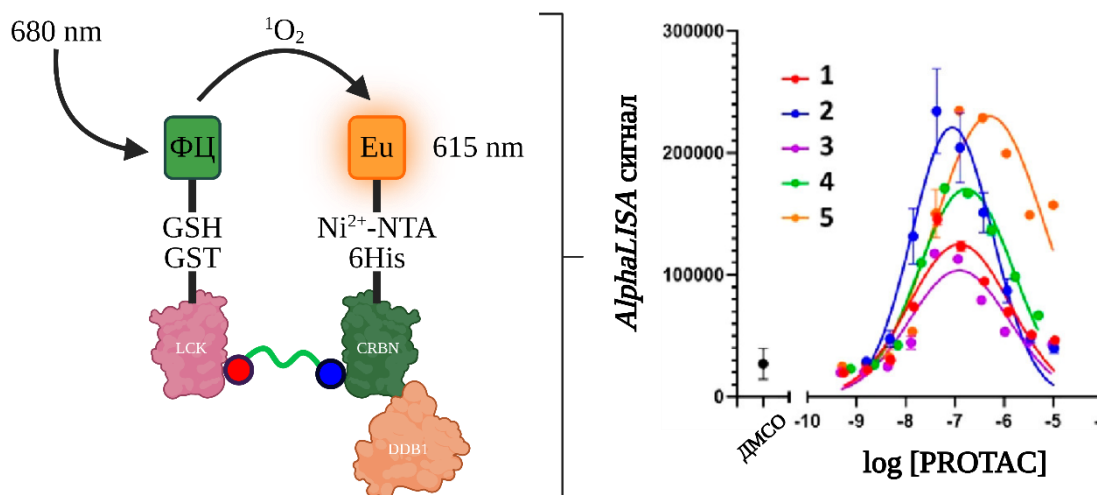


Слика 27. Коришћење TR-FRET теста за праћење формирања ТК-а. Врхови крива представљају оптималне концентрације при којима су PROTAC молекули најефикаснији (за dBET1, PROTAC BET Degradер1 и PROTAC BET Degradер-2 износе 412 nM, 4,1 nM и 12,3 nM) [186]

AlphaScreen и AlphaLISA тестови

Ови тестови су засновани на принципу просторне блискости донорског и акцепторског носача (енг. *bead*). Наиме, након ексцитације на 680 nm, донорски носач, који садржи уграђени

фотосензибилизатор на бази фталоцијанина (ФЦ), генерише краткотрајни синглетни кисеоник ($^1\text{O}_2$) који може да дифундује само око 200 nm. Ако се акцепторски носач нађе унутар ове удаљености, $^1\text{O}_2$ реагује са његовим хемилуминесцентним компонентама, што резултује емисијом светлости. У *AlphaScreen* тесту, акцептори на бази рубрена емитују широк сигнал у опсегу 520-620 nm, док *AlphaLISA* садржи акцепторске флуорофоре у виду хелата еуропијума који дају оштро емисионо зрачење на 615 nm, мање подложно интерференцији матрикса [187,188]. У студији *Jarusiewicz* и сар., аутори су користили *AlphaLISA* методу за праћење формирања ТК-а изазваног PROTAC молекулом између LCK-а и CRBN-а. Селективно везивање протеина за носаче постигнуто је специфичним интеракцијама – GST-LCK је интераговао са донорским носачима обложеним глутатионом (GSH) захваљујући високој специфичности GST-а према глутатиону, док је CRBN-DDB1 означен полихистидинском ознаком интераговао са акцепторским носачима који садрже хелирани никл на чијој површини изложене Ni^{2+} -NTA (нитрилотрисирћетна киселина) групе координишу хистидинске остатке. Када PROTAC молекул истовремено веже оба протеина, резултујући ТК доводи донорски и акцепторски носач у просторну блискост, чиме је омогућена активација хелата еуропијума посредована синглетним кисеоником и генерисање *AlphaLISA* сигнала. У овим условима аутори су уочили карактеристичан *AlphaLISA* одговор у облику звонолике криве, при чему је PROTAC молекул **2**, заснован на скелету PDHU, давао већу амплитуду сигнала у односу на PROTAC молекул **1**, заснован на скелету PG, што указује на већи степен формирања ТК-а (Слика 28) [189].



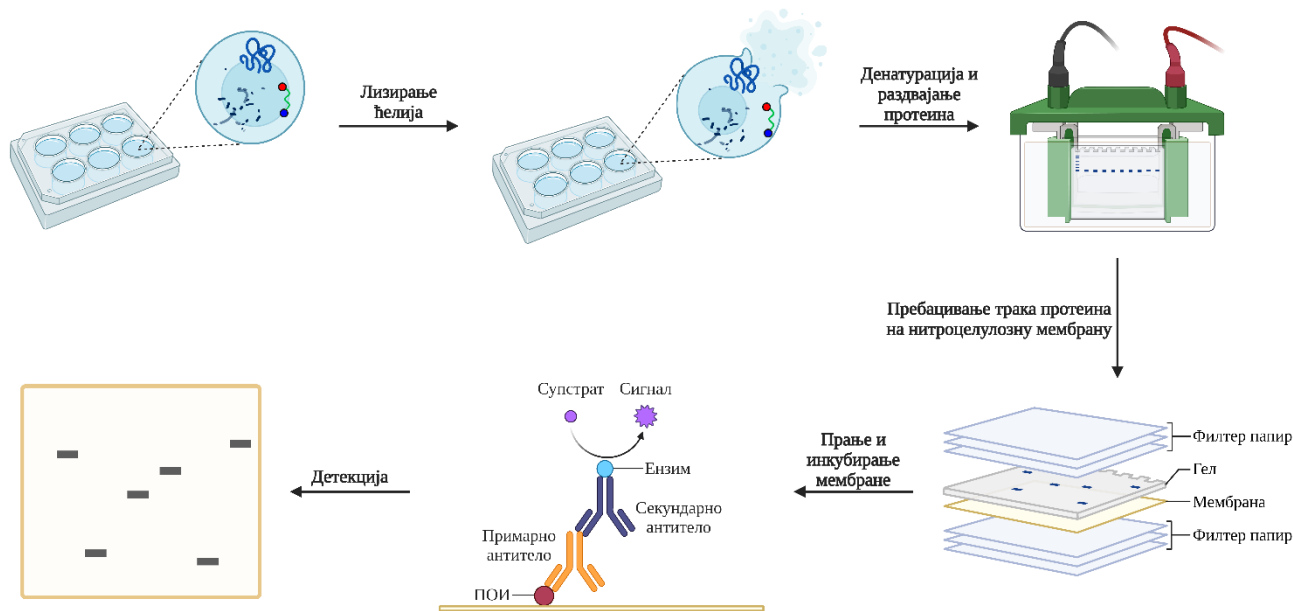
Слика 28. Коришћење *AlphaLISA* теста за праћење формирања ТК-а [189]

1.6.6. Експериментално одређивање деградационе активности PROTAC молекула

Праћење ефикасности којом PROTAC молекул смањује количину циљног протеина у ћелијама захтева употребу тестова који могу да квантификују промене у садржају протеина током времена и при различитим концентрацијама. Значајан део иницијалних истраживања у области циљане деградације протеина ослањао се на *Western blot* анализу како би се пратио губитак ПОИ у ћелијским лизатима, обично на начин који зависи од времена инкубације и концентрације деградера. Паралелно са тим, развијени су луминесцентни репортерски системи засновани на *NanoLuc* ензиму и *HiBiT/LgBiT* технологији комплементације, као осетљиви, високо-пропусни алати за праћење активности деградера у живим ћелијама или сировим лизатима, омогућавајући праћење кинетике промене количине протеина у широком динамичком опсегу. *Western blot* анализа и тестови засновани на *HiBiT* систему представљају главне експерименталне формате који се користе за карактеризацију деградације посредоване PROTAC молекулима и за извођење квантитативних параметара као што су DC_{50} и D_{max} .

Western blot анализа за квантификацију деградације протеина индуковане PROTAC молекулима

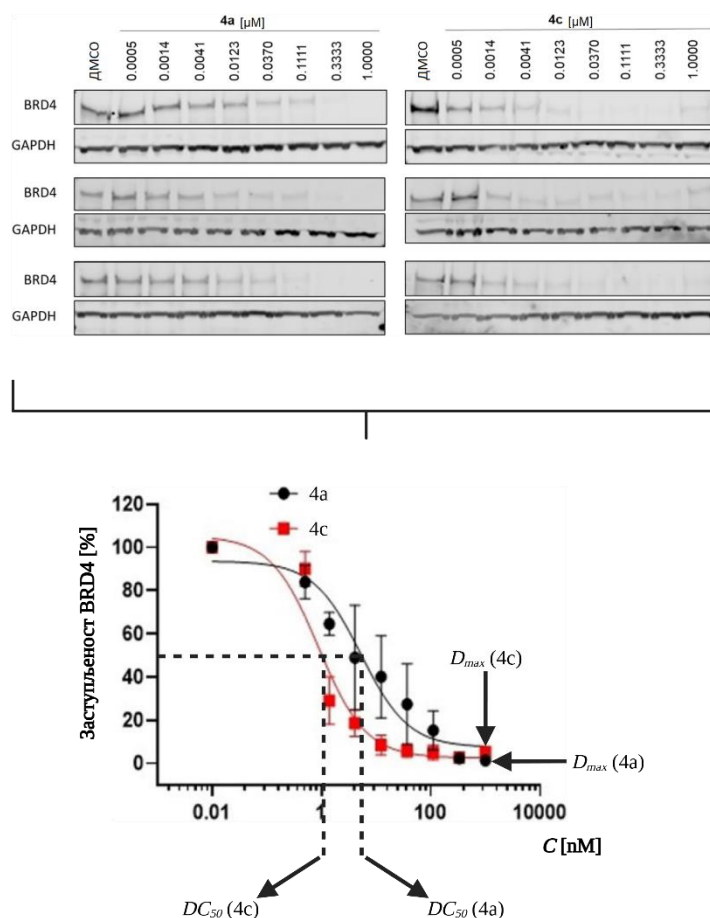
У типичној *Western blot* анализи за карактеризацију деградера, ћелије се третирају испитиваним PROTAC молекулима током дефинисаног временског периода како би се омогућила деградација, а затим се лизирају ради припреме протеинских узорача. Протеини у лизатима се денатуришу и раздвајају SDS-PAGE (енг. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) методом, након чега се раздвојене траке протеина пребацују на нитроцелулозну мембрану. Мембрана се затим пере и инкубира са примарним антителом специфичним за циљни протеин, а паралелно и са антителом које препознаје референтни протеин за који се не очекује да буде деградиран и који служи као контрола (нпр. β -актин). Детекција се потом врши помоћу обележеног секундарног антитела које носи флуоресцентну ознаку или ензим за генерисање светлосног сигнала, што омогућава визуализацију трака циљног протеина и контроле (Слика 29). Квалитет теста изузетно зависи од добро окарактерисаних и високо специфичних примарних антитела како би се минимизовало неселективно везивање и позадински сигнал. Након електрофорезе, интензитети трака се нормализују у односу на контролу и у односу на ћелије третиране само слепом пробом (енг. *vehicle*), чиме се добија релативна мера преосталог циљног протеина на свакој концентрацији деградера или временској тачки. Користећи овај приступ, *Western blot* анализа је коришћена за визуализацију деградације у зависности од концентрације деградера у ћелијама и за потврду да је уочени губитак протеина завистан од Е3 лигазе и протеазома, што се показује ко-третманом са одговарајућим инхибиторима. Иако је широко коришћена, *Western blot* анализа је захтевна, подразумева више корака прања и инкубације, и њена квантитативна анализа може трајати од неколико сати до неколико дана. Ове карактеристике ограничавају ефикасност и подстичу примену комплементарних тестова у формату микротитарских плоча за веће серије PROTAC молекула.



Слика 29. Шематски приказ тока *Western blot* анализе за карактеризацију PROTAC молекула

Деградација BRD4 протеина изазвана PROTAC молекулом **4c** (Слика 19, лево) квантификована је у MV4-11 ћелијама *Western blot* анализом. Ћелије су третиране током 12 сати растућим концентрацијама једињења, а нивои BRD4 протеина мерени су имуноблотовањем. Јачине трака затим су коришћене за генерисање криве концентрација-одговор, из које је израчуната DC_{50}

вредност. У оквиру ових експерименталних услова, PROTAC молекула **4c** је показао високу потенцију деградације са DC_{50} вредношћу од 0,87 nM. Ова вредност одговара концентрацији при којој је једињење индуковало 50% редукције BRD4 протеина. Осим тога, D_{max} вредност (максимални степен деградације) за деградер **4c** одређена је директно из криве деградације зависне од концентрације која приказује обим губитка BRD4 протеина постигнут на највишим тестираним концентрацијама. Максимално смањење количине BRD4 протеина на криви концентрација-одговор представља максималну деградацију (D_{max}) од 99% достигнуту током 12-часовног периода третмана. Стога, D_{max} одговара најнижој измереној количини BRD4 протеина *Western blot* анализом у оквиру коришћене серије концентрација. Паралелно је аналог **4a** (dBET1, Слика 14) који садржи IMiD као лиганд за E3 лигазу испитиван у истим условима 12-часовног третмана. Овај PROTAC молекула показао је вредност DC_{50} од 5,27 nM, што указује на знатно слабију способност индукције деградације BRD4 у односу на **4c** (Слика 30) [158].



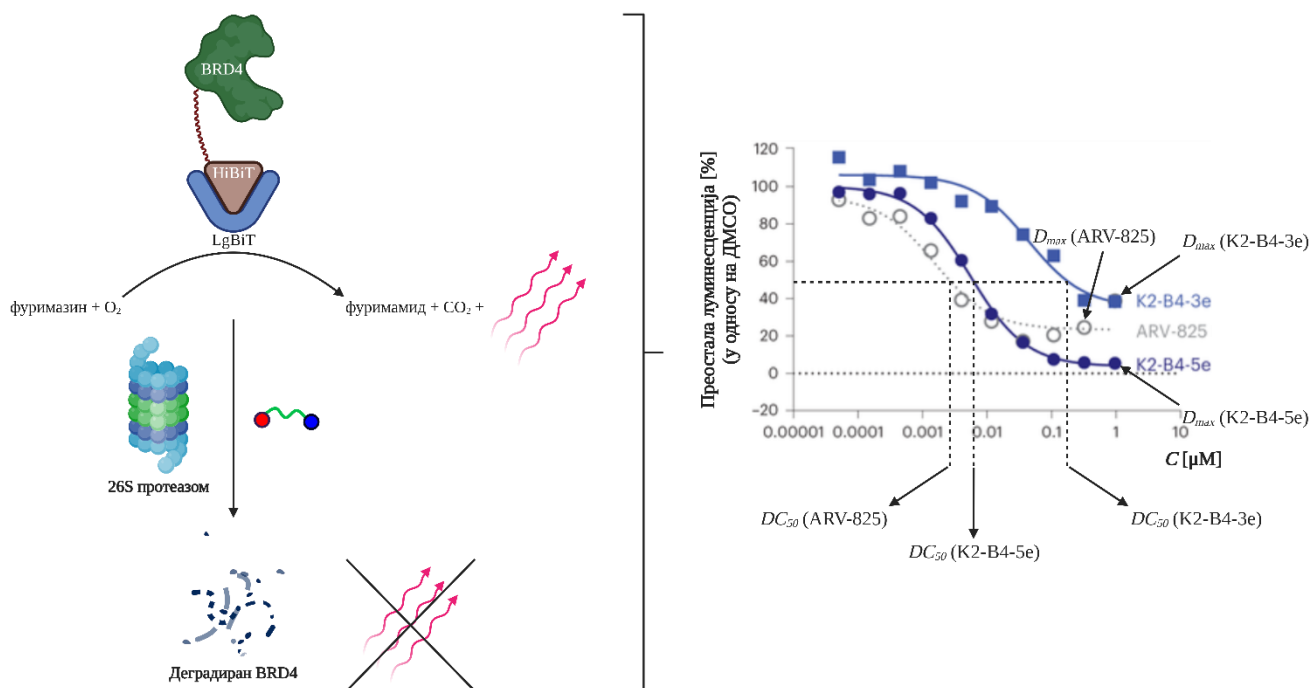
Слика 30. Праћење деградације BRD4 протеина *Western blot* анализом и квантификација деградационе активности испитиваних PROTAC молекула (GAPDH – глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа) [158]

Луминесцентни тестови засновани на *HiBiT* систему за карактеризацију деградације посредоване PROTAC молекулима

Репортерски системи засновани на *NanoLuc* ензиму адаптирани су као високо осетљиви тестови за праћење промена у садржају протеина изазваних деловањем деградера. *NanoBiT* технологија заснива се на подели *NanoLuc* ензима на мали пептид од 11 аминокиселина (*HiBiT*) и већи полипептид масе 18 kDa (*LgBiT*). Када се *HiBiT* фузионише са ПОИ, а *LgBiT* постави у одговарајући положај, њихова асоцијација реконституише активну *NanoLuc* луциферазу. Након

додавања *NanoLuc* супстрата (фуримазина или његовог стабилизованог аналога ендуразина), ензим емитује светлост. Због високог афинитета између *HiBiT* и *LgBiT*, сигнал луминесценције обезбеђује директну меру заступљености протеина обележеног *HiBiT*-ом у ћелијским лизатима или живим ћелијама и омогућава кинетичко праћење његове деградације.

Да би се проценила деградација BRD4 у ћелијском формату високе пропусне моћи, PROTAC молекули усмерени на BRD4 тестирани су у ћелијама уређеним CRISPR методом у којима је аминок-терминални *HiBiT* таг уведен на ендегеном BRD4 локусу, чиме је омогућено квантитативно мерење нивоа BRD4 путем луминесценције. Користећи (+)-JQ1 као лиганд који се везује за BRD4, аутори су припремили панел деградера BRD4 протеина који комбинују две архитектуре линкера са три типа лиганда за KLHDC2 Е3 лигазу (карбоксилна киселина, метил-естар и амид), при чему су амидни деривати служили као негативне контроле. У овом *HiBiT*-BRD4 систему, PROTAC молекули који носе лиганд за KLHDC2 у облику метил-естра изазвали су брз и ефикасан губитак BRD4 сигнала, постижући до 93% смањења у року од 4-6 сати. Криве доза-одговор за *HiBiT*-BRD4 луминесценцију регистроване су у широком опсегу концентрација PROTAC молекула. Практично, PROTAC молекули усмерени на BRD4, K2-B4-3e и K2-B4-5e, заједно са деградером ARV-825 који регрутује CRBN, профилисани су након 6 сати третмана у *HiBiT*-BRD4 тесту, при чему су добијене криве деградације зависне од концентрације из којих су израчунате вредности DC_{50} и D_{max} (Слика 31). За молекула K2-B4-3e, вредност DC_{50} је износила 66 nM уз D_{max} од 62%, док је K2-B4-5e дао DC_{50} од 6,2 nM и D_{max} од 93% [190].



Слика 31. Праћење деградације BRD4 протеина *HiBiT* анализом и квантификација деградационе активности испитаних PROTAC молекула [190]

1.6.7. Предности PROTAC технологије

Сажет преглед разлога због којих PROTAC технологија показује извесне предности у односу на друге фармаколошке стратегије дат је у наставку.

Могућност дејства на протеом који је фармаколошки недоступан

Процењује се да је само око 20-25% терапијски релевантних биолошких циљева погодно за конвенционални приступ процесу откривања лекова. У њих спадају киназе, рецептори спрегнути са Г протеином, нуклеарни хормонски рецептори и јонски канали [191,192]. Протеини без каталитичке активности или са функцијама независним од ње и даље се широко сматрају неподложним за фармаколошке интервенције [193], пре свега зато што тренутни терапијски модалитети не могу ефикасно деловати на њих. У такве биолошке циљеве спадају поједини транскрипциони фактори и скафолд протеини. Ови ПОИ су атрактивни и одређен напредак је постигнут блокирањем специфичних интеракција. Поред тога, агрегирани протеини, типични за неуродегенеративне болести као што су Алцхајмерова [194] и Хантингтонова болест [195], посебно су погодни за деградацију PROTAC молекулима. Иако је остварен напредак у инхибицији ППИ малим молекулима, ово поље остаје изазовно јер такви инхибитори морају реметити контакте распоређене преко великих међуповршина потребних за ППИ [196]. Насупрот томе, PROTAC молекули се могу везати за било које погодно место на ПОИ и изазвати биолошки ефекат. У реалности није неопходно блокирати каталитичку функцију или ППИ датог ПОИ – сваки његов лиганд може, начелно, послужити за дизајн деградера. PROTAC молекул, тј. његов лиганд за ПОИ, може се везати за различите регионе биолошког циља и бити и даље ефикасан ако покрене полиубиквитинацију и потом протеазомалну деградацију. Овакво теоријско проширење употребљивих места везивања омогућава фармаколошку интервенцију у деловима протеома који су тренутно недоступни традиционалним методама. Сходно томе, развој нових модалитета који малим молекулима могу да досегну терапијски релевантне протеине остаје приоритет. У том контексту, конвергенција структурних, биохемијских и ћелијских фактора у селективности PROTAC молекула представља значајан корак напред у односу на конвенционалну фармакологију, проширујући домет на протеине традиционално сматране недоступним, као што су скафолд протеини [197] или транскрипциони фактори [198]. Пошто PROTAC молекули делују уклањањем целог протеина, а не само инхибицијом његове активности, могу да одстране вишекомпонентне комплексе [199] или да прекину не-ензимске функције [200].

Могућност превазилажења фармакорезистенције у онкологији

Инхибитори киназа, обимно развијани последњих деценија [201], веома су ефикасни у лечењу карцинома, али фармакорезистенција и рецидиви су чести. Како PROTAC молекули елиминишу читав циљни протеин, могу се супротставити таквим механизмима резистенције. На пример, PROTAC L18I, који деградира мутирани облик ВТК, може да превазиђе лимфом резистентан на ибрутиниб узрокован мутацијом С481S [202].

Могућност избегавања акумулације циљних протеина

Поједини лекови доводе до акумулације својих биолошких циљева, чак и у кратком року, на два главна начина. Прво, везивање може стабилизovati протеин и продужити му полуживот [203], што је уочено код HER2 инхибитора лапатиниба [204], BRD4 инхибитора (+)-JQ1 [119] и MCL-1 инхибитора А-1210477 [205]. Друго, антагонизам може компензаторно изазвати транскрипционо повећање експресије ПОИ. На пример, AR супримира транскрипцију сопственог гена [206], па инхибиција AR-а повећава ниво иРНК која кодира AR, што коначно подиже количину AR-а и чини ћелије осетљивијим на ниске нивое андрогена. Таква усходна регулација може поткопати ефикасност инхибитора. Зато је уклањање ПОИ PROTAC молекулима повољно када биолошки циљеви постану неосетљиви на инхибиторе услед стабилизације или пораста експресије [11]. Код BRD4, чији инхибитори брзо губе ефекат услед пораста експресије, PROTAC молекули истовремено деградирају протеин и супримирају његову транскрипцију [119].

Могућност деловања на биолошке циљеве измењене мутацијама или интеракцијама са протеинима-партнерима

Тачкасте мутације често покрећу стечену резистенцију. У хроничним терапијама њихова појава је често неизбежна. То је добро документовано за анти-HIV агенсе [207] и за инхибиторе онколошки релевантних биолошких циљева као што су BCR-ABL, EGFR, ALK и BTK [11,208]. Такве мутације умањују афинитет инхибитора и ограничавају ефикасност. Резистенција може настати и без мутација: резистенција на JAK2 инхибиторе типа I приписана је преласку са JAK2:JAK2 хомодимера на JAK1:JAK2/TYK2 хетеродимере [209], што омогућава JAK1 и TYK2 да фосфорилишу JAK2 и реактивирају сигнализацију упркос инхибицији JAK2. Циљана деградација протеина PROTAC молекулима може превазићи ове механизме деградацијом мутираних биолошких циљева. Осим тога, деградација терапијски релевантних протеина може спречити асоцијације са помоћним протеинима изазване инхибиторима које доприносе резистенцији на примењене инхибиторе [11].

Унапређена селективност

Селективност је једна од кључних предности PROTAC технологије – омогућава прецизну деградацију терапијски релевантних протеина уз поштеду хомолога и смањење споредних ефеката [141]. За разлику од ODP концепта, где се супресија функције ослања углавном на протеин-лиганд интеракције, PROTAC молекули базирају селективност на више променљивих димензија: формирање ТК-а, кооперативност, приступачност површина протеина, ћелијски контекст и кинетика деградације [136,210]. Овај вишедимензионални механизам омогућава дискриминацију и међу структурно сличним биолошким циљевима и пружа оквир за фино подешавање фармаколошке прецизности. Постизање селективности према патогеним (нпр. мутираним) протеинима је тешко и тек је неколицина лекова заиста активнија према њима него према немутираним (енг. *wild-type*) формама протеина [11]. На пример, дабрафениб се везује за мутирани B-RAF(V600E) важан за меланом јаче него за немутирану форму протеина [211]. И даље је захтевно изазвати ефекат специфичан за мутиране, а не за блиско сродне немутирани протеине, али PROTAC технологија нуди другачији пут ка побољшаној селективности. Деградација протеина диктирана PROTAC молекулима тече у два корака: 1) PROTAC се веже за биолошки циљ; 2) регрутована E3 лигаза преноси убиквитин на неки изложени лизин тог биолошког циља. Док је први корак ограничен могућношћу да се изради селективан лиганд за ПОИ, други – завијан од просторног односа између изложених лизина и регрутоване E3 лигазе – може се подешавати тако да се постигне селективност чак и међу веома сродним протеинима [11]. На пример, PROTAC молекул заснован на (+)-JQ1, који се веже и за BRD2 и за BRD4, а регрутује VHL, показује око десет пута већу потентност у деградацији BRD4, иако (+)-JQ1 сам има готово идентичан афинитет за BRD2 и BRD4 [119,129]. Дакле, протеин који PROTAC молекул веже не мора нужно бити и деградиран.

Селективност диктирана тернарним комплексом

Формирање продуктивног ТК-а између PROTAC молекула, ПОИ и регрутоване E3 лигазе лежи у основи селективности. Иако бинарни афинитет PROTAC молекула за ПОИ утиче на вероватноћу везивања за тај протеин, кооперативност у формирању ТК-а често диктира да ли ће уследити убиквитинација и деградација. Више студија показало је да PROTAC молекули могу преференцијално деградирати једног члана породице протеина, чак и када се везују за више њих сличним афинитетом, услед разлика у стабилности ТК-а. Као што је већ наведено, PROTAC молекули усмерени на BET протеине показали су селективну деградацију BRD4, што се приписује повољнијој комплементарности површина са E3 лигазом у случају BRD4 протеина [129]. Ово илуструје да нековалентне ППИ унутар ТК-а могу обликовати селективност независно од почетног афинитета везивања.

Селективност диктирана линкером

И суптилне варијације у архитектури линкера могу пресудно променити профил деградације, чак и када лиганд за ПОИ и регрутер Е3 лигазе остају исти. Дужина линкера, његова флексибилност и место припајања одређују просторни распоред ПОИ и Е3 лигазе унутар ТК-а, а тиме утичу и на одвијање интеракција унутар њега. У више случајева, исти скелет PROTAC молекула са различитим линкерима довео је до различитих исхода (нпр. промене између деградације FKBP12 и FKBP12(F36V) [212], или између p38 α и p38 δ [141]). То потврђује да селективност није својство самих лиганада за ПОИ, већ својство целокупне архитектуре PROTAC молекула.

Искоришћавање биолошког контекста

Још један слој селективности проистиче из разлика у окружењу које влада у ћелијама. Експресија Е3 лигаза варира међу различитим ткивима и типовима ћелија, делујући као ендогени регулатор деградације. Тако је PROTAC молекул DT2216, који регрутује VHL, поштедео тромбоците и испољио преференцијалан ефекат у ћелијама леукемије и карцинома које су зависне од BCL-X_L [213]. Слично томе, протеини у стабилним мулти-подјединичним комплексима могу одолевати деградацији ако су кључни лизини стерно заклоњени или недоступни у форми комплекса [214].

Каталитички начин деловања

Агенси са каталитичким начином дејства могу се дозирати у субстехиометријским количинама у односу на своје биолошке циљеве, чиме се смањује изложеност потребна за постизање фармаколошког ефекта. Докле год се лиганд за ПОИ PROTAC молекула нековалентно везује за биолошки циљ, PROTAC молекул делује каталитички [215]. Ово се често одражава у изразитом повећању потентности: у директним поређењима, PROTAC молекул је изазвао снажнији утицај на пролиферацију ћелија и апоптозу од упоредног инхибитора [119]. Сходно томе, PROTAC молекули могу постићи и одржати деградацију биолошких циљева при ниским дозама. Њихова способност да обезбеде ефективну деградацију при релативно ниској изложености може побољшати терапијски индекс ограничавањем споредних дејстава, а тиме и токсичности [11].

EDP оквир и продужени биолошки ефекат

Када нековалентни инхибитори мале молекулске масе ишчезну са места деловања, сигнални путеви се обнављају и ефикасност опада. Насупрот томе, ковалентни инхибитори могу дати ефекте који трају дуже од њихове фармакокинетичке присутности [216]. Ибрутиниб је пример: ковалентно се везује за цистеин у активном месту ВТК-а и при дозирању 560 mg једном дневно постаје недетектабилан у плазми у року од 24 сата, док је ВТК протеин и даље готово у потпуности инхибиран [217]. Будући да PROTAC молекули индукују деградацију протеина, могу пружити фармаколошки профил сличан ковалентним инхибиторима. Другим речима, фармакодинамика PROTAC молекула не мора да прати њихову фармакокинетичку [218]. Ова дисоцијација између фармакокинетике и фармакодинамике (енг. *PK/PD decoupling*) нарочито је изражена код дугоживећих протеина, где се ресинтеза у ћелијама дешава споро. За краткоживеће протеине који имају висок промет ова предност се губи и потребна је континуирана изложеност PROTAC молекулу [11]. Тако се EDP концепт суштински разликује од ODP концепта, где лек мора континуирано да делује на свој биолошки циљ. Стога, три практичне предности EDP оквира су [11]:

- а) Изложеност деградеру не мора непрекидно да буде изнад фиксног ефикасног прага.
- б) Нижа изложеност деградеру смањује ризик од нежељених ефеката и токсичности услед споредног дејства, пошто селективност типично опада при високим концентрацијама инхибитора који припадају ODP концепту.

в) PROTAC молекули могу деградирати ПОИ и у присуству лиганда вишег афинитета или када ПОИ ступа у интеракцију са протеинима-партнерима. На пример, ако се АТФ (у случају киназа) или дихидротестостерон (у случају AR-a) везују за исто место високим афинитетом, PROTAC молекул дизајниран за дато место и даље може покренути деградацију, јер је довољно пролазно везивање. Осим тога, да би мали молекули нарушили ППИ високог афинитета, обично морају и сами имати врло висок афинитет [219], док се пренос убиквитина на ПОИ одвија брзо. Чак и када лиганд сам нема довољну потентност да ремети ППИ високог афинитета, његово укључивање у PROTAC молекул може ипак омогућити деградацију ПОИ који учествује у таквим ППИ. Стога, EDP концепт може да искористи неделотворне инхибиторе као лиганде за ПОИ у оквиру PROTAC молекула [11].

1.6.8. Изазови у дизајну PROTAC молекула

И поред изузетног фармаколошког потенцијала PROTAC молекула, њихов дизајн остаје суочен са комплексним изазовима. За разлику од конвенционалних малих молекула, PROTAC молекули су крупне, бифункционалне структуре, што намеће одређена ограничења и изазове.

PROTAC молекули као једињења изван „правила петице“

Дизајн PROTAC молекула је сам по себи захтеван. Повезивање два леколика лиганда линкером често даје хибрид са својствима која надилазе границе Липинскијевог правила петице, па настају тзв. једињења изван правила петице, тј. bRo5 (енг. *beyond Rule of 5*) једињења [220,221]. То може неповољно утицати на пермеабилност и оралну биорасположивост [222]. Ипак, многи PROTAC молекули имају способност пасивног пролаза кроз мембране и оралну биорасположивост [223]. Компанија *Arvinas* је, на пример, обелоданила да PROTAC молекул усмерен на тау протеин прелази крвно-мождану баријеру у претклиничком моделу тауопатије [224]. Ово указује да строго придржавање правилима петице није увек неопходно у медицинској хемији.

Ћелијска пермеабилност и величина молекула

Једно од најчешћих уских грла у развоју PROTAC молекула јесте слаба ћелијска пермеабилност [225]. Већина PROTAC молекула одступа од жељених физичко-хемијских параметара, нарочито у погледу моларне масе (често преко 800 g/mol), поларне површине и броја водоничних веза [226]. Иако је ово одступање од Липинскијевог правила петице често нужно, оно обично доводи до субоптималне пасивне дифузије кроз мембране. Емпиријски је показано да неки PROTAC молекули који показују деградациону активност у ћелијском лизату немају ефекат у интактним ћелијама. Овај несклад се најчешће приписује лошој пермеабилности, а не недовољном везивању за одговарајуће протеине или неуспешном формирању ТК-а [227]. Стратегије превазилажења овог проблема укључују дизајн интрамолекулских водоничних веза и подешавање поларности линкера, али такве модификације по правилу захтевају итеративно оптимизовање [228].

Оптимизација линкера

Линкер није проста спојница између два функционална домена, већ представља кључну детерминанту просторне оријентације, кооперативности и селективности. Ипак, оптимизација линкера је и даље углавном емпиријска. Дужина, ригидност, места везивања и хемијски састав линкера утичу на вероватноћу формирања функционалног ТК-а. Наизглед мале измене, као што су прелазак са алкилног на линкер заснован на ПЕГ-у [229] или промена места везивања линкера на лиганду [230], могу повећати деградациону активност, или обрнуто. Осим тога, оптималне особине линкера ретко се могу применити на различите биолошке циљеве, па се за сваки нови пар ПОИ-ЕЗ лигаза полази испочетка.

Да би се илустровала сложеност избора линкера, у Табели 6 је дат преглед честих изазова.

Табела 6. Одређени изазови повезани са линкером приликом дизајна PROTAC молекула

Изазов	Учени ефекат	Потенцијална стратегија
Прекомерна дужина линкера	Смањена стабилност ТК-а	Скратити или повећати ригидност
Субоптимално место припајања линкера	Могућ изостанак деградације биолошког циља	Поново одредити могућа места припајања линкера на основу SAR студија
Нестабилност линкера базираног на ПЕГ-у	Подложност оксидативном метаболизму	Заменити алкилним или спироцикличним јединицама
Линкери превише флексибилни за достизање нуклеарних биолошких циљева	Отежана нуклеарна локализација PROTAC молекула	Увести полуригидне линкере

Хемијска и метаболичка стабилност

Још једна велика препрека јесте хемијска и метаболичка разградња PROTAC молекула, нарочито *in vivo*. Многи линкери, посебно засновани на ПЕГ-у, осетљиви су на оксидативни метаболизам. Лиганди за Е3 лигазе, као што су они за CRBN или VHL, такође могу подлећи хидролизи или ензимској разградњи, смањујући ефективну концентрацију PROTAC молекула пре доласка на место деловања [231]. Структурне модификације усмерене на повећање стабилности, као што су редукција броја етарских група [232] или уграђивање стабилнијих система са прстеновима [231], показале су успех у појединачним случајевима. Међутим, такве промене могу нарушити геометрију ТК-а, па је потребно пажљиво балансирање између метаболичке заштите и ефикасности деградације.

Фармакокинетика и биорасположивост

У поређењу са традиционалним лековима, PROTAC молекули често имају субоптималне фармакокинетичке особине. Велика моларна маса и изражена поларност умањују оралну биорасположивост и повећавају плазматски клиренс, а често су присутни и проблеми са растворљивошћу који отежавају формулацију. Постоје студије о побољшању фармакокинетичких особина применом стратегија пролекова [233] или снижавањем поларности путем интрамолекулских водоничних веза [234]. Ипак, већина ових приступа још увек није прерасла у стандардизована, широко примењива решења.

Могућа ограничења од стране ћелија

Чак и када је PROTAC молекул активан и стабилан, његова ефикасност може бити ограничена биолошким контекстом. Биолошки циљеви смештени у мембрани, органелама или чврсто регулисаним комплексима могу бити физички недоступни регрутованој Е3 лигази. Слично, ако су ПОИ или Е3 лигаза недовољно експримирани, деградација може изостати и поред повољног формирања ТК-а *in vitro*.

1.6.9. Изгледи за PROTAC молекуле

Полазећи од структуре PROTAC молекула, намеће се више кључних питања [235]:

- Да ли молекул уопште може ући у ћелију?
- Колика је вероватноћа да ће бити метаболички стабилан?
- Да ли је могуће спровести рационалну SAR студију?
- Да ли ће молекул бити растворљив у води?
- Хоће ли показати селективност у деградацији?

- ђ) Да ли се очекује прихватљив безбедносни профил?
- е) У којој мери се уклапа у Липинскијево правило петице?
- ж) Да ли је његова хемијска синтеза изводљива и економски одржива?
- з) Да ли се PROTAC технологија може широко применити на разноврсне ПОИ?

Ипак, највећа предност PROTAC технологије можда лежи у способности да омогући модулацију делова протеома који су се раније сматрали фармаколошки недоступним. До сада је деградација протеина индукована PROTAC молекулима успешно примењена на различите ПОИ, укључујући протеазе, нуклеарне хормонске рецепторе, епигенетске регулаторе и киназе. Процењује се да PROTAC молекули могу деловати на приближно 80% протеома [236]. С друге стране, постоје и значајна ограничења: дуге синтетичке путање, могуће присуство више стереоцентра, склоност ка некристалним формама [237] и захтевно физичко-хемијско профилисање. Упркос томе, досадашња искуства указују да молекули засновани на EDP концепту могу снажно утицати на будући развој лекова. Додатно, PROTAC технологија може постати кључни алат медицинске хемије омогућавајући приступ раније недоступним деловима протеома [30].

1.6.10. Одабрани PROTAC молекули у клиничким студијама и први регистровани представник

Више од 30 PROTAC молекула дошло је до клиничких испитивања. Већина њих је усмерена на онколошка стања, али се поље шири и ка имунолошким и инфламаторним обољењима. Табела 7 приказује особине одабраних PROTAC молекула који се испитују у клиничким студијама.

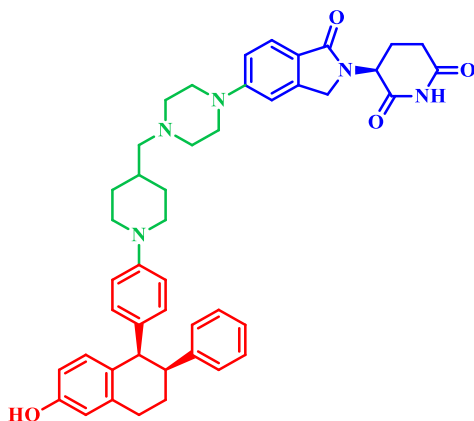
Табела 7. Одабрани PROTAC молекули у клиничким испитивањима

Једињење	Биолошки циљ	Фаза	Компанија	Индикација(е)	Реф.
ARV-110 (бавдегалутамид)	AR	II	<i>Arvinas</i>	Метастатски рак простате отпоран на кастрацију	[238]
ARV-766 (луксдегалутамид)	AR	I/II	<i>Arvinas</i>	Метастатски рак простате отпоран на кастрацију	[239]
CC-94676 (гридегалутамид)	AR	I	<i>BMS/Celgene</i>	Метастатски рак простате отпоран на кастрацију	[240]
BGB-16673 (катадегбрутиниб)	BTK	I/II	<i>BeiGene</i>	Малигнитети Б-ћелија	[241]
NX-2127 (зелебрудомид)	BTK и IKZF1/3	I	<i>Nurix Therapeutics</i>	Малигнитети Б-ћелија	[242]
KT-474 (типасертидег)	IRAK4	I	<i>Kymera Therapeutics</i>	Атопијски дерматитис, супуративни хидраденитис	[243]
KT-333 (лиродегимод)	STAT3	I	<i>Kymera Therapeutics</i>	Хематолошки малигнитети	[244]

Ови агенси одражавају различите дизајнерске приступе: неки теже селективној деградацији (нпр. ARV-110 за AR), док други циљају више биолошких циљева (нпр. NX-2127 за BTK и IKZF1/3). Већина регрутује CRBN или VHL као E3 лигазу, при чему свака опција носи специфичне импликације које се тичу дистрибуције у ткива, профила деградације и ризика од споредних ефеката.

Велика прекретница у развоју PROTAC молекула десила се 1. маја 2026. године када је FDA одобрила лек *VEPPANU* (вепдегестрант, ARV-471, Слика 32), први регистровани PROTAC молекул. Вепдегестрант је деградер ER-а који показује оралну биорасположивост, откривен је

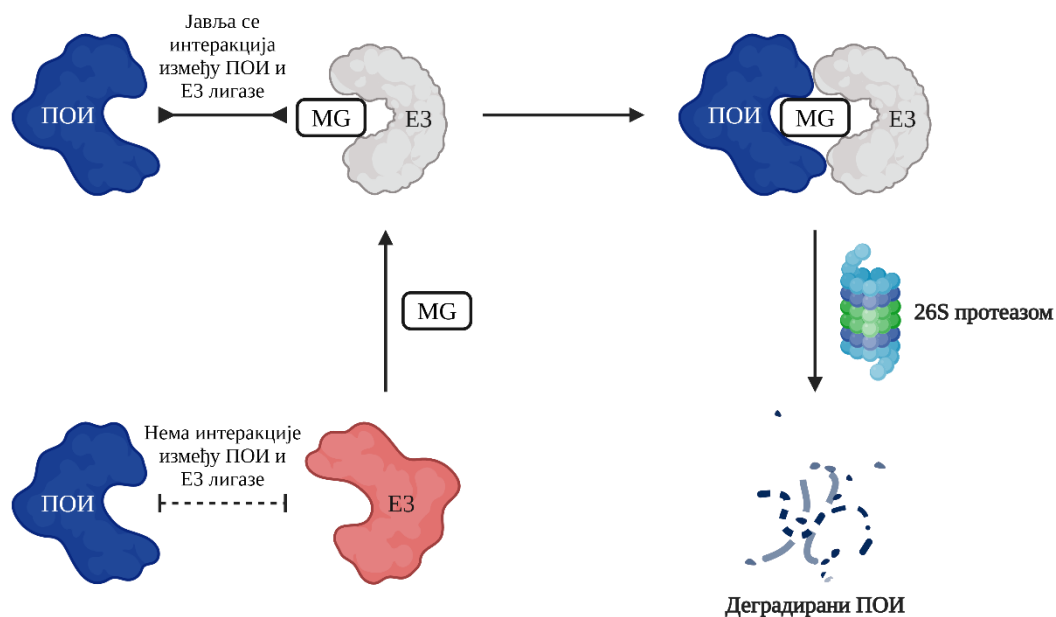
од стране компаније *Arvinas* у сарадњи са компанијом *Pfizer*, а одобрен је као монотерапија за одрасле особе са ER+/HER2- узнапредовалим или метастатским карциномом дојке који има мутирани *ESR1* ген, а након прогресије болести после најмање једне линије ендокрине терапије. Одобрење је уследило након III фазе клиничког испитивања у студији „VERITAC-2“, где је вепдегестрант побољшао преживљавање без прогресије болести у поређењу са фулвестрантом код пацијената који имају мутирани *ESR1* ген, смањујући ризик од прогресије болести или смрти за 43% и продужавајући медијану преживљавања без прогресије болести са 2,1 на 5 месеци [245]. Ова регистрација чини вепдегестрант првим регистрованим леком заснованом на PROTAC технологији и представља важну клиничку потврду циљане деградације протеина као терапијског модалитета.



Слика 32. Хемијска структура вепдегестранта

1.7. Проширење репертоара за разградњу протеина: молекулски лепкови

Као допуна бифункционалним PROTAC молекулима, молекулски лепкови (MGs) појавили су се као алтернативно решење за циљану деградацију протеина. Молекулски лепак представља моновалентни мали молекул (типично моларне масе испод 500 g/mol) који индукује блискост између E3 убиквитин лигазе и циљног протеина стабилизацијом новоформиране протеин-протеин међуповршине (Слика 33) [246]. Суштински, молекулски лепак се везује на међуповршини два протеина, најчешће између рецептора за супстрат E3 лигазе и циљног протеина, „лепећи“ их један за други и подстичући убиквитинацију циљног протеина. Молекулски лепкови преобликују површину једног протеина (често E3 лигазе) тако да он може ефикасно да делује на други протеин. Међуповршинским везивањем за оба протеина, MGs стварају везивну површину која не постоји без њих. Другим речима, молекулски лепак ефективно репрограмира специфичност E3 лигазе према супстратима, „варајући“ је да циљни протеин препозна као супстрат за деградацију. Једном када се формира ТК, каскада убиквитинације одвија се као и код природних супстрата, где се обележава одређени протеин за деградацију посредством 26S протеазома. Кључно је да се сам молекулски лепак не троши у овом процесу и да се, након што је циљни протеин деградиран, може укључити у нови циклус деградације протеина, слично PROTAC молекулима. Овај каталитички начин дејства лежи у основи потентности молекулских лепкова.



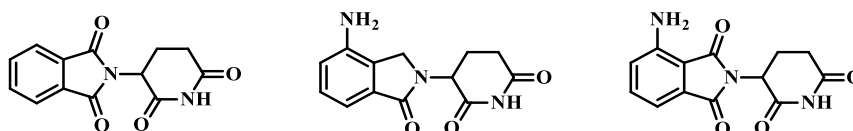
Слика 33. Механизам дејства MGs

Сам термин „молекулски лепак“ првобитно је уведен у контексту имуносупресива (циклоспорин А, такролимус) који доводе до формирања ТК-а између протеина [247], али се данас превасходно односи на мале молекуле који каталитички регрутују ЕЗ лигазе ка новим супстратима ради њихове деградације. Слично ТК индукованим PROTAC молекулима, и комплекси формиранли деловањем MGs често показују кооперативно везивање, што значи да се циљни протеин и ЕЗ лигаза међусобно везују снажније у присуству него у одсуству оваквих лиганата. Висок степен позитивне кооперативности представља обележје ефикасних MGs, јер одражава стабилан ТК оптимизован за пренос убиквитина [248].

1.7.1. Одабрани примери MGs

Талидомид

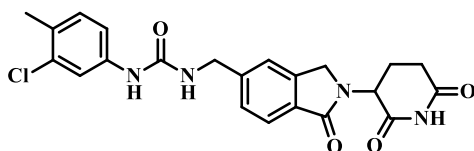
Пример молекулског лепка је талидомид – лек иницијално озлоглашен због своје тератогености, који је касније пренамењен као антитуморски агенс. Две независне студије разјасниле су биолошке ефекте овог молекула. Када је везан за CRBN, талидомид, као и његови аналози леналидомид и помалидомид (Слика 34), подстичу регрутовање одређених лимфоидних транскрипционих фактора (IKZF1 и IKZF3) ка CRBN-у, што резултује њиховом убиквитинацијом и протеазомалном деградацијом. Другим речима, талидомид делује као молекулски лепак, премошћујући CRBN и нове супстрате (*Ikaros* цинк-прст протеине) који иначе не били препознати од стране ове ЕЗ лигазе [118,249].



Слика 34. Хемијске структуре талидомида, леналидомида и помалидомида

Деградација IKZF1/3 у ћелијама мултиплог мијелома (ММ) данас се сматра основом клиничке ефикасности аналога талидомида, пошто губитак ових транскрипционих фактора доводи до умирања малигнућ ћелија и модулације имунолошког микроокружења [118,250]. Ово откриће

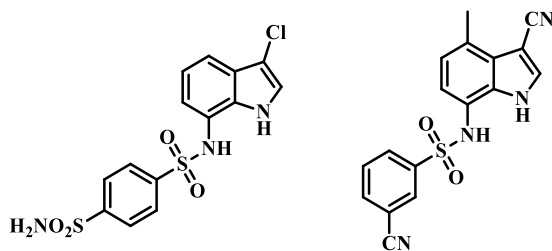
је накнадно указало на талидомид и његове деривате као прототипске MGs, подстичући њихову употребу као лиганада који се везују за E3 лигазу у дизајну PROTAC молекула. Важно је истаћи да су леналидомид и помалидомид показали већу потентност као молекулски лепкови у односу на талидомид, јер регрутују IKZF1/3 са већим афинитетом захваљујући додатним супституцијама на фталимидном прстену [148]. Сва три IMiD једињења данас су одобрена од стране FDA за онколошке индикације, чиме се овакав механизам деловања показао валидним и у клиничкој пракси. Поред тога, истраживања у медицинској хемији компанија *Celgene* и *Bristol Myers Squibb* проширила су додатно ову област. На пример, једињење CC-885 (Слика 35) развијено је тако да регрутује другачији неосупстрат, фактор завршетка транслације GSPT1, ка CRBN-у. Једињење CC-885 индукује селективну деградацију GSPT1 (са минималним ефектом на IKZF1/3) и представља пример како модификација структуре молекулског лепка може да одреди који ће дегрон на протеину бити препознат [251]. Таква открића наглашавају да се MGs који регрутују CRBN могу генерално усмерити на велики број протеина који садрже одговарајућа места за везивање (посебно C2H2 цинк-прст дегрон [252] или петљу богату глицином [253]).



Слика 35. Хемијска структура једињења CC-885

Арил-сулфонамиди

Друга прекретница у открићу MGs потекла је од антиканцерских сулфонамида као што су E7070 (индисулам) и E7820 (Слика 36). Ови молекули ушли су у клиничка испитивања као хемотерапеутици са непознатим механизмом дејства и показали тек умерену ефикасност, што је подстакло напоре да се идентификује њихов биолошки циљ.



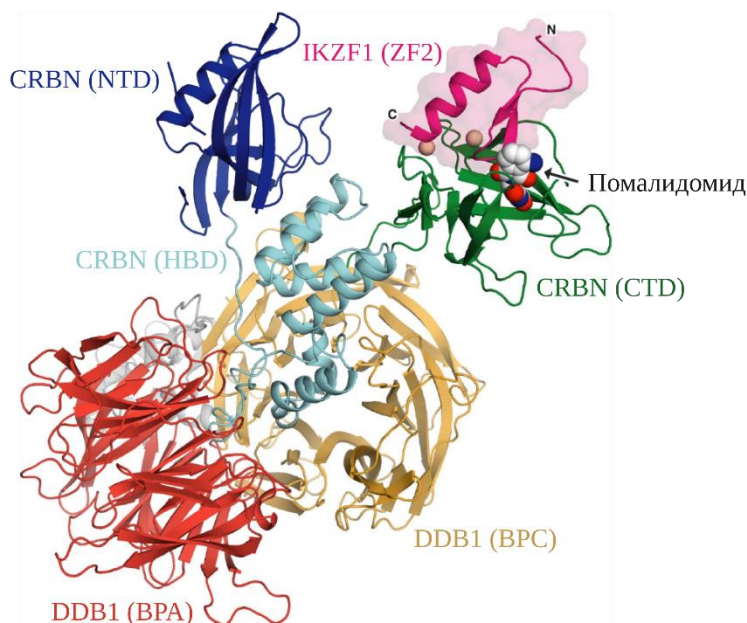
Слика 36. Хемијске структуре једињења E7070 (индисулам) и E7820

У периоду 2017-2019. године више студија је показало да indisulam и сродни арил-сулфонамиди функционишу као MGs који регрутују фактор сплајсовања RBM39 ка CUL4-DDB1-DCAF15 E3 убиквитин лигази. Овај мали молекул се везује за плитак џеп рецептора за супстрат DCAF15 и функционално преобликује ову површину тако да препознаје RBM39 као супстрат. Настали ТК (DCAF15-сулфонамид-RBM39) покреће убиквитинацију и протеазомалну деградацију RBM39, што доводи до нарушавања хомеостазе сплајсовања РНК и смрти туморских ћелија [254–256]. Интересантно је да се RBM39 и његов блиски хомолог RBM23 селективно деградирају на овај начин, што објашњава активност арил-сулфонамида у модулатији сплајсовања [257]. Овај механизам је откривен ретроспективно. Индисулам је

идентификован деценијама раније путем фенотипских скрининга [258], али накнадно сазнање о његовом механизму дејства омогућава рационалну примену арил-сулфонамида.

1.7.2. Начин везивања MGs

На молекулском нивоу, MGs делују тако што се везују за комплементарне површине на два протеина која треба да буду доведена у међусобни контакт. Типично, молекулски лепак се везује у већ постојећи џеп или жлеб на једном протеину (често на рецепторској подјединици E3 лигазе), истовремено остварујући контакте и са другим протеином, ефективно делујући као лепак између њих. Ово је добро илустровано комплексом CRBN-IMiD-IKZF1 (Слика 37). Кристална структура показује да је леналидомид (и други IMiD деривати) смештен у џепу за везивање талидомида на CRBN-у и да истовремено остварује интеракције са кључним аминокиселинским остацима цинк-прст домена протеина IKZF1, чиме премошћује ова два протеина. Мали молекул испуњава шупљину у CRBN-у која иначе везује ендogene лиганде (или „дегрон“ пептид) и на тај начин ствара нову, композитну површину која одговара IKZF1 [252,259]. У одсуству лиганда, таква међуповршина не постоји. Другим речима, молекулски лепак стабилизује међуповршину између E3 лигазе и супстрата који се иначе не би међусобно повезали.



Слика 37. Кристална структура ТК-а CRBN-помалидомид-IKZF1 (ZF2) која илуструје механизам деловања молекулског лепка. CRBN (NTD) – N-терминални домен цереблona; CRBN (HBD) – домен хеликсног снопа цереблona; CRBN (CTD) – C-терминални домен цереблona; DDB1 (BPA) – β -пропелер А домен протеина 1 који везује оштећену ДНК; DDB1 (BPC) – β -пропелер Ц домен протеина 1 који везује оштећену ДНК; IKZF1 (ZF2) – други домен типа цинк-прст протеина 1 из фамилије *Ikaros* цинк-прст протеина [252]

Структурне студије са MGs који регрутују DCAF15 слично су показале да се арил-сулфонамиди везују за плитак, неконзервиран џеп на DCAF15 и индукују стварање комплементарне површине на којој се може усидрити мотив за препознавање РНК протеина RBM39 [255,256]. Значајно је да су ови џепови за везивање на E3 лигазама често прилично ригидни или подложни индукованом прилагођавању, тј. лиганд може да изазове конформациону промену у E3 лигази која омогућава смештање циљног протеина. Ослоњеност на структурну прилагодљивост E3 лигаза објашњава зашто се само одређене лигазе лако могу функционализовати уз MGs. CRBN и DCAF15 су чланови CUL4 фамилије и садрже релативно

прилагодљива места за везивање која се могу искористити молекулским лепковима. Друге лигазе, као што су KEAP1 [260] или SCF^{β-TrCP} [261], такође су регрутоване деловањем MGs.

Важан параметар функције молекулских лепкова јесте кооперативност везивања. Успешан молекулски лепак често показује позитивну кооперативност, што значи да присуство лиганда значајно побољшава афинитет између Е3 лигазе и супстрата. Уопштено посматрано, структурно обележје MGs јесте да један мали молекул постаје интегрални део протеин-протеин међуповршине, ефективно делујући као молекулски скелет који држи Е3 лигазу и циљни протеин заједно у прецизној оријентацији неопходној за пренос убиквитина.

1.8. Молекули за хидрофобно обележавање протеина

У оквиру метода које проистичу из концепта циљане деградације протеина, хидрофобно обележавање (енг. *Hydrophobic Tagging*, НуТ) користи ћелијске системе контроле квалитета специфичним механизмом. За разлику од PROTAC молекула или MGs који користе УПС регрутовањем Е3 лигаза, НуТ молекули делују изазивајући дестабилизацију биолошких циљева имитирањем хидрофобних површина типичних за денатуриране протеине.

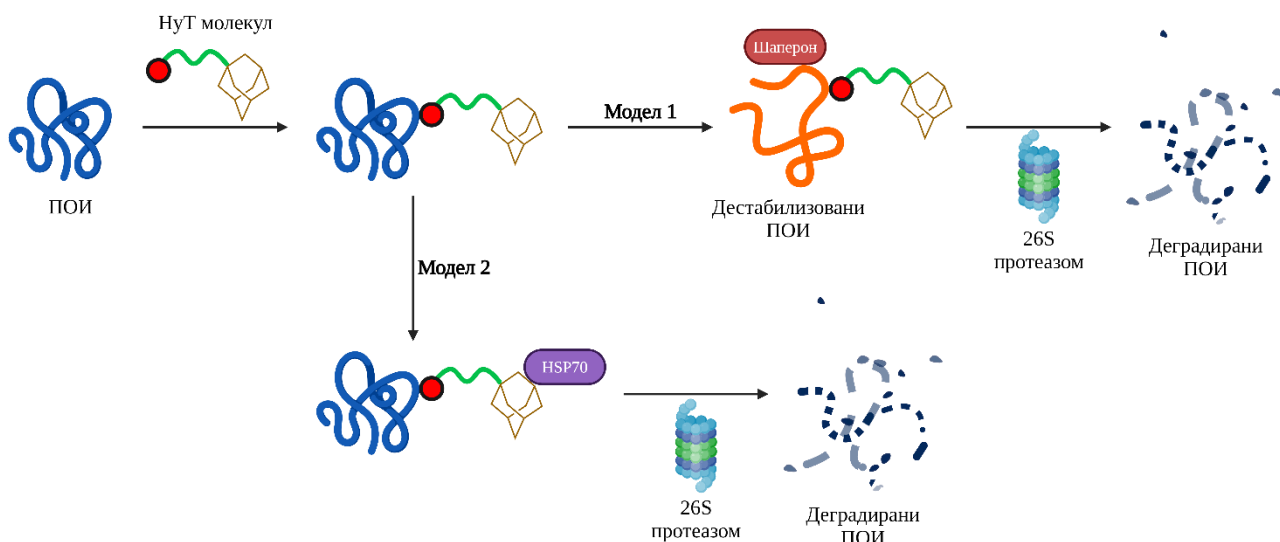
1.8.1. Концепт хидрофобног обележавања

Полазиште концепта НуТ молекула је ћелијски надзор над протеинском хомеостазом. У случају исправних протеина, хидрофобни остаци су углавном скривени у протеинском језгру. Њихова изложеност, карактеристична за денатуриране протеине, служи као сигнал за активирање ћелијских система за деградацију. Ово је искоришћено НуТ молекулима тако што се хидрофобна група повезује са лигандом који се везује за циљни протеин, чиме се у ћелији вештачки приказује стање денатурисаности протеина. Овако конструисана хидрофобна површина на протеину не мора подразумевати стварну конформациону промену у њему, али доводи до тога да ћелија препозна протеин као дефектан. Стога се он обележава за накнадну деградацију, најчешће путем протеазома. Такав приступ заобилази потребу за специфичним регрутовањем Е3 лигазе или формирањем ТК-а.

1.8.2. Механизам дејства

Деградација коју покрећу НуТ молекули одвија се кроз неколико кључних корака, како је приказано на Слици 38 [262]. Прво долази до везивања за биолошки циљ, где лиганд мале молекулске масе, као део НуТ молекула, специфично препознаје одређено место на ПОИ. Овај корак је сличан класичним инхибиторима, иако сврха није инхибиција функције протеина. Потом се излаже хидрофобно обележје. НуТ молекул садржи липофилну групу (најчешће адамантил, *tert*-бутил и сл.) која је стерно и хемијски различита од поларних површина протеина. Када се НуТ молекул веже за ПОИ, ова хидрофобна група постаје изложена на површини и делује као сигнал да је протеин дестабилизован. Системи контроле квалитета, нарочито механизми који укључују шапероне, тумаче овај сигнал као показатељ денатурисаног протеина или протеина склоног агрегацији, чиме се покреће каскада деградације. На крају, протеин бива усмерен ка протеазому – непосредно или преко путева посредованих шаперонима – што завршава његовом разградњом.

Треба нагласити да тачан механизам препознавања хидрофобног обележја – да ли директно укључивање протеазома (Модел 1) или посредни путеви који укључују HSP70 или Е3 лигазе (Модел 2) – још увек није у потпуности разјашњен [263,264]. Ипак, експериментални подаци указују да НуТ молекули ефикасно снижавају нивое протеина без потребе за ковалентном модификацијом или формирањем ТК-а [265].



Слика 38. Предложени механизми деловања НуТ молекула [264]

1.8.3. Разлике у односу на PROTAC молекуле и MGs

НуТ молекули се суштински разликују од PROTAC молекула и MGs у више аспеката приказаних у Табели 8.

Табела 8. Резиме главних разлика између НуТ молекула, PROTAC молекула и MGs

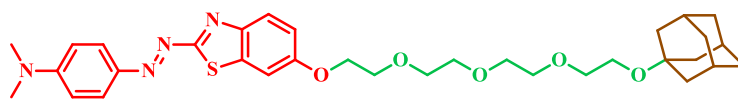
Карактеристика	НуТ молекули	PROTAC молекули	MGs
Пут деградације	УПС, путем сигнала денатурираних протеина	УПС, путем регрутовања Е3 лигазе	УПС, путем индукованих интеракција протеина
Потреба за регрутовањем Е3 лигазе	Не	Да	Да
Формирање тернарног комплекса	Не	Да	Да
Потреба за местом за везивање на биолошком циљу	Специфично место за везивање на биолошком циљу	Специфична места за везивање и на биолошком циљу и на Е3 лигази	Специфично место за везивање на Е3 лигази
Субстехиометријска активност	Не	Да	Да

Заобилажење регрутовања Е3 лигазе омогућава НуТ молекулима да делују на протеине који немају површине компатибилне за интеракцију са Е3 лигазама. Поред тога, НуТ молекули често имају једноставније структуре и мању моларну масу, што им потенцијално обезбеђује израженија леколика својства и већу синтетску доступност.

1.8.4. Примена НуТ молекула

Иако се значајан део литературе везан за концепт циљане деградације протеина бави PROTAC молекулима, више студија показује корисност НуТ молекула, нарочито у ситуацијама када класична инхибиција или деградација зависна од убиквитина нису изводљиве. На пример, у истраживањима која су испитивала деградацију агрегираних протеина или протеина нарушене структуре показано је да НуТ молекули омогућавају ефикасно уклањање биолошких циљева који су иначе резистентни на деградацију. У моделима неуродегенеративних болести, код којих

постоји агрегација протеина (нпр. тау и хантингтин), коришћење НуТ молекула је проучавано као алтернативна стратегија (Слика 39) [266,267]. Ови протеини често измичу уобичајеним путевима деградације, али обележавање хидрофобним групама поново омогућава да буду препознати од стране протеазома.



Слика 39. Хемијска структура НуТ молекула који индукује деградацију мутираног хантингтина. Лиганд за ПОИ је приказан црвеном бојом, линкер је приказан зеленом бојом и хидрофобно обележје је приказано браон бојом. Ове боје биће доследно коришћене у читавом тексту ради означавања одговарајућих компоненти свих НуТ молекула који ће бити представљени.

1.8.5. Фармаколошка разматрања

За разлику од PROTAC молекула, који често премашују моларну масу од 800 g/mol, НуТ молекули су обично мањи, што им може побољшати фармакокинетичка својства [268]. Како се деградација заснива на препознавању хидрофобности на површини ПОИ, а не на прецизној, каталитичкој деградацији, прозор селективности је ужи. Зато је пажљиво фармакодинамичко профилисање од посебног значаја.

Сажетак фармаколошких и механистичких предности и ограничења НуТ молекула дат је у Табели 9.

Табела 9. Предности и ограничења НуТ молекула

Аспект	Предности	Ограничења
Једноставност	Нема потребе за ТК-ом	Ризик од споредних хидрофобних интеракција и потенцијално нижа селективност
Укљученост Е3 лигазе	Не зависе од лиганада за Е3 лигазе	Мање дефинисан механизам, мање могућности за подешавање дејства
Дејство на биолошке циљеве	Корисни за протеине склоне агрегацији или не-ензимске биолошке циљеве	Нема каталитичког дејства

Хидрофобно обележавање представља другачији модалитет у оквиру концепта циљане деградације протеина. Специфичним механизмом дејства заобилази се потреба за регрутовањем Е3 лигазе и омогућава деградација изазовних биолошких циљева, укључујући агрегиране протеине. Иако за сада нису развијени у мери као PROTAC молекули, НуТ молекули показују значајан претклинички потенцијал, нарочито у неуролошким обољењима и стањима у којима се дешава агрегација протеина. Дубље разумевање фармакодинамике ових молекула, нарочито са аспекта селективности дејства, неопходно је за њихову ширу примену.

1.9. Значај HSP90 за функцију ћелија

Протеин топлотног шока 90 (енг. *Heat Shock Protein 90*, HSP90) је шаперон и хомодимер чији *N*-терминални (NTD) АТПазни домен, средишњи домен (MD) за везивање протеина-клијената (енг. *client proteins*) и *C*-терминални домен (CTD) за димеризацију заједнички стабилизују бројне протеине-клијенте. Две изоформе, HSP90 α и HSP90 β , налазе се у цитосолу, док се паралоли GRP94 и TRAP1 налазе у ендоплазматском ретикулуму и митохондријама. HSP90 има кључну улогу у одржавању хомеостазе протеина, нарочито у условима ћелијског стреса [269]. У онкогеним контекстима HSP90 омогућава конформационе промене, сазревање и стабилизацију низа сигналних протеина и транскрипционих регулатора, чија би лоша конформација или дестабилизација иначе онемогућила туморигенезу. У многим студијама, HSP90 се доследно издваја као централни фактор који омогућава функције малигну протеина, што га чини рањивом тачком у карциномима које карактерише протеотоксични стрес или ослањање на нестабилне протеине. За разлику од класичних путева конформационих промена протеина, систем који укључује HSP90 је јединствено прилагођен очувању функције мутираних, прекомерно експримираних или онкопротеина склоних агрегацији.

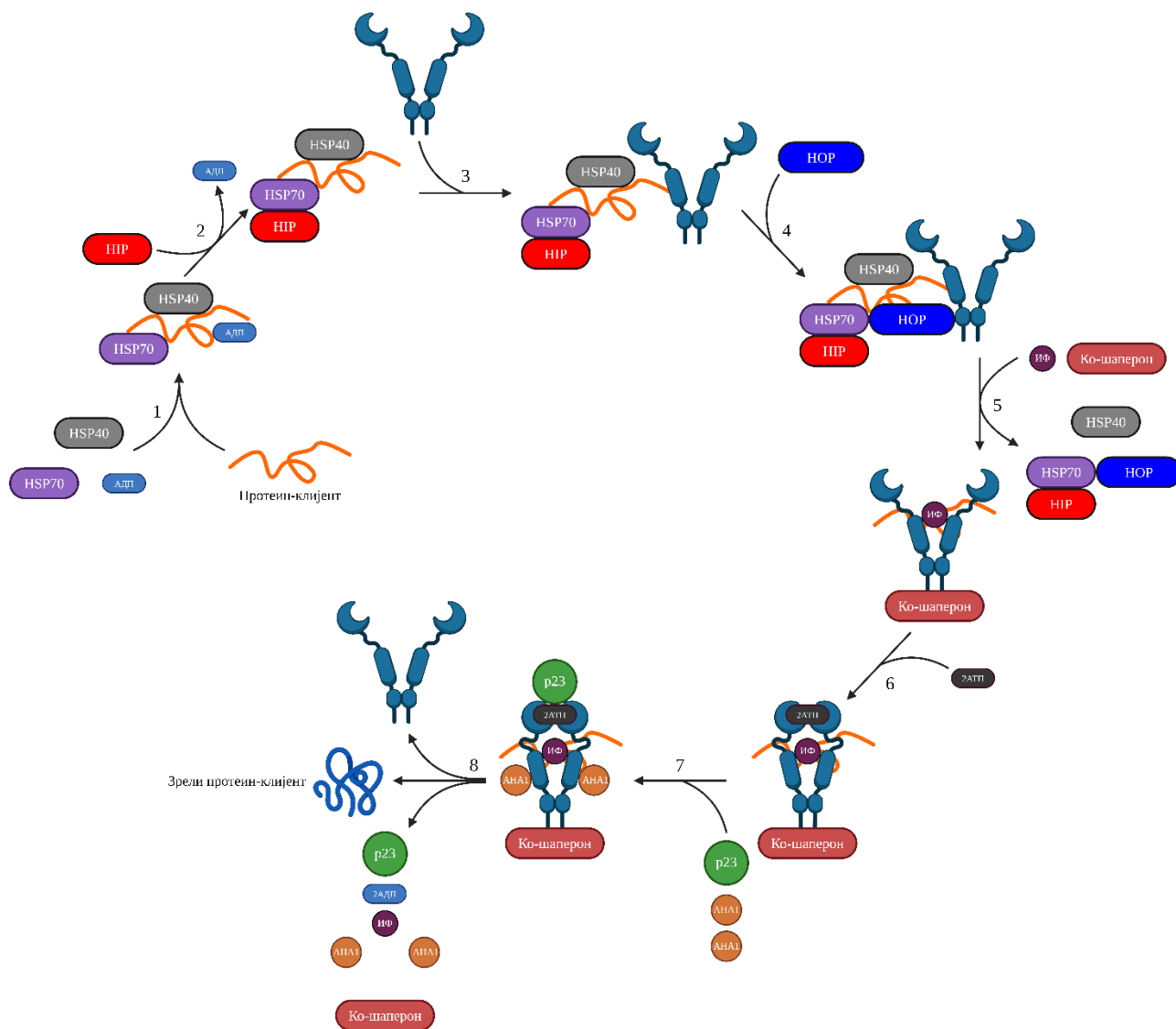
1.9.1. Механизам одвијања конформационих промена протеина посредованих HSP90

Детаљни механизам којим HSP90 посредује у одвијању конформационих промена протеина [270] укључује узастопне интеракције са протеинима-клијентима и ко-шаперонима (Слика 40):

- 1) Протеин-клијент, било полипептид неодговарајуће структуре или новосинтетисани ланац, најпре се везује за комплекс HSP70/HSP40/АДП који га штити од агрегације [271].
- 2) Тај комплекс се додатно стабилизује деловањем HIP-а или BCL-2, који подстичу замену АДП-а за АТП [272].
- 3) HSP90 преузима протеин-клијент кога држи комплекс HSP70/HSP40 да би започео своју активност.
- 4) Интеракцију HSP70-HSP90 повезује адаптер HOP [273]. Ко-шаперон CDC37 неопходан је за позиционирање киназа-клијената на HSP90 [274]. У складу са својим положајем у шаперонској мрежи, HSP90 делује касно у каскади конформационих промена, помажући протеинима-клијентима који су већ делимично прошли конформационе промене, али још нису у стабилној конформацији. Овај шаперон функционише кроз динамички конформациони циклус који зависи од АТП-а, где прелази између „отворене“ (стање мировања) и „затворене“ конформације (стање деловања). Везивање АТП-а за HSP90 изазива структурне промене у њему које омогућавају дејство на протеине-клијенте [275]. Процес даље координишу ко-шаперони, као што су CDC37 [276], p23 [277], АНА1 [278] и други. Ко-шаперони утичу на специфичност према протеинима-клијентима и брзину циклуса. На пример, CDC37 је кључан за регрутовање киназа [276], док АНА1 стимулише АТПазну активност и убрзава циклус [278]. Уз ове кофакторе, HSP90 ефикасно обрађује протеине-клијенте високе комплексности као што су транскрипциони фактори (нпр. *c-Myc* [279]), регулатори хроматина (нпр. *RSC Complex* [280]) и киназе (нпр. АКТ [281]).
- 5) По преносу протеина-клијента, додатни ко-шаперони и имунофилини (FKBP51, FKBP52) придружују се HSP90 хомодимеру, формирајући активирани хетеропротеински комплекс, док се HSP70, HSP40, HIP и HOP ослобађају [282].
- 6) Везивање АТП-а за NTD HSP90 унутар овог комплекса покреће прелаз из „отворене“ у „затворену“ конформацију [283], коју карактерише уврнут и компактни димер у коме се NTD и MD приближавају и заједно формирају подељено АТПазно место [277]. Бројни инхибитори HSP90 делују у овој тачки, такмичећи се са АТП-ом за NTD, што доводи до протеазомалне деградације протеина-клијента [284].

7) Ако се циклус одвија без дејства инхибитора, додатни ко-шаперони, укључујући p23 и АНА1, асоцирају са комплексом.

8) Везивање АНА1 за MD стимулише хидролизу АТП-а, подстиче конформационе промене одговарајућег протеина-клијента и убрзава ослобађање имунофилина и ко-шаперона [277]. Након хидролизе АТП-а и сазревања протеина-клијента, HSP90 се враћа у „отворену“ конформацију и циклус почиње изнова.



Слика 40. Молекулски механизам одвијања конформационих промена протеина-клијента који се дешава у оквиру шаперонског циклуса HSP90 (HSP70 – протеин топлотног шока 70; HSP40 – протеин топлотног шока 40; HIP – протеин који интерагује са HSP70; HOP – организациони протеин HSP70-HSP90; ИФ – имунофилини; АНА1 – активатор хомолога 1 АТПазе протеина топлотног шока од 90 kDa) [285]

1.9.2. HSP90 као централни регулатор „обележја рака“

HSP90 је веома заступљен молекуларни шаперон неопходан за одвијање потребних конформационих промена и активност разноликих протеина-клијената, посебно многих сигналних киназа и стероидних рецептора. Пошто изузетно велики број ових протеина-клијената лежи у основи карактеристика својствених туморима познатих као шест „обележја

рака“ (енг. *six „hallmarks of cancer“*), HSP90 машинерија је позиционирана у сржи физиологије ћелија рака и представља терапијску мету чија је инхибиција доспела до различитих фаза клиничког испитивања. Шест „обележја рака“ могу бити дефинисана као заједничке функционалне способности које подржавају малигни раст. Ово укључује [286]:

- 1) аутономну сигнализацију раста,
- 2) неосетљивост на инхибицију раста,
- 3) избегавање програмиране ћелијске смрти,
- 4) неограничену репликацију,
- 5) перзистентну ангиогенезу и
- 6) инвазију и метастазирање.

Свеприсутна улога HSP90 у нормалној и дисрегулисаној сигнализацији говори о важном доприносу овог шаперона у успостављању оваквих обележја [287–292].

1.9.3. Стабилизација онкогених протеина-клијената

HSP90 је неопходан за одржавање структуре онкогених протеина чија је конформациона стабилност инхерентно нарушена услед мутације, фузије или прекомерне експресије. У више типова карцинома, укључујући леукемију, карцином дојке и глиобластом, HSP90 штити протеине који су иначе склони протеазомалној деградацији. На пример, BRD4, транскрипциони коактиватор који има улогу у акутној мијелоидној леукемији (АМЛ), ослања се на HSP90 за своју стабилност. Стога, инхибиција HSP90 доводи до деградације BRD4 [293]. Још један значајан клијент је LRRK2, киназа која је прекомерно активирана у Паркинсоновој болести. Једна студија наводи да HSP90 омогућава киназну активност LRRK2, а инхибиција функције HSP90 умањује токсичност посредовану LRRK2 [294]. Као што је приказано у Табели 10, више онкогених протеина идентификовани су као протеини-клијенти HSP90.

Табела 10. Репрезентативни онкогени протеини-клијенти HSP90 идентификовани у студијама

Онкогени клијент	Тип карцинома	Референце
BRD4	АМЛ	[295]
HER2	Карцином дојке	[296]
EGFR	Неситноћелијски рак плућа	[297]
LRRK2	Глиобластом	[294]
MYC	Лимфоми, леукемије	[298]

1.9.4. Зависност од HSP90 специфична за карциноме

Нормалне ћелије користе HSP90 под стресом, али ћелије рака често показују конститутивно повишену активност HSP90 услед хроничног протеотоксичног стреса [299]. То укључује висок интензитет синтезе протеина, геномску нестабилност и оксидативни стрес, што повећава оптерећеност протеинима лоше конформације. Студије на моделима леукемије ово потврђују. У АМЛ-у, HSP90 се користи да одржава функцију транскрипционог регулатора *Ikaros* [300]. У солидним туморима, HSP90 одржава активну сигнализацију преко EGFR-а или HER2, чак и у присуству мутација које изазивају резистентност [301]. Важно је да функција шаперона није само у конформационим променама протеина, већ и да их одржи у функционалном стању довољно дуго за сигнализацију, транскрипцију или ензимску активност, а ово подупире онкогену „зависност“ (енг. *oncogenic „addiction“*) од HSP90 [302].

1.9.5. Протеини-партнери HSP90 у контекстима канцера

Ефикасност и специфичност одвијања конформационих промена протеина посредованих HSP90 повећане су његовим интеракцијама са низом ко-шаперона. Ови протеини модулишу АТПазну активност, диктирају избор протеина-клијената и регулишу састављање комплекса [303]. Табела 11 сажима ко-шапероне који су често повезани са стабилизацијом онкопротеина.

Табела 11. Ко-шаперони HSP90 и њихове улоге у карциномима

Ко-шаперон	Примарна функција	Утицај релевантан за канцер	Референце
CDC37	Регрутовање киназа	Стабилизује онкогене киназе (нпр. CDK4)	[304,305]
p23	Стабилизује стање у коме је везан АТП	Омогућава дејство транскрипционих фактора	[277,306]
ANA1	Активатор АТПазе	Повезан са фармакорезистенцијом	[278,307]
FKBP51, FKBP52	Модулација стероидних рецептора	Импликовани у хормон-зависним карциномима	[308,309]
НОР	Трансфер протеина-клијената са HSP70 на HSP90	Обезбеђује координисан шаперонски циклус	[310,311]

Функционална зависност од ових ко-шаперона варира међу типовима канцера. Интеракција између HSP90 и FKBP51 регулише функцију AR-а у ћелијама карцинома простате [312], док је CDC37 кључни кофактор у колоректалном карциному који се одржава захваљујући киназама [313].

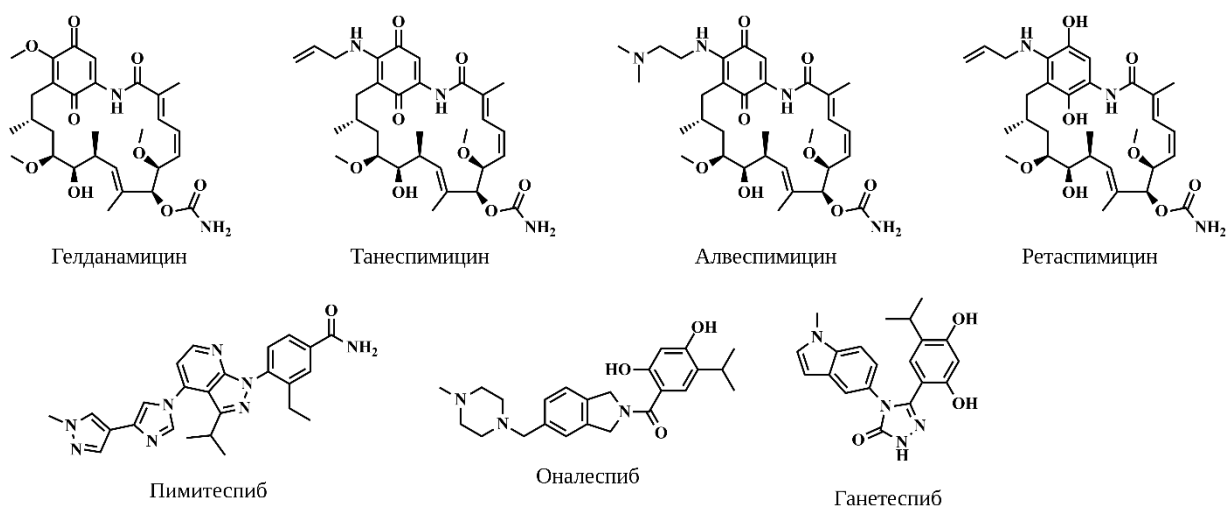
1.9.6. Развој инхибитора HSP90

Већина инхибитора HSP90 (Слика 41) развијених за терапију канцера делује блокирањем цепа за везивање АТП-а у NTD-у. Ово прекида шаперонски циклус и подстиче деградацију протеина-клијената који подржавају раст и преживљавање тумора. Међутим, многи инхибитори усмерени ка NTD-у делују као пан-инхибитори HSP90 и утичу на HSP90 α , HSP90 β , GRP94 и TRAP1. Ова широка инхибиција ограничила је клинички развој, јер може да индукује одговор на топлотни шок (енг. *heat shock response*) [314] и да доведе до токсичности као што су окуларна токсичност, кардиотоксичност, умор, дијареја и леукопенија [315–318].

Инхибитори прве генерације били су углавном деривати гелданамицина. Сам гелданамицин није дошао до клиничке примене због слабе растворљивости, ограничене стабилности и хепатотоксичности [319]. Танеспимицин (17-*N*-алиламино-17-деметоксигелданамицин, 17-ААГ) био је први инхибитор HSP90 који је ушао у клиничка испитивања [320] и испитиван је као монотерапија и у комбинацијама [321], али је његов развој обустављен због потешкоћа у формулацији и проблема повезаних са патентном заштитом [322]. Развој других аналога, укључујући алвеспимицин (17-диметиламиноетиламино-17-деметоксигелданамицин, 17-ДМАГ), ретаспимицин (IPI-504) и IPI-493, такође је обустављен због токсичности или лоших фармакокинетичких својстава [323,324].

Најпроминентнији инхибитор HSP90 друге генерације је пимитеспиб (TAS-116), орално биорасположив дериват бензамида [325]. Ово једињење селективно инхибира HSP90 α/β у односу на GRP94 и TRAP1. У претклиничким студијама, TAS-116 је смањио нивое HER2, HER3 и АКТ и инхибирао PI3K/АКТ и MAPK/ERK сигнализацију [326]. У II фази клиничких студија код јапанских пацијената са узнапредовалим гастроинтестиналним стромалним тумором отпорним на иматиниб, сунитиниб и регорафениб, медијана преживљавања без прогресије износила је 4,4 месеца, а медијана укупног преживљавања 11,5 месеци [327]. Накнадна рандомизована III фаза клиничких студија подржала је регистрацију пимитеспиба у Јапану за узнапредовале гастроинтестиналне стромалне туморе отпорне на стандардну

терапију [328,329]. Неколико инхибитора друге генерације ушло је у клиничка испитивања са мешовитим резултатима. Оналеспиб (AT13387) је показао прелиминарну антитуморску активност и подношљивост у првом испитивању на људима [330], али друго испитивање монотерапије није показало значајну модулацију протеина-клијената [331]. Ганетеспиб (STA-9090) је испитиван у бројним клиничким студијама од фазе I до фазе III. Код неситноћелијског рака плућа, студија *GALAXY-1* није показала испуњење примарних циљева [332], а студија *GALAXY-2* показала је да додавање ганетеспиба доцетакселу не побољшава преживљавање, што је довело до обуставе ове студије због неперспективности [333]. Једињење XL888 је показало активност у претклиничким студијама у моделима карцинома отпорних на вемурафениб [334]. Осим тога, испитивано је и у комбинацијама, укључујући комбинацију са пембролизумабом код гастроинтестиналних малигнитета [335].



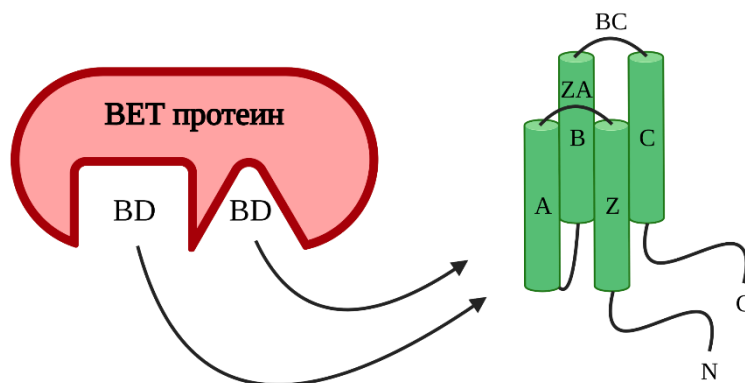
Слика 41. Хемијске структуре одабраних инхибитора HSP90 прве (горе) и друге генерације (доле)

Нови приступи дизајну инхибитора HSP90 усмерени су на побољшање селективности и смањење токсичности. Инхибитори HSP90 селективни ка изоформама развијени су јер је пан-инхибиција HSP90 повезана са окуларном токсичношћу и кардиотоксичношћу [336]. Други приступи укључују дуалне инхибиторе [337], инхибиторе ППИ [338], деградере засноване на PROTAC технологији [339–342] и инхибиторе усмерене ка CTD-у [284]. Инхибитори CTD-а, попут деривата новобиоцина, су нарочито релевантни, јер се везују за C-терминално место везивања, чиме се избегава индукција одговора на топлотни шок [343].

1.10. ВЕТ протеини као епигенетски регулатори

У еукариотским ћелијама, транскрипција није регулисана само транскрипционим факторима специфичним за секвенцу ДНК, већ и организацијом хроматина. ДНК је упакована око хистонских протеина, а N-терминални хистонски остаци могу да подлежу посттранслационим модификацијама као што је ацетилација лизина. Ацетилација хистона је блиско повезана са хроматином који дозвољава транскрипцију, а иницијалне биохемијске студије повезале су активност хистон-ацетилтрансфераза важну за транскрипцију са активацијом гена [344]. Ацетиловани лизински остаци стварају места везивања за протеине који представљају епигенетске „читаче“, а њима припадају ВЕТ протеини. Дакле, ови протеини препознају ацетиловане лизине, тако да се овакав хроматински сигнал преноси до ефекторских протеина [345].

Породица протеина са бромодоменом и екстра-терминалним доменом (енг. *Bromodomain and Extra-Terminal Domain Proteins*, BET протеини) сачињена је од четири протеина заступљених код сисара: BRD2, BRD3, BRD4 и BRDT, чија је експресија ограничена на тестисе. Ови протеини су регулатори који интерагују са хроматином и модулишу експресију гена везивањем за ацетиловане хистоне и друге ацетиловане протеине. Важна карактеристика BET протеина јесте присуство два тандемска *N*-терминална бромодомена, BD1 и BD2, након којих следи екстра-терминални домен (ETD) за ППИ. BRD4 и BRDT додатно поседују *C*-терминални домен који садржи конзервирани регион за интеракцију са позитивним транскрипционим елонгационим фактором *b* (енг. *Positive Transcription Elongation Factor b*, P-TEFb) [346]. Бромодомен је модул BET протеина за препознавање ацетил-лизина. И BD1 и BD2 садрже конзервирану секвенцу од приближно 110 аминокиселина која формира хидрофобни џеп за везивање ацетил-лизина [347]. Структурно, бромодомени BET протеина су организовани као сноп од четири хеликса αZ , αA , αB и αC , уз ZA и BC петље које обликују место везивања ацетил-лизина (Слика 42) [348]. ETD представља конзервирани регион који посредује интеракције са транскрипционим ефекторским протеинима [349]. Оваква организација домена омогућава BET протеинима да делују као мостови између ацетилованог хроматина и транскрипционе машинерије. Бромодомени усмеравају BET протеине ка ацетилованим нуклеозомима, док ETD и, у случају BRD4 и BRDT, CTD регрутују додатне регулаторне протеине. Стога, BET протеини превode ацетилацију хроматина у промене исхода транскрипције.

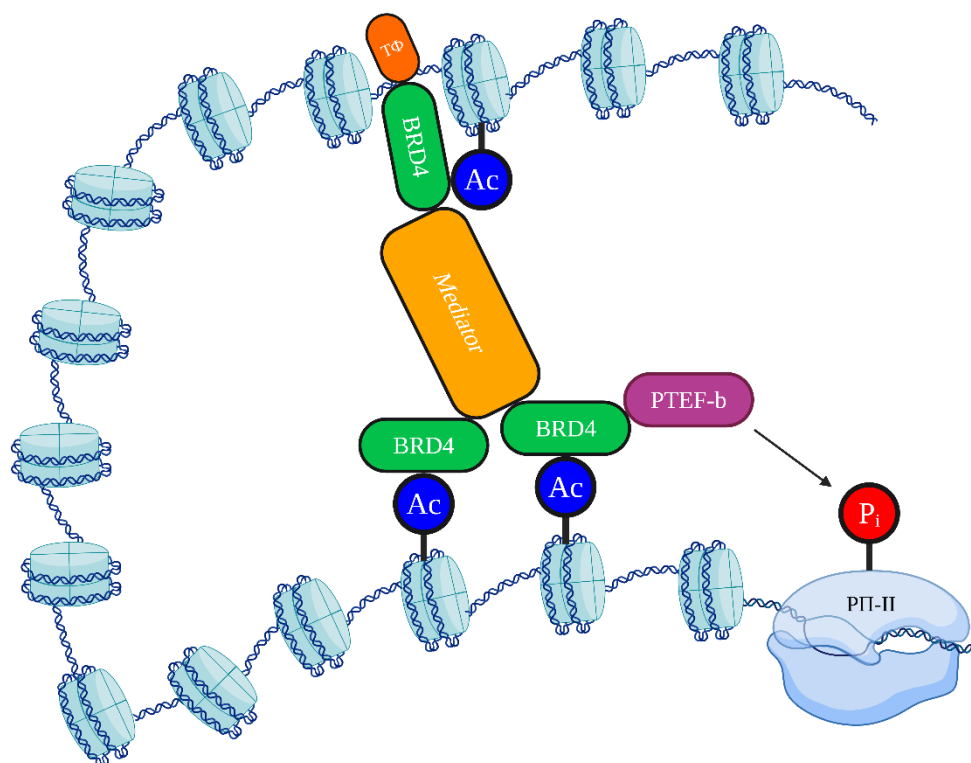


Слика 42. Структура бромодомена

1.10.1. Улоге BET протеина у контроли транскрипције и функцији енхенсера

Транскрипциона улога BET протеина посебно је важна на активним генима, где регулаторне информације из хроматина морају бити повезане са активношћу РНК полимеразе II. Током транскрипције, РНК полимеразе II започиње транскрипцију на генским промоторима, али често захтева додатне регулаторне кораке како би започела елонгацију. P-TEFb, састављен од CDK9 и циклина T, ово омогућава фосфорилацијом *C*-терминалног домена РНК полимеразе II, укључујући остатке Ser2, чиме подржава транскрипциону елонгацију. BRD4 је главни регрутер и активатор P-TEFb удружен са хроматином, који повезује ацетиловани хроматин са контролом елонгације [350,351]. BET протеини такође доприносе континуитету транскрипције током ћелијског циклуса. Они остају везани за хроматин током митозе, што је својство за које се претпоставља да помаже постмитотској транскрипционој реактивацији и епигенетској меморији [352]. Студије у живим ћелијама показале су да BRD4 испољава брзо „on/off“ везивање за хроматин, а ово време задржавања се повећава када је ацетилација хистона повишена. Оба бромодомена су неопходна за ову интеракцију са хроматином [353].

Енхенсери пружају још један важан регулаторни контекст за ВЕТ протеине. Енхенсери су регулаторни елементи ДНК који повећавају транскрипцију са циљних промотора, често посредством физичких контаката са промоторима. На активним генима, енхенсери и језгра промотора интерагују, омогућавајући транскрипционим факторима и коактиваторима везаним за енхенсере да утичу на иницијацију и елонгацију транскрипције. BRD4 посредује интеракције између транскрипционих фактора, *Mediator*-а и Р-TEFb [351], који заједно доводе до фосфорилације Ser2 у С-терминалном домену РНК полимеразе II и појачавају транскрипциону елонгацију (Слика 43) [350].



Слика 43. Улога BRD4 у транскрипционој елонгацији (ТФ – транскрипциони фактор; Ас – ацетил група; P_i – фосфат; РП-II – РНК полимеразе II) [354]

Унакрсна комуникација са транскрипционим факторима додатно укључује ВЕТ протеине у регулацију засновану на хроматину. Стимулација посредством TNF- α ацетиљује RelA подјединицу NF- κ B, посебно на Lys310, омогућавајући директну интеракцију са BRD4 преко његова два бромодомена. Ова интеракција је неопходна за продуктивну трансактивацију NF- κ B [355]. Према томе, ВЕТ протеини могу да препознају ацетилацију не само на хистонима, већ и на транскрипционим факторима.

ВЕТ протеини су доста заступљени на супер-енхенсерима (СЕ), који представљају велике кластере енхенсера густо насељене транскрипционим коактиваторима. У ћелијама канцера, СЕ често регулишу гене који контролишу идентитет ћелијске лозе, пролиферацију или преживљавање. У ћелијама ММ-а, BRD4 и *Mediator* заједно заузимају хиљаде енхенсера, са посебно високим присуством на СЕ. Инхибиција BRD4 помоћу (+)-JQ1 преференцијално смањује BRD4, *Mediator* и Р-TEFb на СЕ и несразмерно умањује транскрипцију гена повезаних са СЕ, као што је *MYC*. Инхибиција везивања BRD4 изазива изражен губитак *Mediator*-а (MED1) и CDK9 на енхенсерима, најизраженије на СЕ, и смањује заступљеност РНК полимеразе II која врши елонгацију, са јачим ефектима на гене повезане са СЕ [356].

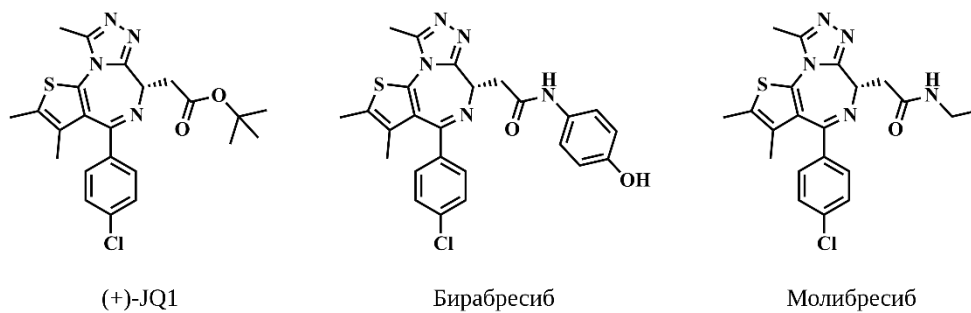
1.10.2. Ремоделовање хроматина и онкогене улоге BET протеина

Поред регрутовања транскрипционих регулатора, BET протеини могу директно да утичу на доступност хроматина транскрипционој машинерији. BRD2 и BRD3 се везују за хиперацетиловани хроматин повезан са транскрибованим генима и, *in vitro*, уклањају нуклеозомске препреке елонгацији РНК полимеразе II без потребе за Р-TEF β или другим факторима елонгације [357]. Интеракција BRD2 са ацетилованим лизинима, нарочито H4K5 и H4K12, неопходна је за ову функцију елонгације [358]. Ова открића указују на то да BET протеини могу да подрже транскрипцију преко најмање два повезана механизма: регрутовањем фактора елонгације и директним олакшавањем транскрипције кроз ацетиловане нуклеозоме. Ова активност заснована на хроматину има велики значај у онкологији, јер многе ћелије канцера зависе од неометене транскрипције онкогенних програма и програма специфичних за ћелијску лозу. Активност BET протеина повезује ацетилацију хроматина са транскрипцијом гена релевантних за болест. У педијатријској АМЛ, експресија BRD4 је повишена [359], а ацетиловани H4 користи BET протеине ради склапања супер-енхенсерских комплекса [360]. Онкогени, као што су *LYL1* [361] и *MYC* [356], ослањају се на транскрипцију дириговану овим хипер-енхенсерским склоповима који садрже BET протеине. У овом контексту, BET протеини су функционалне компоненте процеса транскрипције који одржавају програме малигне експресије гена.

1.10.3. Инхибиција BET протеина у онколошким стањима

Препознавање BET протеина као „читача“ ацетил-лизина пружило је основу за фармаколошку инхибицију њихових бромодомена. Мали молекули инхибитори BET протеина (Слика 44) делују тако што заузимају џеп за везивање ацетил-лизина, чиме спречавају бромодомене BET протеина да се вежу за ацетиловани хроматин. Показано је да се прототипски инхибитор BET протеина (+)-JQ1 компетитивно везује за бромодомене и да истискује са хроматина комплексе зависне од BRD4. У моделима канцера зависних од BRD4-NUT фузионог онкопротеина, (+)-JQ1 је истиснуо овај фузиони онкопротеин са хроматина, индуковао сквамозну диференцијацију и произвео антипролиферативне ефекте у моделима ћелијских линија и ксенографта добијених од пацијената [362]. Инхибиција BET протеина такође је повезана са супресијом онкогенних транскрипционих програма у хематолошким малигнитетима. У моделима MM-a, (+)-JQ1 је смањио транскрипцију *MYC* онкогена и умањио експресију циљних гена зависних од c-Myc онкопротеина, производећи антипролиферативне ефекте повезане са заустављањем ћелијског циклуса и сенесценцијом [363]. У АМЛ-у, скринингом RNAi је идентификован BRD4 као погодан терапијски циљ, а инхибиција BRD4 малим молекулима обелодањена је као обећавајућа терапијска стратегија у моделима ове болести [364]. Ове студије подржавају концепт да инхибиција BET протеина може да утиче на ћелије канцера нарушавањем неопходне транскрипције повезане са енхенсерима и супер-енхенсерима.

Клиничка примена инхибиције BET протеина огледа се у примени орално биорасположивих BET инхибитора. Једињење OTX015 (бирабресиб) је испитано у I фази клиничке студије са повећавањем дозе код пацијената са акутном леукемијом [365], а молибресиб је испитан у првој клиничкој студији фазе I на људима код NUT карцинома и других солидних тумора [366]. Ове клиничке студије показују да инхибиција BET протеина несумњиво има клинички потенцијал. Међутим, разнолике функције BET протеина у транскрипцији такође значе да при терапијској инхибицији BET протеина морају бити уравнотежени антитуморски ефекти и безбедност примене. У целини, BET инхибитори пружају фармаколошку стратегију за ометање онкогене транскрипције зависне од хроматина, при чему се BRD4 издваја као најбоље окарактерисан терапијски циљ у оквиру породице BET протеина.



Слика 44. Хемијске структуре одабраних инхибитора ВЕТ протеина

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Примарни циљ ове докторске дисертације био је дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула усмерених на HSP90 и BET протеине. Истраживање је обухватило примену стратегија циљане деградације протеина кроз развој PROTAC и НуТ молекула, као и развој структурно оптимизованих инхибитора мале молекулске масе усмерених на BET протеине.

Ради остварења овог општег циља, истраживање је организовано кроз следеће међусобно повезане циљеве:

1) Дизајн и синтеза PROTAC и НуТ молекула усмерених на HSP90.

Овај циљ је обухватио рационални дизајн деградера HSP90 на основу расположивих кристалографских података, са посебним фокусом на избор погодних тачака за припајање линкера на три класе лиганада за HSP90: деривате пироло[2,3-*d*]пиримидина, деривате тиено[2,3-*d*]пиримидина и деривате 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола. У оквиру овог циља предвиђена је синтеза дизајнираних PROTAC и НуТ молекула, као и потврда њихових хемијских структура применом инструменталних метода.

2) Биолошка и фармакокинетичка карактеризација синтетисаних деградера HSP90.

Овај циљ је подразумевао испитивање афинитета синтетисаних једињења према HSP90 применом TR-FRET теста, како би се проценило да ли увођење линкера, лиганада за Е3 лигазе код PROTAC молекула или хидрофобних обележја код НуТ молекула нарушава препознавање HSP90. Даља евалуација обухватила је процену цитотоксичности применом CTG (енг. *CellTiter-Glo*) теста у одабраним ћелијским линијама карцинома, испитивање потенцијала за деградацију HSP90 код најактивнијих једињења применом *Western blot* анализе, као и карактеризацију физичко-хемијских и *in vitro* фармакокинетичких својстава, укључујући растворљивост, пермеабилност, метаболичку стабилност и везивање за протеине плазме.

3) Развој једињења усмерених на BET протеине.

Овај циљ је обухватио дизајн и синтезу PROTAC молекула, користећи (+)-JQ1 као лиганд за ПОИ, са циљем процене њиховог потенцијала за деградацију BET протеина. Афинитети ових молекула према бромодоменима процењени су применом TR-FRET теста, а добијени резултати служили су као основа за одлуку о даљем развоју деградера или преусмеравању истраживања ка структурно оптимизованим инхибиторима. У оквиру истог циља предвиђен је дизајн и синтеза амида изведених из (+)-JQ1, потврда њихових структура инструменталним методама, као и процена везивања и цитотоксичности применом TR-FRET и CTG тестова.

4) Фармакокинетичка и структурна евалуација инхибитора BET протеина.

Овај циљ је обухватио *in vitro* фармакокинетичко профилисање амида изведених из (+)-JQ1 и *in vivo* фармакокинетичку евалуацију најактивнијег једињења на мишевима, са посебним фокусом на процену оралне биорасположивости. Додатно, циљ је био да се испита корелација између *in silico* и *in vitro* фармакокинетичких параметара ради процене применљивости рачунарских алата у будућем дизајну једињења ове класе. Коначно, кристалографска испитивања одабраних инхибитора BET протеина имала су за циљ идентификацију структурних карактеристика и протеин-лиганд интеракција које доприносе побољшаном везивању и могу усмерити даљи дизајн лиганада заснован на структури (енг. *structure-based drug design*).

3. ЕКСПЕРИМЕНТИ

3.1. Опште информације о експерименталном раду

Синтетички део експерименталног рада реализован је на Катедри за органску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета. Део експерименталног рада који се односи на физичко-хемијску, биолошку и фармакокинетичку карактеризацију молекула реализован је током истраживачког боравка у *St. Jude Children's Research Hospital* (Мемфис, САД), у оквиру Програма сарадње српске науке са дијаспором: ваучери за размену знања Фонда за науку Републике Србије (акроним: *DeSyHPRO*, евиденциони број: 6463913), као и кроз настављену научну сарадњу између наведених установа. Одобрење за коришћење резултата добијених кроз ову сарадњу приложено је у Одељку 7.1.

Уобичајени реагенси или материјали набављени су из комерцијалних извора и коришћени без даљег пречишћавања. Растварачи коришћени у реакцијама или при обради једињења дестилисани су пре употребе. Стаклено посуђе је пре употребе сушено у сушници. Аналитичка танкослојна хроматографија извођена је на *Sigma-Aldrich* плочама са силика-гелом 60 и флуоресцентним индикатором (254 nm), а једињења су визуализована бојењем раствором калијум-перманганата, након чега је примењено благо загревање. Једињења су пречишћавана флеш хроматографијом на колони уз употребу силика-гела 60 (230-400 mesh), или на *Biotage Isolera One* флеш хроматографском систему уз употребу *Biotage SNAP* кертрица. Сакупљене фракције су упараване на *BUCHI Rotavapor* уређају. Спектри нуклеарне магнетне резонанце (НМР спектри) снимани су на *Bruker Avance III 500 MHz* НМР спектрометру или на *Bruker Ascend 400 MHz* НМР спектрометру и обрађивани у програму *MestReNova* (верзија 6.0.2). Као растварачи коришћени су деутерисани хлороформ (CDCl_3), деутерисани ацетонитрил (CD_3CN) или деутерисани метанол (CD_3OD), а хемијска померања (δ) дата су у деловима на милион (ppm) у односу на тетраметилсилан као унутрашњи стандард. Сигнали у НМР спектрима означени су на следећи начин: s – синглет, brs – проширени синглет, d – дублет, dd – дублет дублета, ddd – дублет дублета дублета, dt – дублет триплета, t – триплет, q – квинтет, quint – квинтет, sext – секстет, m – мултиплет. Масени спектри високе резолуције (HRMS) добијени су на *Waters Xevo G2 QToF* масеном спектрометру. Специфичне ротације ($[\alpha]_D^T$) одређене су на аутоматском полариметру *Rudolph Research Analytical Autopol IV*, или на полариметру *JASCO P-1010*, на назначеним температурама, уз светлост таласне дужине 589 nm (таласна дужина D линије натријума).

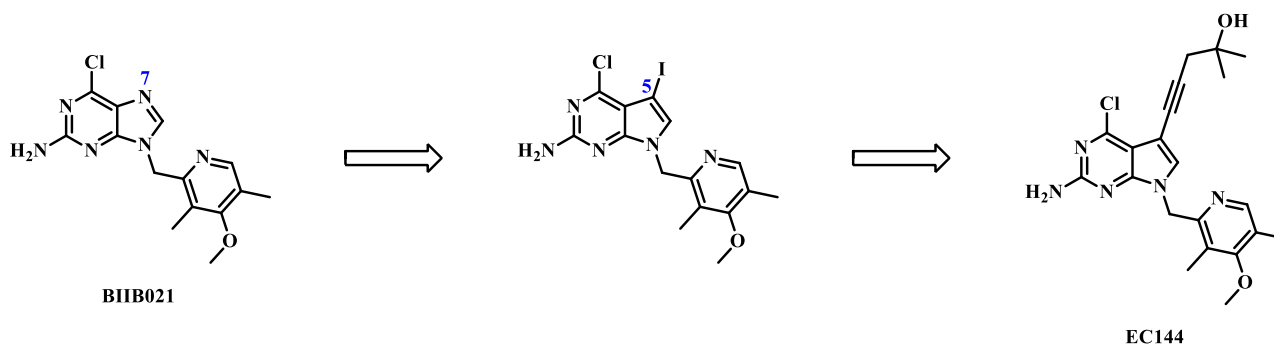
3.2. Дизајн и синтеза PROTAC молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету пироло[2,3-*d*]пиримидина

Развој деградера протеина, као што су PROTAC молекули, захтева примену лиганда који се за циљне протеине везују високим афинитетом, као и одговарајућих места погодних за припајање линкера. У контексту дејства на HSP90, лиганди засновани на скелету пироло[2,3-*d*]пиримидина наметнули су се као довољно потентни, омогућавајући релативно једноставно увођење линкера. Међу њима, једињење EC144 представља инхибитор HSP90 друге генерације са повољним везивањем за HSP90, фармакокинетичким и физичко-хемијским својствима, што га чини добрим кандидатом за развој PROTAC молекула [367].

3.2.1. Оптимизација скелета и дизајн лиганда

Полазна тачка за дизајн лиганда који се везује за HSP90 у оквиру развоја PROTAC молекула био је основни пиролопиримидински скелет једињења EC144. Овај скелет је проистекао из оптимизације пуринског инхибитора ВПВ021, који је показивао ограничену оралну биорасположивост и захтевао високе дозе ради испољавања ефикасности у мишјим моделима. Структурне студије су показале да је N7 позиција једињења ВПВ021 изложена растварачу, што је указивало да модификације на овом положају могу да побољшају фармаколошка својства без нарушавања везивања за HSP90. Да би се ово сазнање искористило, N7 атом је замењен

угљеником, чиме је добијено деазапуринско језгро присутно у пиролопиримидинским дериватима. Увођење арил-јодида на C5 позицији омогућило је ефикасну функционализацију путем реакција унакрсног купловања катализованих паладијумом [367]. Стога, Соногаширино купловање је коришћено за увођење алкинилних супституената на тој позицији, чиме је олакшано увођење линкера приликом синтезе PROTAC молекула. Оваква синтетичка стратегија је довела до једињења EC144 које носи бочни ланац 2-метилпент-4-ин-2-ола (Слика 45).

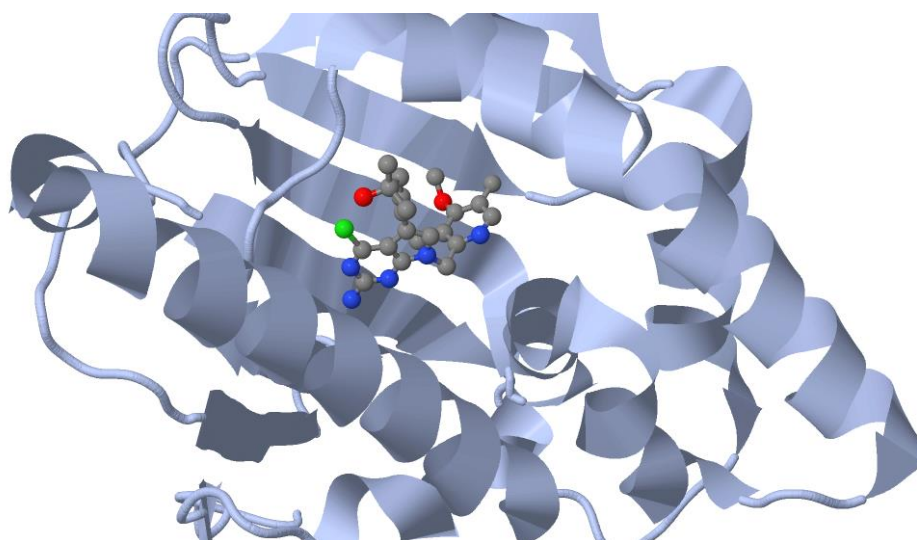


Слика 45. Хемијске структуре лиганата за HSP90 које илуструју настанак скелета оптимизованог за примену у дизајну PROTAC молекула

3.2.2. Однос структуре и активности и избор места припајања линкера

Детаљна SAR анализа једињења која носе различите супституенте на C5 позицији пиролопиримидинског језгра показала је да је присуство алкинског ланца који се завршава терцијарном алкохолном групом добро толерисано и да је чак побољшавало активност у ћелијским тестовима. Конкретно, EC144 је показао IC_{50} вредност (IC_{50} – концентрација једињења при којој је 50% циљног протеина инхибирано) од 1,1 nM у тестовима везивања за HSP90 α и EC_{50} вредност (EC_{50} – концентрација једињења при којој се постиже 50% биолошког одговора) од 14 nM за деградацију HER2 у MCF-7 ћелијама карцинома дојке, при чему обе вредности представљају троструко побољшање у односу на клиничког кандидата прве генерације ВПВ021 (IC_{50} = 5,1 nM; EC_{50} = 38 nM) [367].

Кристалографска анализа комплекса EC144 са HSP90 потврдила је да алкин остварује повољне интеракције са хидрофобним остацима, као што су Met98 и Leu107, док алкохолна група остаје изложена растварачу (Слика 46). Оваква конформација и оријентација пружиле су рационално и синтетички приступачно место за увођење линкера приликом дизајна PROTAC молекула. Арил-јодид је био од пресудне важности за Соногаширино купловање, јер је омогућавао увођење линкера за конјугацију са лигандима за E3 лигазе.



Слика 46. Кристална структура *N*-терминалног домена HSP90 β у комплексу са EC144 која илуструје његову оријентацију унутар џепа за везивање АТП-а (PDB код: 3NMQ [368])

3.2.3. Фармакокинетичка својства пиролопиримидинског лиганда

Једињење EC144 је испуњавало кључне критеријуме леколикости, показујући моларну масу од 414 g/mol, clog*P* од 2,8 и повољне карактеристике које се тичу водоничног везивања (два донора и четири акцептора). Осим тога, показало је високу пермеабилност кроз Сасо-2 монослојеве (привидни коефицијент пермеабилности у апикално-базолатералном смеру (*P_{app}* *A-B*) био је $34,7 \times 10^{-6}$ cm/s) и занемарљив ефлукс (коефицијент ефлука (*ER*) био је 1,1), што су критичне одлике које се тичу ћелијске пермеабилности и интрацелуларног приступа PROTAC молекула. У поређењу са другим инхибиторима HSP90, као што су резорцинолни дериват луминеспиб (NVP-AUY922) и бензамидни дериват SNX-2112, EC144 је показао бољу пермеабилност и мању склоност ка активном ефлукусу. Поред тога, ово једињење је показало адекватну метаболичку стабилност, са интринзичким хепатичким клиренсом од 119 mL min⁻¹ kg⁻¹ у хуманим микрозомима. Код мишева је имало умерено полувреме елиминације од 1,5 сати и високо везивање за протеине плазме (94-97%) [367].

3.2.4. Изложеност у *in vivo* условима и дистрибуција у ткива

Фармакокинетички профил једињења EC144 након оралне примене показао је површину испод криве концентрација-време (*AUC*) од 4419 ng h/mL при дози од 25 mg/kg, уз максималну концентрацију у плазми (*C_{max}*) од 1556 ng/mL. Значајно је да је овај ниво системске изложености постигнут при четири пута мањој дози у односу на дозу потребну за ВПВ021 да би се достигле упоредиве концентрације у плазми (100 mg/kg). Показано је и да се EC144 ефикасно дистрибуира у периферна ткива која могу бити релевантна за активност PROTAC молекула, укључујући мозак, лимфне чворове и слезину. Односи *AUC* вредности за ткиво и плазму достигли су 3,9 за слезину и 2,4 за лимфне чворове, што подржава погодност употребе једињења EC144 у случајевима када је неопходна дистрибуција у различита ткива [367].

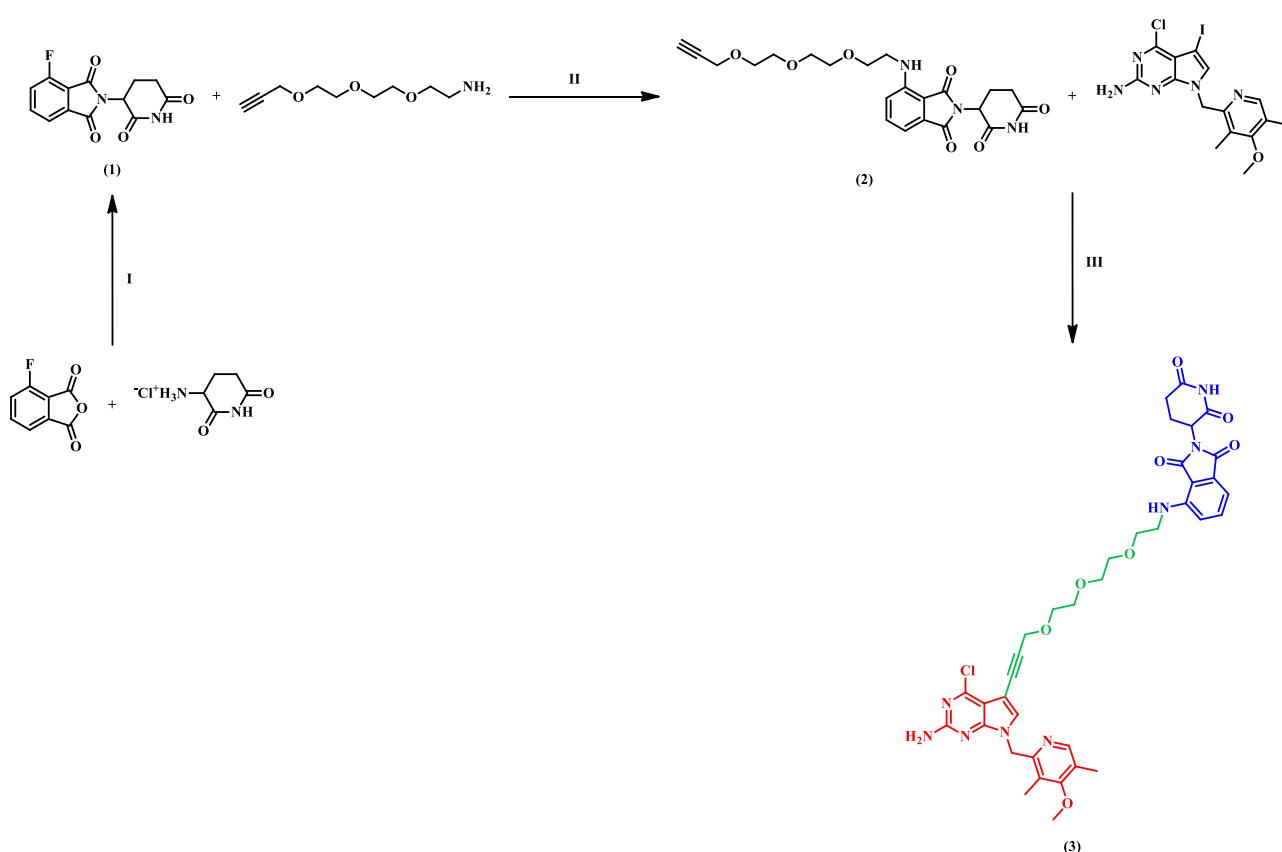
3.2.5. Примена пиролопиримидинског скелета у синтези PROTAC молекула

Структурне и фармакокинетичке карактеристике једињења EC144 одредиле су његов избор као лиганда за HSP90 у развоју PROTAC молекула. Спој високог афинитета за HSP90, могућности релативно лаког увођења линкера на позицији која је изложена растварачу, као и повољних физичко-хемијских и фармакокинетичких особина чини пиролопиримидински скелет рационалним избором приликом дизајна PROTAC молекула усмерених на деградацију HSP90.

3.2.6. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула базираних на скелету пироло[2,3-*d*]пиримидина

PROTAC молекули засновани на пироло[2,3-*d*]пиримидину синтетисани су применом модуларне, конвергентне стратегије у оквиру које је фрагмент који обухвата лиганд за CRBN и линкер припремљен независно, а затим је у завршном кораку куплован са пиролопиримидинским фрагментом. У првој фази су синтетисани лиганди за CRBN функционализовани алкинском групом. Остатак који се везује за CRBN био је заснован на скелету 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-изоиндолин-1,3-диона, који је на ароматичном положају функционализован линкерима различите дужине и састава. Ови линкери су синтетисани тако да на свом крају носе алкинску групу, било нуклеофилном ароматичном супституцијом, било постепеном синтезом линкера, након чега је следило формирање амидне везе. Овакав приступ је омогућио добијање интермедијера лиганд за CRBN-линкер који носе терминални алкин погодан за реакције купловања. У завршној фази, фрагменти лиганд за CRBN-линкер који носе терминални алкин купловани су са јодованим пироло[2,3-*d*]пиримидинским језгром путем Соногашириног купловања. Овим кораком су добијени коначни PROTAC молекули. Модуларни карактер овог синтетичког пута омогућио је ефикасно варирање архитектуре линкера.

Синтеза једињења (3) [369]



Шема 1. Реакциони услови: **I)** AcONa, AcOH, 140°C, 16 сати, 50%; **II)** ДИПЕА, ДМФ, 80°C, 16 сати, 31%; **III)** Pd(OAc)₂, dppf, CuI, Et₃N, ТХФ, 70°C, 16 сати, 18%

(1): 2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-4-флуороизоиндолин-1,3-дион [370]

У АсОН (5 mL) помешани су 4-флуороизобензофуран-1,3-дион (332 mg, 1,9987 mmol, 1,0 equiv), 2,6-диоксопиперидин-3-аминијум-хлорид (329 mg, 1,9987 mmol, 1,0 equiv) и АсОНa (197 mg, 2,3984 mmol, 1,2 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 140°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Ме₂СО = 20/0 → 20/0,5 (v/v)), чиме је добијено једињење **(1)** (275 mg, 50%) у виду беле, чврсте супстанце. ¹Н НМР спектар био је у сагласности са литературним подацима [370].

(2): 2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-4-((2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етил)амино)изоиндолин-1,3-дион [371]

Раствору једињења **(1)** (38 mg, 0,1376 mmol, 1 equiv) у ДМФ-у (2 mL) додати су раствор 2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етанамина (52 mg, 0,2751 mmol, 2 equiv) у ДМФ-у (1 mL) и ДИПЕА (70 µL, 0,4127 mmol, 3 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 80°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Ет₂О засићен NH₃/петрол-етар = 8/2 → 9/1 (v/v)), чиме је добијено једињење **(2)** (19 mg, 31%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

¹Н НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,14 (s, 1H), 7,49 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,49 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,92 (dd, *J* = 12,1, 5,3 Hz, 1H), 4,20 (d, *J* = 2,3 Hz, 2H), 3,74 – 3,68 (m, 10H), 3,48 (q, *J* = 5,5 Hz, 2H), 2,96 – 2,69 (m, 3H), 2,43 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 2,14 – 2,10 (m, 1H).

¹³С НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 170,98, 169,27, 168,28, 167,62, 146,90, 136,05, 132,53, 116,82, 111,68, 110,32, 79,75, 74,54, 70,73, 70,67, 70,52, 69,56, 69,16, 58,41, 48,89, 42,44, 31,43, 22,80.

(3): 4-((2-(2-(2-((3-(2-Амино-4-хлоро-7-((4-метокси-3,5-диметилпиридин-2-ил)метил)-7H-пироло[2,3-*d*]пиримидин-5-ил)проп-2-ин-1-ил)окси)етокси)етокси)етил)амино)-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион [372]

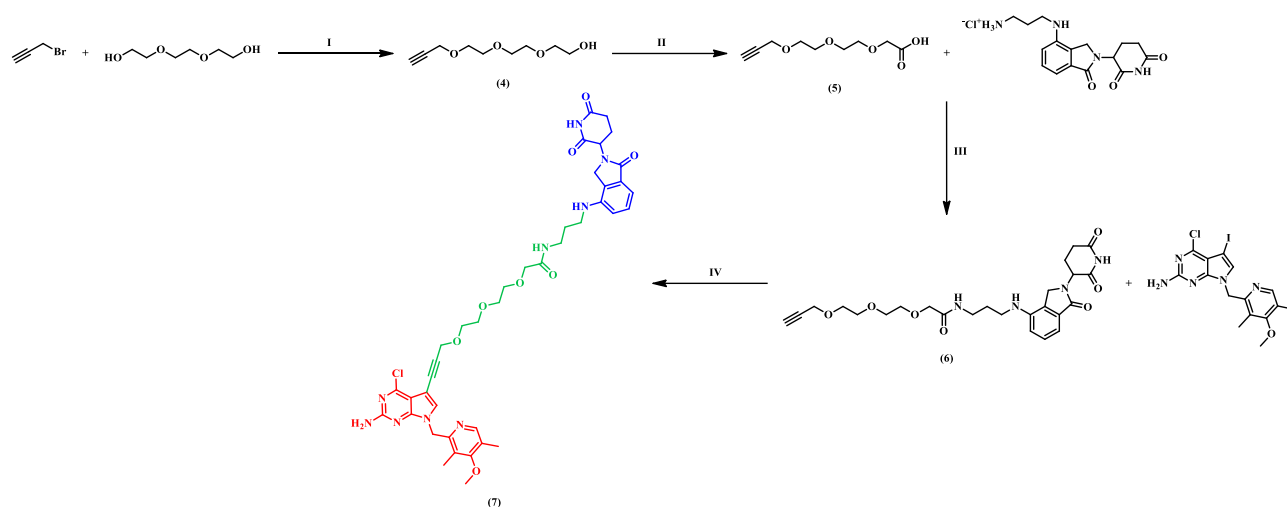
Раствору 4-хлор-5-јодо-7-((4-метокси-3,5-диметилпиридин-2-ил)метил)-7H-пироло[2,3-*d*]пиримидин-2-амина (22 mg, 0,0496 mmol, 1,0 equiv) и једињења **(6)** (22 mg, 0,0496 mmol, 1,0 equiv) у сувом ТХФ-у (3 mL), у атмосфери азота, додати су Pd(OAc)₂ (2 mg, 0,0099 mmol, 0,2 equiv), dppf (6 mg, 0,0099 mmol, 0,2 equiv), CuI (4 mg, 0,0198 mmol, 0,4 equiv) и Et₃N (50 µL, 0,3473 mmol, 7,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 70°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Et₂О засићен NH₃ = 10/0 → 10/0,20 (v/v)), чиме је добијено једињење **(3)** (7 mg, 18%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹Н НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,75 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,48 – 7,44 (m, 1H), 7,10 (s, 1H), 7,08 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,89 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,49 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H), 5,30 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,92 (dd, *J* = 12,2, 5,3 Hz, 1H), 4,42 (s, 2H), 3,78 – 3,68 (m, 13H), 3,49 – 3,45 (m, 2H), 2,89 – 2,69 (m, 3H), 2,24 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,13 – 2,09 (m, 1H).

¹³С НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 173,33, 170,61, 169,45, 167,82, 163,86, 160,13, 154,04, 153,86, 152,06, 149,29, 146,91, 136,71, 132,73, 132,59, 125,60, 123,90, 117,93, 111,16, 109,74, 107,83, 94,48, 88,10, 79,51, 70,33, 70,16, 69,41, 69,00, 60,35, 58,87, 55,44, 49,07, 46,98, 42,21, 31,49, 22,66, 13,38, 10,76.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₇H₄₀ClN₈O₈⁺ као [M + H]⁺: 759,2658, добијено: 759,2642.

Синтеза једињења (7) [369]



Шема 2. Реакциони услови: **I)** *t*-BuOK, ТХФ, 0°C-СТ, 16 сати, 51%; **II)** Џоунсов реагенс, Me₂CO, 0°C-СТ, 3 сата, 68%; **III)** EDC × HCl, ХБТ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 24%; **IV)** PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, Et₃N, ДМФ, СТ, 16 сати, 26%

(4): 2-(2-(2-(Проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етанол [373]

Суспензији *t*-BuOK (377 mg, 3,3629 mmol, 1,01 equiv) у сувом ТХФ-у (5 mL) на 0°C, у атмосфери азота, додат је раствор триетилен-гликола (1000 mg, 6,6591 mmol, 2,00 equiv) у сувом ТХФ-у (5 mL). Смеша је мешана на 0°C током 15 мин., након чега је укапавањем додат пропаргил-бромид (80% (w/w) у ксилену, 370 µL, 3,3296 mmol, 1,00 equiv). Реакциона смеша је затим остављена да се загреје до собне температуре и мешана је током 16 сати. Потом је реакција заустављена додавањем засићеног воденог раствора NH₄Cl (10 mL). Смеша је разблажена Et₂O (50 mL) и испрана H₂O (5 × 10 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованога Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et₂O/петрол-етар = 9/1 (v/v)), чиме је добијено једињење (4) (320 mg, 51%) у виду бледожутог уља. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [385].

(5): 2-(2-(2-(Проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)сирћетна киселина [374]

Раствор једињења (4) (100 mg, 0,5313 mmol, 1,0 equiv) у Me₂CO (5 mL), у атмосфери азота, додаван је укапавањем на 0°C у претходно охлађену смешу Џоунсовог реагенса* (550 µL, 1,0626 mmol, 2,0 equiv) и Me₂CO (5 mL). Реакциона смеша је затим остављена да се загреје до собне температуре и мешана је током 3 сата. Потом је охлађена на 0°C и реакција је заустављена додавањем *i*-PrOH (1 mL). Смеша је разблажена Et₂O (100 mL) и испрана H₂O (5 × 20 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованога Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском, чиме је добијено једињење (5) (73 mg, 68%) у виду беле, чврсте супстанце. ¹H НМР спектар био је у сагласности са литературним подацима [374].

*Џоунсов реагенс је припремљен растварањем CrO₃ (300 mg, 3,0003 mmol, 1,0 equiv) у H₂O (430 µL) на 0°C. Овом раствору су затим секвенцијално додати концентрована H₂SO₄ (18 M, 270 µL, 4,8004 mmol, 1,6 equiv) и H₂O (860 µL). Добијена смеша је мешана током 5 мин., чиме је добијен Џоунсов реагенс.

(6): *N*-(3-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)-2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)ацетамид [375]

У ДМФ-у (5 mL) помешани су једињење (**5**) (23 mg, 0,1137 mmol, 1,0 equiv), 3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропан-1-аминијум-хлорид (80 mg, 0,2275 mmol, 2,0 equiv), EDC × HCl (33 mg, 0,1706 mmol, 1,5 equiv), ХБТ (15 mg, 0,1137 mmol, 1,0 equiv) и ДИПЕА (40 μL, 0,2275 mmol, 2,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена AcOEt (100 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 10 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 96/4 (v/v)), чиме је добијено једињење (**6**) (14 mg, 25%) у виду жуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,81 (s, 1H), 7,32 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,76 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,15 (dd, *J* = 13,2, 4,8 Hz, 1H), 4,26 (dd, *J* = 48,4, 16,0 Hz, 2H), 4,18 (d, *J* = 0,4 Hz, 2H), 4,01 (s, 2H), 3,68 – 3,65 (m, 8H), 3,41 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,27 (s, 2H), 2,79 – 2,75 (m, 2H), 2,46 (s, 1H), 2,13 – 2,06 (m, 2H), 1,81 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 175,14, 174,38, 172,15, 168,21, 146,91, 133,86, 131,41, 127,41, 122,35, 118,88, 79,88, 74,81, 69,94, 69,79, 69,66, 68,94, 58,51, 55,58, 47,02, 41,85, 37,98, 29,80, 27,84, 23,73.

(7): 2-(2-(2-((3-(2-Амино-4-хлоро-7-((4-метокси-3,5-диметилпиридин-2-ил)метил)-7H-пироло[2,3-*d*]пиримидин-5-ил)проп-2-ин-1-ил)окси)етокси)етокси)-*N*-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)ацетамид [376]

Раствору 4-хлор-5-јодо-7-((4-метокси-3,5-диметилпиридин-2-ил)метил)-7H-пироло[2,3-*d*]пиримидин-2-амин (12 mg, 0,0280 mmol, 1,0 equiv) и једињења (**6**) (14 mg, 0,0280 mmol, 1,0 equiv) у сувом ДМФ-у (3 mL), у атмосфери азота, додати су PdCl₂(PPh₃)₂ (2 mg, 0,0028 mmol, 0,1 equiv), CuI (1 mg, 0,0056 mmol, 0,2 equiv) и Et₃N (10 μL, 0,0559 mmol, 2,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 48/2 → 46/4 (v/v)), чиме је добијено једињење (**7**) (6 mg, 26%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,77 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,22 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,63 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,27 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 5,09 (dd, *J* = 13,2, 5,1 Hz, 1H), 4,35 (s, 2H), 4,15 (dd, *J* = 53,1, 15,8 Hz, 2H), 3,92 (s, 2H), 3,74 – 3,72 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,65 – 3,64 (m, 2H), 3,59 (s, 4H), 3,34 (d, *J* = 6,2 Hz, 2H), 3,16 (s, 2H), 2,81 – 2,66 (m, 3H), 2,34 – 2,25 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,16 (s, 3H).

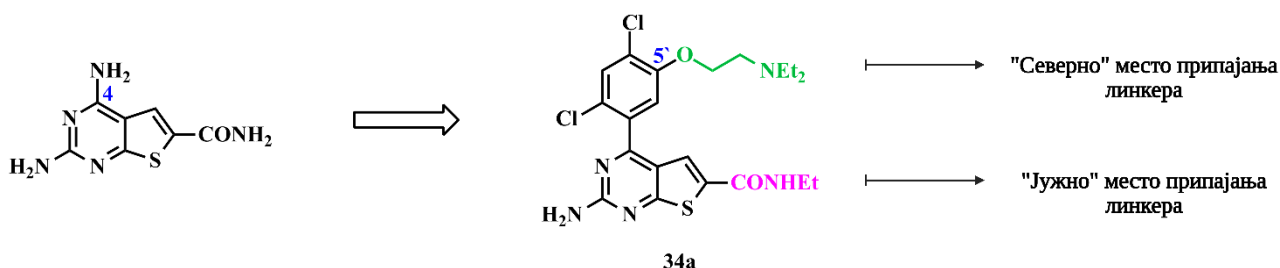
¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 175,14, 174,38, 172,15, 168,21, 163,45, 162,31, 155,69, 155,23, 154,77, 146,91, 145,42, 142,81, 133,86, 131,41, 127,47, 127,41, 124,04, 122,35, 120,60, 118,88, 117,81, 82,33, 79,26, 69,94, 69,79, 69,66, 68,94, 60,65, 57,26, 55,58, 48,47, 47,02, 41,85, 37,98, 29,80, 27,84, 23,73, 12,65, 10,35.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₄₀H₄₇ClN₉O₈⁺ као [M + H]⁺: 816,3236, добијено: 816,3229.

3.3. Дизајн и синтеза PROTAC молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету тиено[2,3-*d*]пиримидина

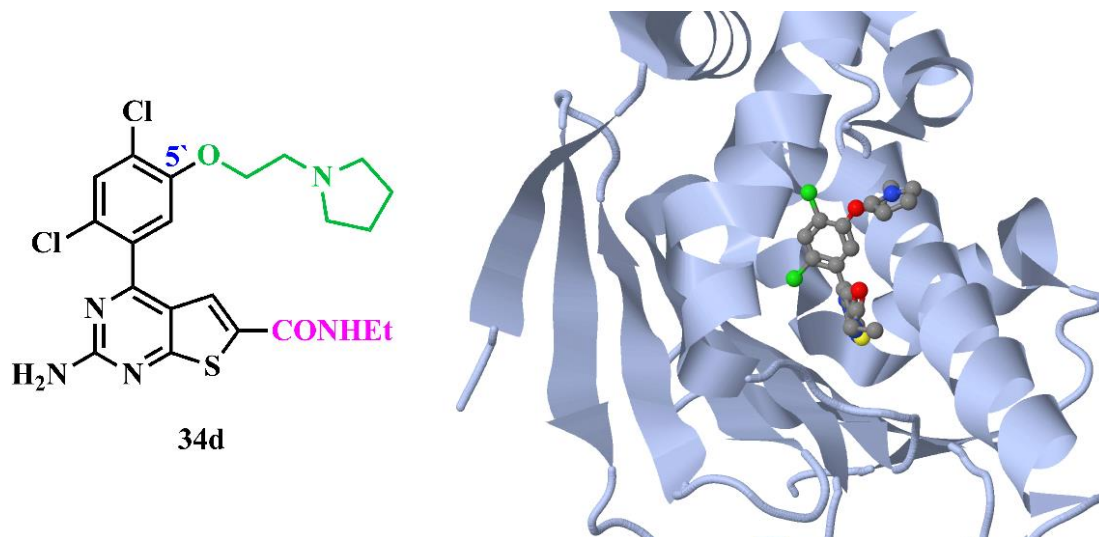
Дизајн инхибитора HSP90 који су деривати тиенопиримидина проистекао је из комбинације скрининга фрагмената, *in silico* докинга и кристалографских студија. Иницијално пронађени фрагменти који су се слабо везивали за џеп за везивање АТП-а у HSP90 упарени су са *in silico* добијеним скелетима, чиме је добијен хемотип 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидина. Накнадна оптимизација је обухватила увођење арилних супституената у положај 4, што је значајно повећало афинитет везивања и антипролиферативну активност у више ћелијских линија

карцинома. Водеће једињење (енг. *lead compound*) **34a** издвојило се након дериватизације у положају 5' арилног супституента, при чему је фенолна група служила као погодна функционална група за увођење солубилишућих група [377]. Овај положај представља „северно” место припајања линкера које омогућава увођење линкера усмерених ка региону изложеном растварачу. Паралелни напори су били усмерени на модификације амидног супституента везаног за тиофенски прстен, чиме је добијено „јужно” место припајања линкера (Слика 47).



Слика 47. Хемијска структура једињења **34a** са стрелицама које указују на „северно” место припајања линкера (зелено) на 5'-фенолном супституенту и „јужно” место припајања линкера (ружичасто) на амиду везаном за тиофенски прстен. Оба места су погодна за увођење линкера приликом дизајна PROTAC молекула.

Доступност ових места припајања линкера може се визуализовати и помоћу кристалне структуре *N*-терминалног домена HSP90 α у комплексу са једињењем **34d** (NVP-BEP800), другим инхибитором заснованим на скелету тиенопиримидина који је описан у истој серији. Свеукупно, ова сазнања су дефинисала два места припајања линкера која могу бити коришћена приликом дизајна PROTAC молекула (Слика 48).



Слика 48. Кристална структура *N*-терминалног домена HSP90 α у комплексу са једињењем **34d** (NVP-BEP800) која илуструје његову оријентацију унутар џепа за везивање АТП-а (PDB код: 2W17 [377])

3.3.1. Афинитет за HSP90 и ћелијска активност

Супституције на тиенопиримидинском језгру обављене на систематичан начин пружиле су увид у односе структуре и активности где се липофилни супституенти повезују са побољшаним афинитетом према HSP90 и антипролиферативним ефектима. Једињење **34a** је показало IC_{50} од 0,056 μM , уз снажну инхибицију раста (енг. *Growth Inhibition*, GI) у ћелијским линијама карцинома колоне, дојке, простате, меланома и плућа (GI_{50} вредности у распону од 0,073 до 0,498 μM). *Western blot* анализе су потврдиле да једињење **34a** изазива деградацију протеина-клијената HSP90 (HER2, CRAF, CDK4) и повећање експресије HSP72, што је последица инхибиције HSP90 [377].

3.3.2. Фармакокинетичка својства

In vitro студије метаболизма и фармакокинетичке студије показале су низак микрозомални промет међу различитим врстама животиња (16,9-19,3%), високо везивање за протеине плазме (више од 90%) и ограничену инхибицију цитохрома P450 (CYP450), изузев CYP2C19 са IC_{50} вредношћу од 0,34 μM . Након оралне примене код мишева уочена је добра изложеност, са AUC_{last} (површина испод криве концентрације у плазми у функцији времена од нултог тренутка до последње мерљиве концентрације) вредношћу од 858 ng h/mL, C_{max} вредношћу од 238 ng/mL и полувременом елиминације од 2,2 сата након примене дозе од 10 mg/kg [377].

3.3.3. Антитуморска ефикасност у *in vivo* условима

Једињење **34a** је показало снажну *in vivo* активност у моделима ксенографта. Орална примена у дозама од 50 mg/kg и 100 mg/kg довела је до 75,4% и 84,1% инхибиције раста тумора у WM266.4 ксенографтима меланома и изазвала регресије у моделима BT474 карцинома дојке и PC3 карцинома простате. Фармакодинамичке студије биомаркера у туморима потврдиле су смањење нивоа HER2 и фосфорилисаног ензима АКТ, уз истовремено нарушавање комплекса HSP90-p23 [377].

3.3.4. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула базираних на скелету тиено[2,3-*d*]пиримидина

PROTAC молекули засновани на тиено[2,3-*d*]пиримидину синтетисани су применом конвергентног, модуларног приступа, у оквиру кога је тиенопиримидински фрагмент најпре функционализован ради увођења места за везивање линкера, а затим је у касној фази синтезе додат фрагмент који регрутује CRBN.

Два алтернативна места припајања линкера на скелету тиено[2,3-*d*]пиримидина су коришћена:

„Северно“ место припајања линкера (фенол на позицији 5’). Фенол заштићен бензилном групом на позицији 5’ је најпре депротектован, чиме је добијена слободна фенолна група. Овај фенол је затим алкилован ради увођења линкера који садржи терминални алкин, што је омогућило накнадно повезивање са лигандом за CRBN.

„Јужно“ место припајања линкера (тиофен-6-карбоксилат). Етил-естар на позицији тиенопиримидин-6-карбоксилата је хидролизован до одговарајуће карбоксилне киселине. Ова киселина је послужила као место за увођење линкера или за директно повезивање лиганда за CRBN који садржи амин путем формирања амидне везе.

Након припреме тиенопиримидинског интермедијера, коначни PROTAC молекули су синтетисани купловањем са лигандом за CRBN. Купловање је обављено или формирањем амидне везе (за молекуле код којих се линкер налази „јужно“) или применом азид-алкин „клик“ реакције (за молекуле код којих се линкер налази „северно“, као и за неке молекуле код којих се линкер налази „јужно“), што је омогућило ефикасно варирање архитектуре линкера уз задржавање истог тиенопиримидинског језгра.

Општи поступак за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине [377]

Суспензији етил-естра (1 equiv) у EtOH и H₂O додати су NaOH (2 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 80°C током 1 сата. Потом је делимично концентрисана под сниженим притиском и закисељена додавањем концентроване HCl до pH вредности 1. Добијени талог је сакупљен филтрацијом, сукцесивно испран H₂O, EtOH и Et₂O и осушен, чиме су добијене одговарајуће карбоксилне киселине.

Општи поступак за синтезу амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине [375]

У ДМФ-у помешани су карбоксилна киселина (1,0 equiv), амин (2,0 equiv), EDC × HCl (1,5 equiv), ХБТ (1,0 equiv) и ДИПЕА (2,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена AcOEt и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући амиди.

Општи поступак за синтезу етил-амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине [378]

Карбоксилна киселина (1 equiv) је растворена у SOCl₂, а затим је реакциона смеша мешана на 75°C током 3 сата. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а затим су на 0°C додати ДХМ и EtNH₂ (70% (w/w) у H₂O, 10 equiv). Реакциона смеша је мешана на собној температури током 16 сати. Затим је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући етил-амиди.

Општи поступак за депротекцију фенола [379]

Раствору фенола заштићеног бензилном групом (1 equiv) у ТФСК-у додат је PhOMe (2 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 70°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, разблажена AcOEt и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући феноли.

Општи поступак за алкиловање фенола 2-хлороацетонитрилом [380]

Раствору фенола (1,0 equiv) у Me₂CO додати су K₂CO₃ (2,0 equiv), NaI (0,1 equiv) и 2-хлороацетонитрил (1,5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 60°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући алкиловани феноли.

Општи поступак за синтезу мезилата из одговарајућих алкохола [381]

Раствору алкохола (1,0 equiv) и Et₃N (1,5 equiv) у ДХМ-у на 0°C додат је MsCl (1,2 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 10 мин. Потом је разблажена ДХМ-ом и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући мезилати.

Општи поступак за алкиловање фенола мезилатима [382]

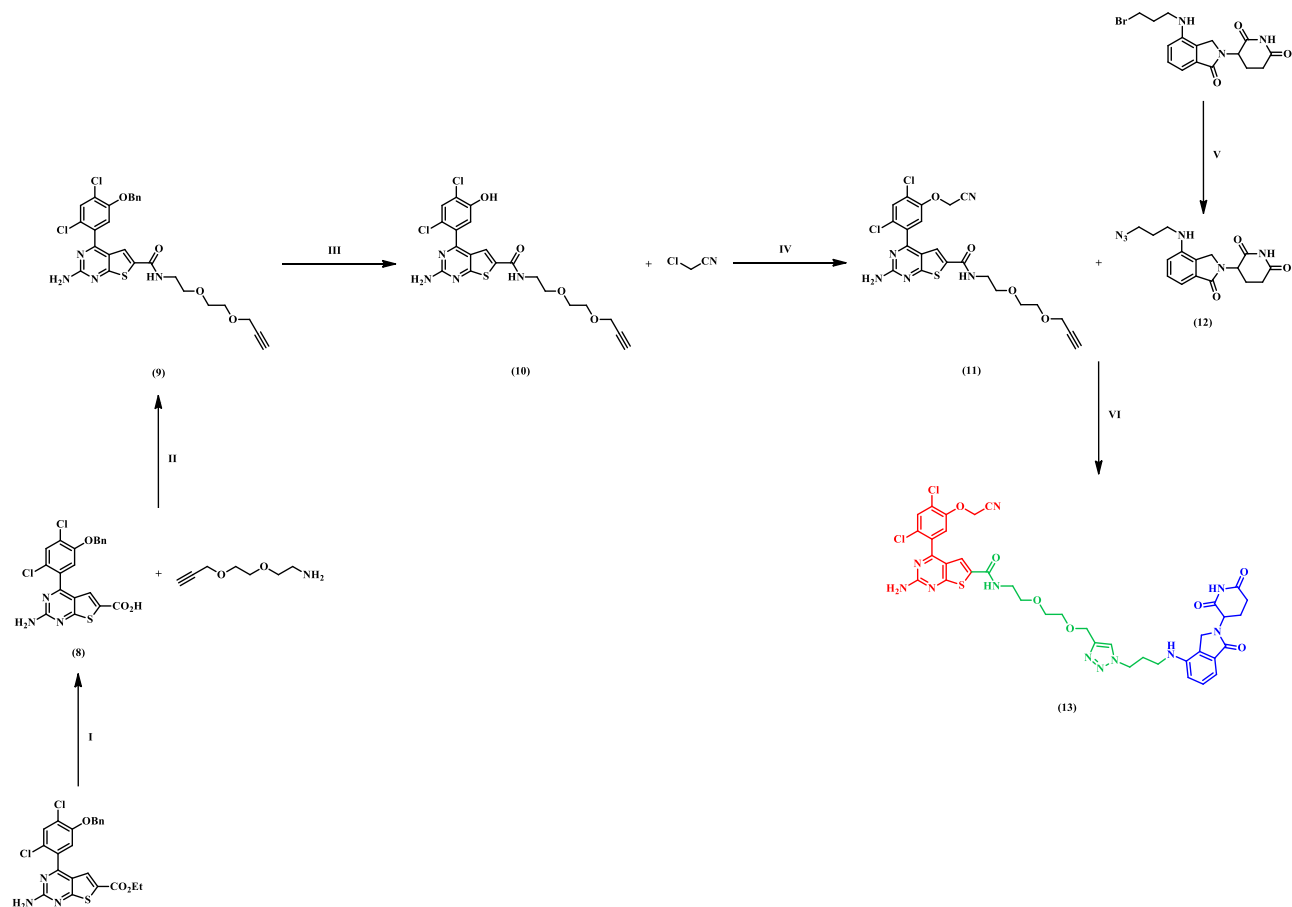
Раствору фенола (1,0 equiv) у АЦН-у додати су K₂CO₃ (2,0 equiv) и мезилат (1,5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 80°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим

притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући алкиловани феноли.

Општи поступак за „клик“ реакцију [383]

Раствору алкина (1 equiv), азида (1 equiv) и натријум-аскорбата (3 equiv) у *t*-BuOH и ДХМ-у додат је раствор $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (2 equiv) у H_2O , а затим је реакциона смеша мешана на собној температури 30 мин. Потом је разблажена АсОЕт и испрана 12,5% (w/w) раствором NH_4OH у H_2O . Органски слој је осушен преко анхидрованог Na_2SO_4 , профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући триазоли.

Синтеза једињења (13) [369]



Шема 3. Реакциони услови: **I)** NaOH, EtOH, H₂O, 80°C, 1 сат, 62%; **II)** EDC × HCl, ХБТ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 66%; **III)** ТФСК, PhOMe, 70°C, 16 сати, 80%; **IV)** K₂CO₃, NaI, Me₂CO, 60°C, 16 сати, 77%; **V)** NaN₃, ДМФ, 60°C, 16 сати, 81%; **VI)** CuSO₄ × 5H₂O, натријум-аскорбат, *t*-BuOH, ДХМ, H₂O, СТ, 30 мин., 47%

(8): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорфенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилна киселина

Једињење **(8)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилата (266 mg, 0,5608 mmol), EtOH (6 mL), H₂O (0,6 mL) и NaOH (45 mg, 1,1216 mmol). Испирањем талога уз H₂O, EtOH и Et₂O и сушењем добијен је производ (155 mg, 62%) у виду жуте, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(9): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорфенил)-*N*-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(9)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем ДМФ-а (3 mL), карбоксилне киселине **(8)** (50 mg, 0,1120 mmol), 2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етанамина (32 mg, 0,2241 mmol), EDC × HCl (32 mg, 0,1680 mmol), ХБТ (15 mg, 0,1120 mmol) и ДИПЕА (40 μL, 0,2241 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (100 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/MeOH = 50/0,5 → 50/1,0 (v/v)) добијен је производ (42 mg, 66%) у виду жуто-наранџасте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,71 (s, 1H), 7,39 (t, *J* = 4,0 Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,29 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 5,19 (s, 2H), 4,10 (s, 2H), 3,48 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,60 – 3,54 (m, 6H), 2,68 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 164,55, 163,57, 162,41, 156,67, 152,91, 137,09, 132,58, 131,61, 130,90, 128,32, 128,17, 128,16, 128,01, 126,94, 118,99, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 72,18, 71,43, 69,94, 69,79, 58,51, 40,54.

(10): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)-*N*-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(10)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем једињења **(9)** (36 mg, 0,0630 mmol), ТФСК (2 mL) и PhOMe (15 μL, 0,1260 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/MeOH = 99/1 → 98/2 (v/v)) добијен је производ (24 mg, 80%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,49 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,06 (s, 1H), 4,38 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 3,83 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,67 – 3,58 (m, 4H), 3,26 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,76 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 164,55, 163,57, 162,41, 153,52, 152,91, 132,00, 131,98, 131,61, 125,57, 123,11, 118,17, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 72,18, 69,94, 69,79, 58,51, 40,54.

(11): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(цијанометокси)фенил)-*N*-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(11)** синтетисано је према општем поступку за алкиловање фенола 2-хлороацетонитрилом коришћењем једињења **(10)** (20 mg, 0,0416 mmol), Me₂CO (2 mL), K₂CO₃ (11 mg, 0,0831 mmol), NaI (0,6 mg, 0,0042 mmol) и 2-хлороацетонитрила (5 μL, 0,0623 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 99/1 → 98/2 (v/v)) добијен је производ (17 mg, 77%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,70 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,44 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 3,64 (t, J = 4,0 Hz, 4H), 3,57 (t, J = 4,0 Hz, 2H), 3,22 (q, J = 4,0 Hz, 2H), 2,76 (t, J = 2,2 Hz, 1H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 164,55, 163,57, 162,41, 156,67, 152,91, 132,58, 131,61, 130,90, 128,01, 126,94, 119,15, 118,99, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 72,18, 69,94, 69,79, 58,51, 56,56, 40,54.

(12): 3-(4-((3-Азидопропил)амино)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион [384]

У раствор 3-(4-((3-бромопропил)амино)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (30 mg, 0,0789 mmol, 1 equiv) у ДМФ-у (2 mL) додат је NaN₃ (15 mg, 0,2367 mmol, 3 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 60°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 99/1 (v/v)), чиме је добијено једињење **(12)** (22 mg, 81%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [385].

(13): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(цијанометокси)фенил)-N-(2-(2-((1-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)етокси)етил)тиено[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид [383]

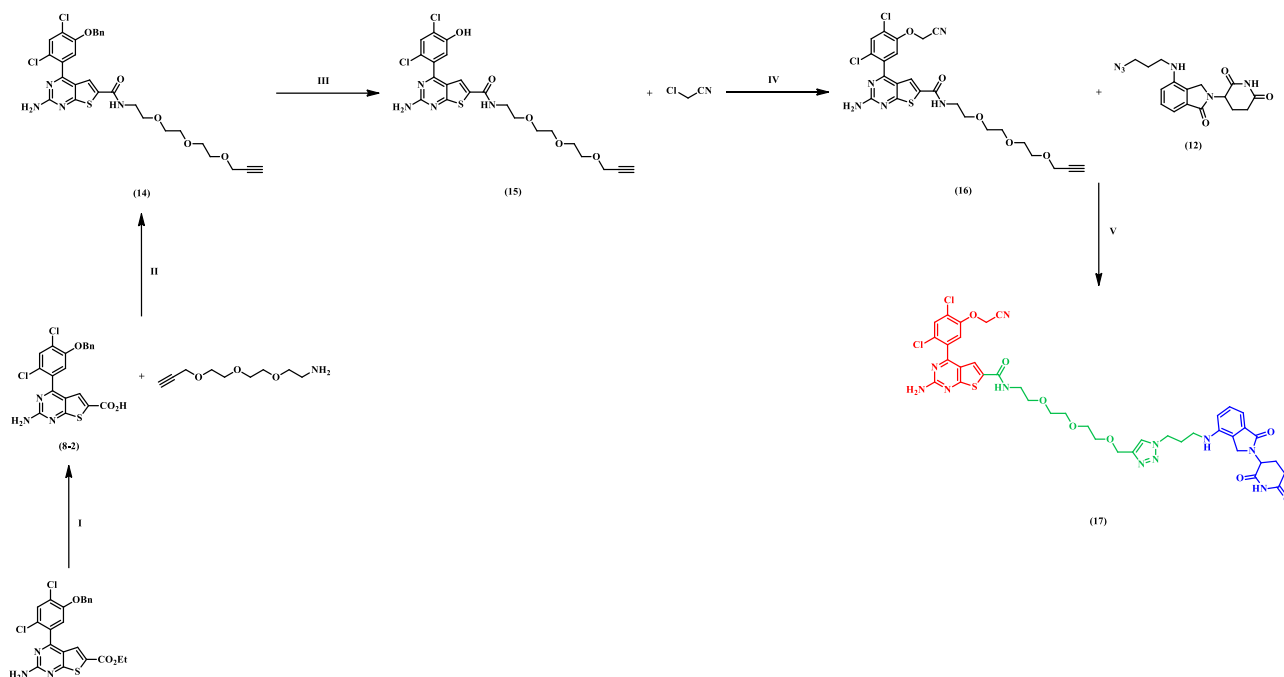
Једињење **(13)** синтетисано је према општем поступку за „клик“ реакцију коришћењем једињења **(11)** (7 mg, 0,0134 mmol), једињења **(12)** (4,6 mg, 0,0134 mmol), натријум-аскорбата (8 mg, 0,0404 mmol), *t*-BuOH (0,4 mL), ДХМ-а (0,2 mL), CuSO₄ × 5H₂O (7 mg, 0,0269 mmol) и H₂O (0,2 mL). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана 12,5% (w/w) раствором NH₄OH у H₂O (5 × 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 24/1 (v/v)) добијен је производ (5 mg, 42%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,79 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,43 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,20 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,66 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,07 – 5,01 (m, 3H), 4,48 (s, 2H), 4,41 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 4,17 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,50 (s, 2H), 3,47 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,15 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,86 – 2,76 (m, 2H), 2,71 – 2,65 (m, 2H), 2,35 (ddd, J = 26,4, 13,3, 4,6 Hz, 2H), 2,15 – 2,10 (m, 2H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CD₃OD): δ = 173,31, 172,04, 171,00, 162,68, 161,58, 161,28, 151,38, 144,58, 143,26, 135,57, 132,59, 131,64, 131,31, 129,62, 129,27, 128,13, 126,93, 125,69, 125,19, 123,83, 121,88, 121,72, 116,02, 114,93, 112,39, 110,97, 70,00, 69,27, 69,00, 63,58, 54,45, 52,17, 45,91, 39,83, 39,53, 31,01, 29,09, 22,90.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₈H₃₈Cl₂N₁₁O₇S⁺ као [M + H]⁺: 862,2048, добијено: 862,2059.

Синтеза једињења (17) [369]



Шема 4. Реакциони услови: **I)** NaOH, EtOH, H₂O, 80°C, 1 сат, 70%; **II)** EDC × HCl, ХБТ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 58%; **III)** ТФСК, PhOMe, 70°C, 16 сати, 75%; **IV)** K₂CO₃, NaI, Me₂CO, 60°C, 16 сати, 95%; **V)** CuSO₄ × 5H₂O, натријум-аскорбат, *t*-BuOH, ДХМ, H₂O, СТ, 30 мин., 50%

(8-2): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорфенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилна киселина [377]

Једињење **(8-2)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилата (283 mg, 0,5966 mmol), EtOH (3 mL), H₂O (0,3 mL) и NaOH (48 mg, 1,1932 mmol). Испирањем талога уз H₂O, EtOH и Et₂O и сушењем добијен је производ (186 mg, 70%) у виду жуте, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(14): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорфенил)-*N*-(2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(14)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем ДМФ-а (3 mL), једињења **(8-2)** (40 mg, 0,0896 mmol), 2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етанамина (34 mg, 0,1792 mmol), EDC × HCl (26 mg, 0,1344 mmol), ХБТ (12 mg, 0,0896 mmol) и ДИПЕА (30 μL, 0,1792 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (100 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/MeOH = 10/0,1 (v/v)) добијен је производ (32 mg, 58%) у виду жуто-наранџасте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃CN): δ = 7,71 (s, 1H), 7,39 (t, *J* = 4,0 Hz, 2H), 7,36 (s, 1H), 7,29 (t, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 7,28 (s, 1H), 7,16 (s, 1H), 5,89 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 4,10 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,60 – 3,53 (m, 9H), 3,48 (dd, *J* = 11,0, 5,4 Hz, 2H), 2,68 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃CN): δ = 164,55, 163,57, 162,41, 156,67, 152,91, 137,09, 132,58, 131,61, 130,90, 128,32, 128,17, 128,16, 128,01, 126,94, 118,99, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 72,18, 71,43, 69,94, 69,79, 58,51, 40,54.

(15): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)-*N*-(2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(15)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем једињења **(14)** (28 mg, 0,0455 mmol), ТФСК (2 mL) и PhOMe (10 μ L, 0,0910 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 \times 5 mL), а флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 10/0,2 (v/v)) добијен је производ (18 mg, 75%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,49 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,06 (s, 1H), 4,40 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 3,49 – 3,43 (m, 8H), 3,36 (t, J = 4,0 Hz, 2H), 3,15 (t, J = 4,0 Hz, 2H), 2,76 (t, J = 2,2 Hz, 1H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 164,55, 163,57, 162,41, 153,52, 152,91, 132,00, 131,98, 131,61, 125,57, 123,11, 118,17, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 72,18, 69,94, 69,79, 58,51, 40,54.

(16): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(цијанометокси)фенил)-*N*-(2-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(16)** синтетисано је према општем поступку за алкиловање фенола 2-хлороацетонитрилом коришћењем једињења **(15)** (18 mg, 0,0343 mmol), Me₂CO (2 mL), K₂CO₃ (9 mg, 0,0685 mmol), NaI (0,5 mg, 0,0034 mmol) и 2-хлороацетонитрила (5 μ L, 0,0514 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 10/0,2 (v/v)) добијен је производ (18 mg, 95%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,77 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,40 (d, J = 4,0 Hz, 2H), 3,49 – 3,43 (m, 8H), 3,36 (t, J = 4,0 Hz, 2H), 3,15 (t, J = 4,0 Hz, 2H), 2,76 (t, J = 2,2 Hz, 1H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 164,55, 163,57, 162,41, 156,67, 152,91, 132,58, 131,61, 130,90, 128,01, 126,94, 119,15, 118,99, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 72,18, 69,94, 69,79, 58,51, 56,56, 40,54.

(17): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(цијанометокси)фенил)-*N*-(2-(2-(2-((1-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)етокси)етокси)етил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

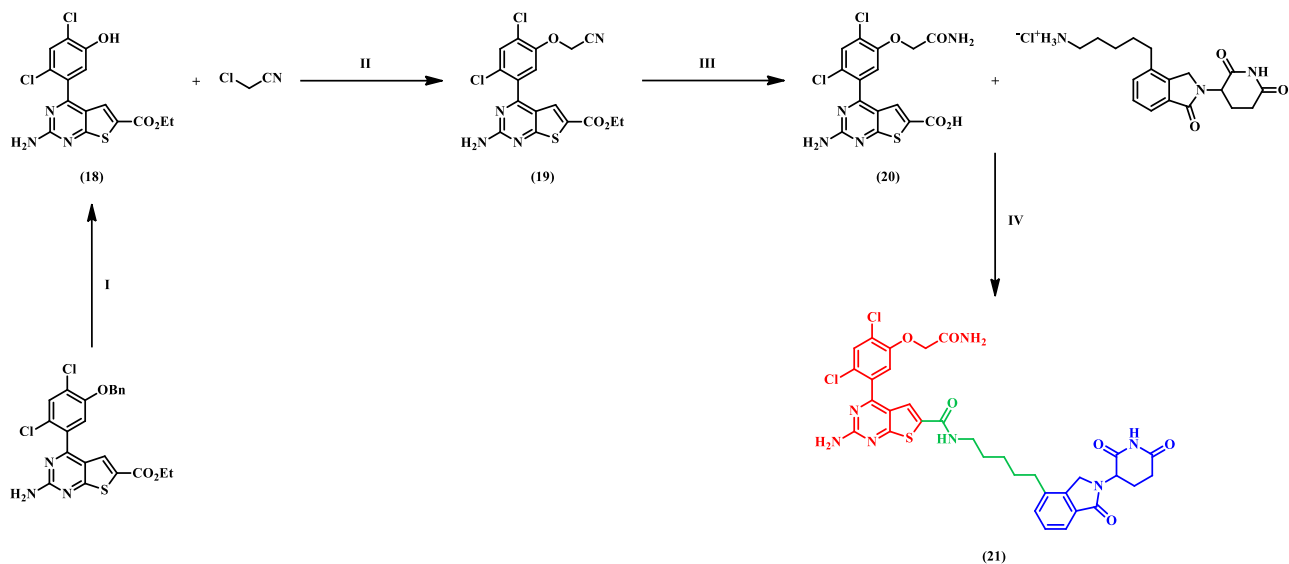
Једињење **(17)** синтетисано је према општем поступку за „клик“ реакцију коришћењем једињења **(16)** (10 mg, 0,0177 mmol), једињења **(12)** (6 mg, 0,0177 mmol), натријум-аскорбата (11 mg, 0,0531 mmol), *t*-BuOH (0,6 mL), ДХМ-а (0,3 mL), CuSO₄ \times 5H₂O (9 mg, 0,0354 mmol) и H₂O (0,3 mL). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана 12,5% (w/w) раствором NH₄OH у H₂O (5 \times 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 98/2 \rightarrow 97/3 (v/v)) добијен је производ (8 mg, 50%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,77 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,20 (t, J = 10,0 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,66 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,07 – 5,02 (m, 3H), 4,42 (s, 2H), 4,40 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 4,17 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 3,50 – 3,43 (m, 8H), 3,36 (t, J = 5,3 Hz, 2H), 3,15 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,85 – 2,77 (m, 2H), 2,72 – 2,65 (m, 2H), 2,36 (ddd, J = 26,5, 13,3, 4,6 Hz, 2H), 2,13 (t, J = 5,0 Hz, 2H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CD₃OD): δ = 173,32, 172,04, 170,99, 170,88, 162,61, 161,57, 161,29, 151,39, 144,59, 143,28, 135,62, 132,58, 131,64, 131,30, 129,61, 129,28, 128,13, 126,93, 125,70, 125,18, 123,84, 121,91, 121,72, 116,04, 114,91, 112,40, 110,97, 70,16, 70,08, 69,85, 69,26, 68,97, 63,56, 54,46, 52,17, 39,85, 39,64, 31,01, 29,09, 22,90.

HRMS (ESI): m/z израчунато за $C_{40}H_{42}Cl_2N_{11}O_8S^+$ као $[M + H]^+$: 906,2310, добијено: 906,2306.

Синтеза једињења (21) [369]



Шема 5. Реакциони услови: **I)** ТФСК, PhOMe, 70°C, 16 сати, 69%; **II)** K₂CO₃, NaI, Me₂CO, 60°C, 16 сати, 80%; **III)** NaOH, EtOH, H₂O, 80°C, 1 сат, 77%; **IV)** EDC × HCl, ХБТ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 40%

(18): Етил-2-амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат

Једињење **(18)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилата (100 mg, 0,2109 mmol), ТФСК (3 mL) и PhOMe (45 μL, 0,4216 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена AcOEt (150 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 × 15 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/AcOEt = 8/2 → 6/4 (v/v)) добијен је производ (56 mg, 69%) у виду жуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [398].

(19): Етил-2-амино-4-(2,4-дихлоро-5-(цијанометокси)фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат

Једињење **(19)** синтетисано је према општем поступку за алкиловање фенола 2-хлороацетонитрилом коришћењем једињења **(18)** (27 mg, 0,0703 mmol), Me₂CO (2 mL), K₂CO₃ (19 mg, 0,1406 mmol), NaI (1,1 mg, 0,0070 mmol) и 2-хлороацетонитрила (10 μL, 0,1054 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/MeOH = 10/0 → 10/0,1 (v/v)) добијен је производ (24 mg, 80%) у виду жуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,77 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,32 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,33 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,34 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 164,55, 163,14, 162,41, 156,67, 152,91, 132,58, 130,90, 128,44, 128,01, 126,94, 119,15, 118,99, 118,63, 113,57, 61,50, 56,56, 14,70.

(20): 2-Амино-4-(5-(2-амино-2-оксоетокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилна киселина

Једињење **(20)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем једињења **(19)** (23 mg,

0,0543 mmol), EtOH (1 mL), H₂O (0,1 mL) и NaOH (4,3 mg, 0,1087 mmol). Талог који је настао након закишељавања, испирања у балону H₂O, EtOH и Et₂O и сушења дао је производ (17 mg, 77%) у виду бледожуте, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(21): 2-Амино-4-(5-(2-амино-2-оксоетокси)-2,4-дихлорфенил)-*N*-(5-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)пентил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

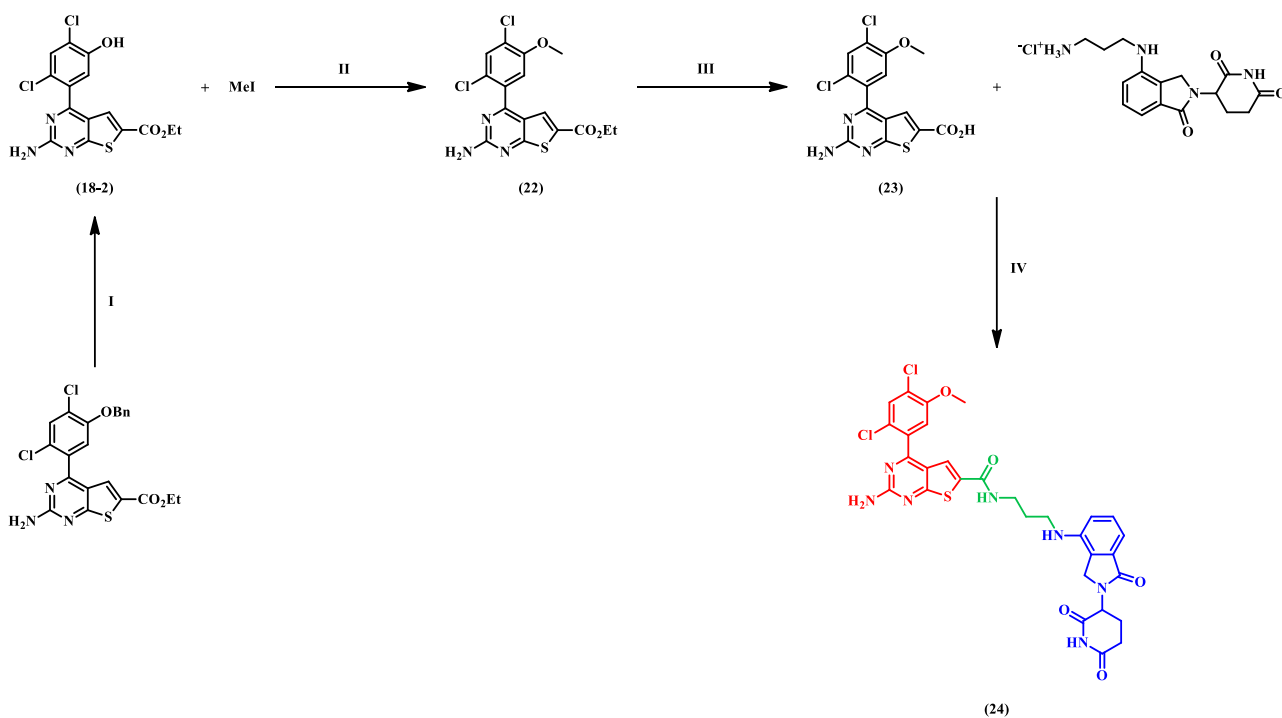
Једињење **(21)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем ДМФ-а (3 mL), једињења **(20)** (17 mg, 0,0411 mmol), 5-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)пентан-1-аминијум-хлорида (30 mg, 0,0823 mmol), EDC × HCl (12 mg, 0,0617 mmol), ХБТ (6 mg, 0,0411 mmol) и ДИПЕА (15 μL, 0,0823 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 96/4 (v/v)) добијен је производ (12 mg, 40%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,70 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H), 7,46 – 7,39 (m, 3H), 7,23 (s, 1H), 5,17 – 5,11 (m, 1H), 4,64 (s, 2H), 4,46 (q, *J* = 17,2 Hz, 2H), 2,96 – 2,84 (m, 2H), 2,87 – 2,74 (m, 2H), 2,70 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 2,53 (q, *J* = 4,0 Hz, 2H), 2,21 – 2,11 (m, 2H), 1,73 – 1,57 (m, 4H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 173,33, 171,61, 171,50, 169,17, 168,82, 161,79, 161,58, 161,43, 152,94, 140,97, 137,89, 135,94, 133,13, 132,02, 131,92, 130,98, 128,69, 125,31, 123,83, 123,51, 121,65, 121,05, 115,96, 68,00, 52,01, 46,68, 31,65, 31,58, 31,15, 29,40, 29,27, 26,77, 22,96.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₃H₃₂Cl₂N₇O₆S⁺ као [M + H]⁺: 724,1506, добијено: 724,1524.

Синтеза једињења (24)



Шема 6. Реакциони услови: **I)** ТФСК, PhOMe, 70°C, 16 сати, 57%; **II)** K₂CO₃, ДМФ, 45°C, 16 сати, 57%; **III)** NaOH, EtOH, H₂O, 80°C, 1 сат, 85%; **IV)** EDC × HCl, ХБТ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 50%

(18-2): Етил-2-амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат

Једињење **(18-2)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилата (122 mg, 0,2572 mmol), ТФСК (4 mL) и PhOMe (60 μ L, 0,5144 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена AcOEt (150 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 \times 15 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/AcOEt = 8/2 \rightarrow 6/4 (v/v)) добијен је производ (56 mg, 57%) у виду жуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [386].

(22): Етил-2-амино-4-(2,4-дихлоро-5-метоксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат [387]

У раствор једињења **(18-2)** (56 mg, 0,1457 mmol, 1,0 equiv) у ДМФ-у (5 mL) додати су K₂CO₃ (60 mg, 0,4372 mmol, 3,0 equiv) и MeI (3 \times 50 μ L, 2,4047 mmol, 16,5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 45°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/AcOEt = 8/2 \rightarrow 7/3 (v/v)), чиме је добијено једињење **(22)** (33 mg, 57%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃CN): δ = 7,67 (s, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 4,33 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 1,34 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃CN): δ = 164,55, 163,14, 162,41, 156,99, 152,91, 132,98, 130,78, 128,44, 127,77, 124,69, 118,63, 116,92, 113,57, 61,50, 56,79, 14,70.

(23): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-метоксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилна киселина

Једињење **(23)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем једињења **(22)** (33 mg, 0,0829 mmol), EtOH (1 mL), H₂O (0,1 mL) и NaOH (7 mg, 0,1657 mmol). Талог који је настао након закишељавања, испирања у балону H₂O, EtOH и Et₂O и сушења дао је производ (26 mg, 85%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(24): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-метоксифенил)-*N*-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

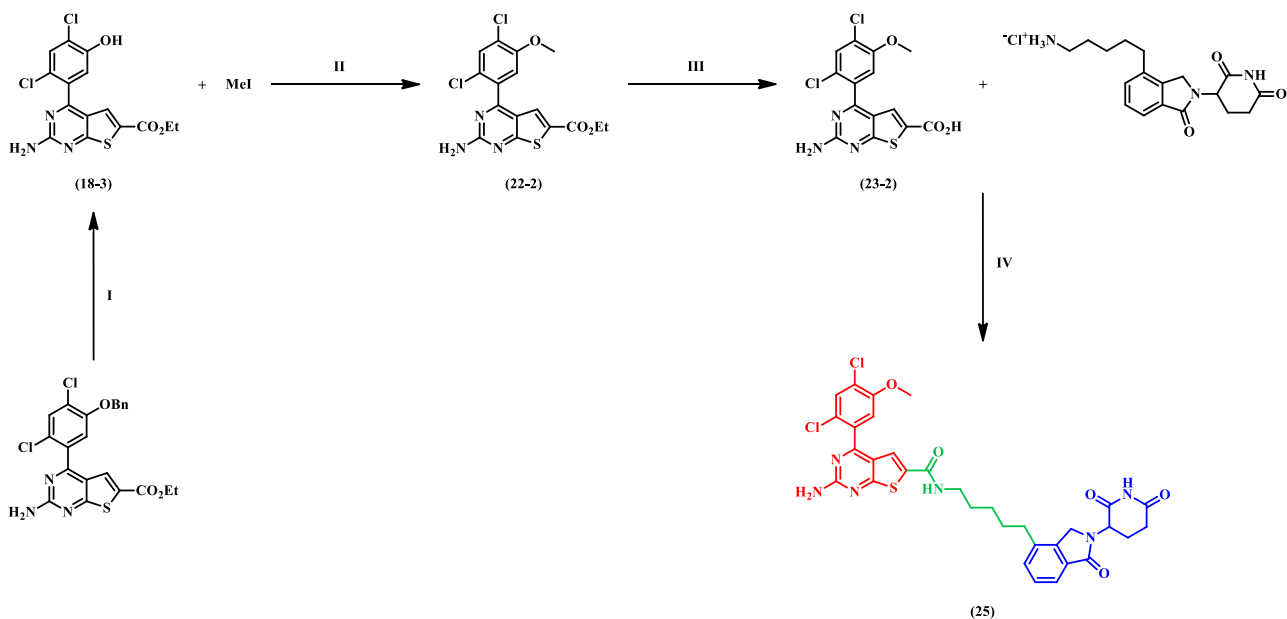
Једињење **(24)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), једињења **(23)** (12 mg, 0,0324 mmol), 3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропан-1-аминијум-хлорида (23 mg, 0,0648 mmol), EDC \times HCl (9 mg, 0,0486 mmol), ХБТ (4,4 mg, 0,0324 mmol) и ДИПЕА (10 μ L, 0,0648 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 9/1 \rightarrow 6/4 (v/v)) добијен је производ (11 mg, 50%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (500 MHz, CD₃OD): δ = 7,63 (s, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,30 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,07 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,13 (dd, J = 13,3, 5,1 Hz, 1H), 4,27 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,46 (dd, J = 14,3, 7,1 Hz, 2H), 3,32 – 3,27 (m, 2H), 2,96 – 2,87 (m, 2H), 2,44 (ddd, J = 26,4, 13,2, 4,5 Hz, 2H), 1,92 (dt, J = 13,2, 6,5 Hz, 2H).

^{13}C НМР спектар (126 MHz, CD_3OD): $\delta = 173,30, 171,93, 171,03, 170,87, 162,81, 162,25, 161,33, 154,34, 143,42, 135,45, 132,43, 131,57, 130,55, 129,22, 126,85, 124,28, 122,97, 121,96, 121,81, 113,77, 112,49, 110,74, 55,85, 52,16, 45,88, 40,31, 37,30, 30,99, 28,21, 22,85$.

HRMS (ESI): m/z израчунато за $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_5\text{S}^+$ као $[\text{M} + \text{H}]^+$: 668,1244, добијено: 668,1273.

Синтеза једињења (25)



Шема 7. Реакциони услови: **I)** ТФСК, PhOMe, 70°C, 16 сати, 74%; **II)** K_2CO_3 , ДМФ, 45°C, 16 сати, 45%; **III)** NaOH, EtOH, H_2O , 80°C, 1 сат, 87%; **IV)** EDC \times HCl, ХБТ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 27%

(18-3): Етил-2-амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат

Једињење **(18-3)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилата (200 mg, 0,4216 mmol), ТФСК (6 mL) и PhOMe (90 μ L, 0,8432 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена AcOEt (200 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 \times 20 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/AcOEt = 8/2 \rightarrow 6/4 (v/v)) добијен је производ (120 mg, 74%) у виду жуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [386].

(22-2): Етил-2-амино-4-(2,4-дихлоро-5-метоксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилат [387]

У раствор једињења **(18-3)** (19 mg, 0,0494 mmol, 1,0 equiv) у ДМФ-у (2 mL) додати су K₂CO₃ (20 mg, 0,1483 mmol, 3,0 equiv) и MeI (2 \times 25 μ L, 0,8159 mmol, 16,5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 45°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/AcOEt = 8/2 \rightarrow 7/3 (v/v)), чиме је добијено једињење **(22-2)** (9 mg, 45%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су идентични онима који су претходно описани за једињење **(22)**.

(23-2): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-метоксифенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилна киселина

Једињење **(23-2)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем једињења **(22-2)** (9 mg, 0,0226 mmol), EtOH (1 mL), H₂O (0,1 mL) и NaOH (2 mg, 0,0452 mmol). Талог који је настао након закишељавања, испирања у балону H₂O, EtOH и Et₂O и сушења дао је производ (7 mg, 87%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(25): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-метоксифенил)-*N*-(5-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)пентил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида

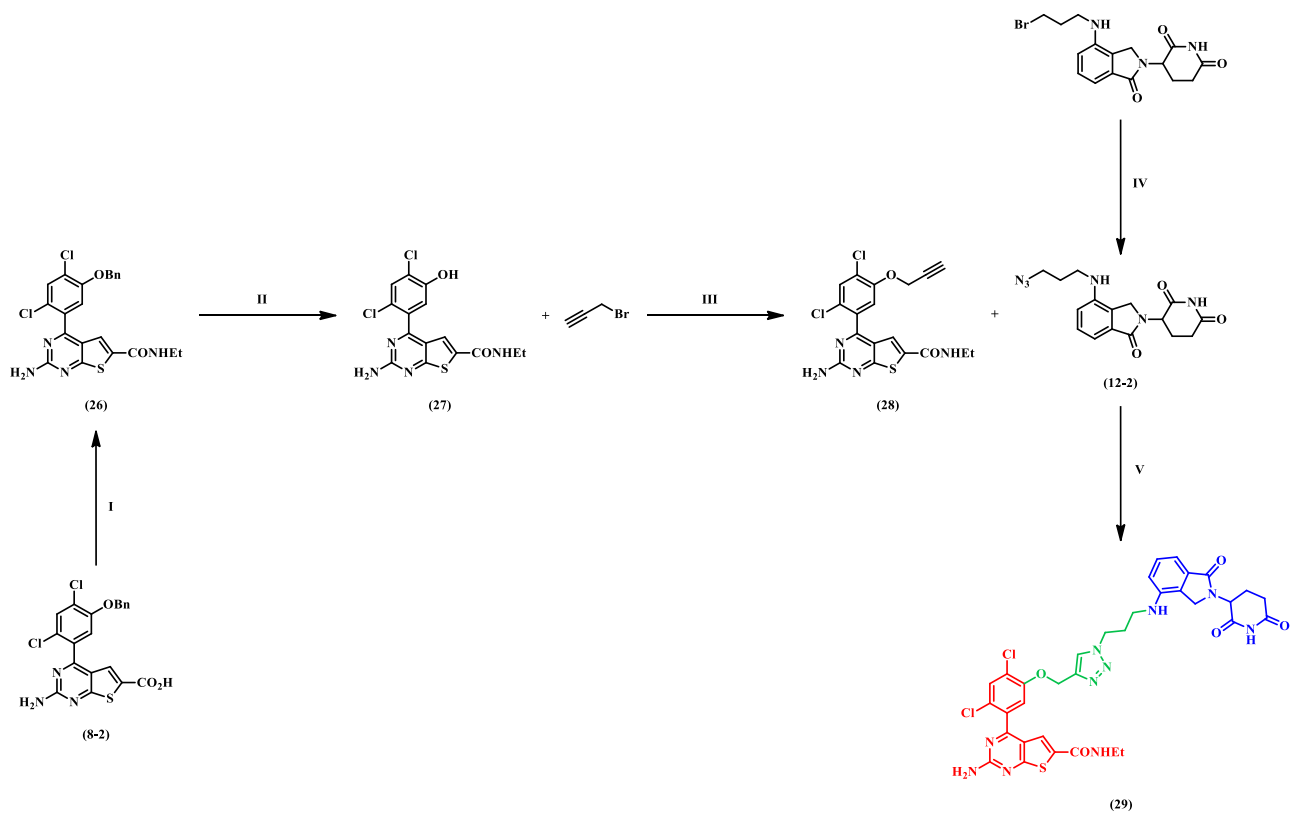
Једињење **(25)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), једињења **(23-2)** (7 mg, 0,0189 mmol), 5-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)пентан-1-аминијум-хлорида (14 mg, 0,0378 mmol), EDC \times HCl (5 mg, 0,0284 mmol), ХБТ (2,6 mg, 0,0189 mmol) и ДИПЕА (10 μ L, 0,0378 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (20 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 Ml). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 9/2 \rightarrow 9/9 (v/v)) добијен је производ (3,5 mg, 27%) у виду беле, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,62 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,45 – 7,37 (m, 2H), 7,22 (s, 1H), 5,13 (dd, *J* = 13,4, 5,2 Hz, 1H), 4,46 (q, *J* = 17,0 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 2,92 – 2,84 (m, 1H), 2,83 – 2,74 (m, 1H), 2,69 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,53 (qd, *J* = 8,0, 4,0 Hz, 2H), 2,22 – 2,11 (m, 2H), 2,01 (t, *J* = 11,1 Hz, 2H), 1,70 (quint, *J* = 8,0 Hz, 2H), 1,61 (quint, *J* = 8,0 Hz, 2H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 175,14, 174,38, 168,21, 164,55, 163,57, 162,41, 156,99, 152,91, 144,73, 140,92, 133,67, 133,02, 132,98, 131,61, 130,78, 127,77, 126,85, 124,69, 123,93, 116,92, 115,33, 113,57, 56,79, 55,58, 47,20, 41,50, 34,88, 29,95, 29,80, 29,49, 26,61, 23,73.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₂H₃₁Cl₂N₆O₅S⁺ као [M + H]⁺: 681,1448, добијено: 681,1453.

Синтеза једињења (29) [369]



Шема 8. Реакциони услови: **I)** а) SOCl_2 , 75°C , 3 сата; б) EtNH_2 , ДХМ, 0°C - СТ, 16 сати, 67%; **II)** ТФСК, PhOMe , 70°C , 16 сати, 71%; **III)** K_2CO_3 , АЦН, 80°C , 16 сати, 96%; **IV)** NaN_3 , ДМФ, 60°C , 16 сати, 92%; **V)** $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, натријум-аскорбат, *t*-BuOH, ДХМ, H_2O , СТ, 30 мин., 45%

(26): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(26)** синтетисано је према општем поступку за синтезу етил-амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем једињења **(8-2)** (60 mg, 0,1344 mmol), SOCl_2 (3 mL), ДХМ-а (3 mL) и EtNH_2 (110 μL , 1,3444 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 8/2 \rightarrow 4/6 (v/v)) добијен је производ (43 mg, 67%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [377].

(27): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(27)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем једињења **(26)** (43 mg, 0,0908 mmol), ТФСК (2 mL) и PhOMe (20 μL , 0,1817 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO_3 (3 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 98/2 (v/v)) добијен је производ (25 mg, 71%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [377].

(28): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(проп-2-ин-1-илокси)фенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид [388]

У раствор једињења **(27)** (24 mg, 0,0626 mmol, 1,0 equiv) у АЦН-у (2 mL) додати су K_2CO_3 (13 mg, 0,0939 mmol, 1,5 equiv) и пропаргил-бромид (80% (w/w) у ксилену, 10 μL , 0,0939 mmol, 1,5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 80°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 97/3 (v/v)), чиме је добијено једињење **(28)** (26 mg, 96%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CD_3CN): $\delta = 7,69$ (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 5,87 (s, 2H), 3,33 (quint, $J = 8,0$ Hz, 2H), 2,21 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H), 1,16 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CD_3CN): $\delta = 164,55, 162,41, 162,18, 156,67, 152,91, 132,58, 131,61, 130,90, 128,01, 126,94, 118,99, 115,33, 113,57, 80,00, 78,79, 59,70, 36,67, 14,27$.

(12-2): 3-(4-((3-Азидопропил)амино)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион [384]

У раствор 3-(4-((3-бромопропил)амино)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (15 mg, 0,0394 mmol, 1 equiv) у ДМФ-у (2 mL) додат је NaN_3 (8 mg, 0,1183 mmol, 3 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 60°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 99/1 (v/v)), чиме је добијено једињење **(12-2)** (12 mg, 92%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [385].

(29): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-((1-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)фенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

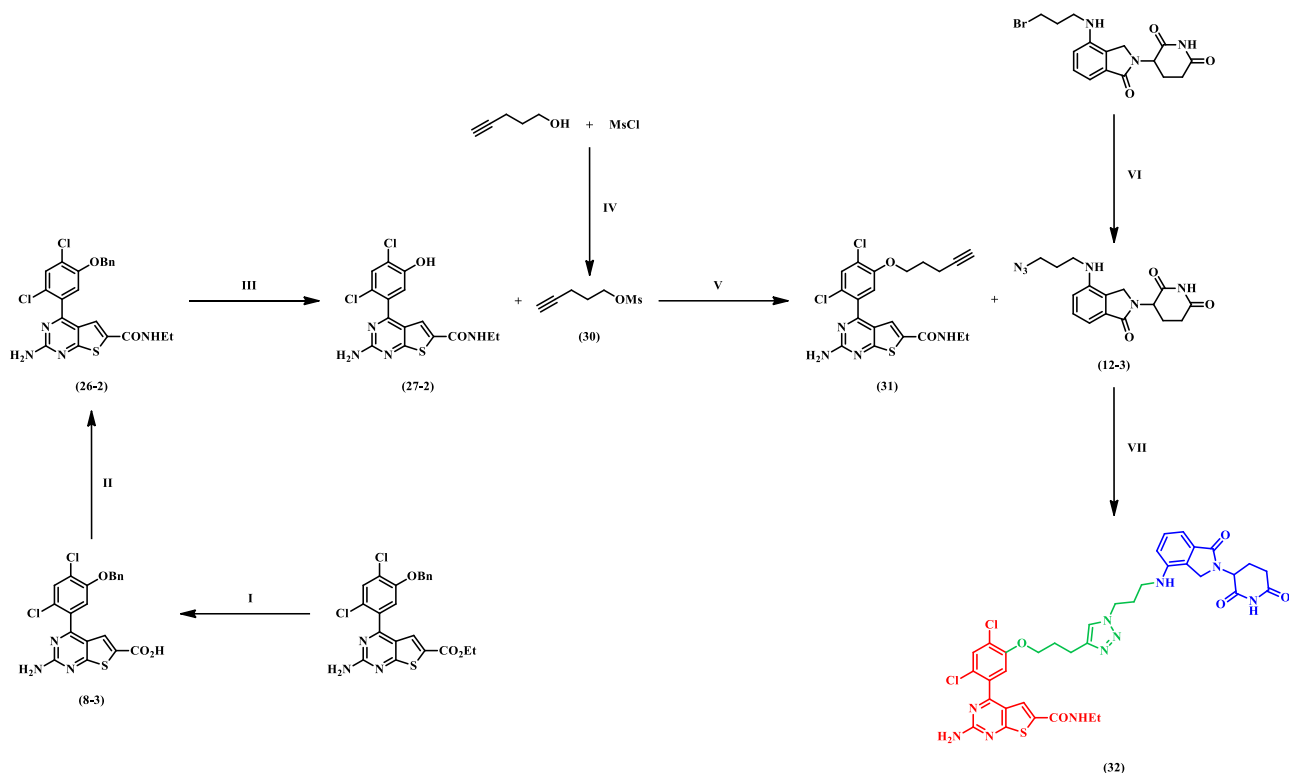
Једињење (29) синтетисано је према општем поступку за „клик“ реакцију, коришћењем једињења (28) (11 mg, 0,0261 mmol), једињења (12-2) (9 mg, 0,0261 mmol), натријум-аскорбата (16 mg, 0,0783 mmol), *t*-BuOH (0,90 mL), ДХМ-а (0,45 mL), CuSO₄ × 5H₂O (13 mg, 0,0522 mmol) и H₂O (0,45 mL). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана 12,5% (w/w) раствором NH₄OH у H₂O (5 × 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/MeOH = 98/2 → 97/3 (v/v)) добијен је производ (9 mg, 45%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 8,10 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,28 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 5,27 (s, 2H), 5,13 (dd, *J* = 13,3, 5,1 Hz, 1H), 4,57 (dd, *J* = 12,1, 5,3 Hz, 2H), 4,29 – 4,19 (m, 2H), 3,32 (q, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,22 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,95 – 2,72 (m, 3H), 2,44 (qd, *J* = 8,0, 4,0 Hz, 1H), 2,24 (quint, *J* = 8,0 Hz, 2H), 1,15 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 173,30, 172,02, 170,98, 170,89, 162,38, 161,91, 161,21, 152,80, 143,22, 142,65, 135,31, 132,81, 131,64, 130,85, 129,26, 126,91, 125,11, 124,69, 124,03, 121,83, 121,70, 116,16, 112,36, 111,00, 62,54, 52,16, 45,88, 39,85, 34,46, 30,98, 29,34, 29,04, 22,87, 13,41.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₄H₃₃Cl₂N₁₀O₅S⁺ као [M + H]⁺: 763,1728, добијено: 763,1732.

Синтеза једињења (32)



Шема 9. Реакциони услови: **I)** NaOH, EtOH, H₂O, 80°C, 1 сат, 76%; **II)** а) SOCl₂, 75°C, 3 сата; б) EtNH₂, ДХМ, 0°C - СТ, 16 сати, 44%; **III)** ТФСК, PhOMe, 70°C, 16 сати, 84%; **IV)** Et₃N, ДХМ, 0°C - СТ, 10 мин., 93%; **V)** K₂CO₃, АЦН, 80°C, 16 сати, 71%; **VI)** NaN₃, ДМФ, 60°C, 16 сати, 95%; **VII)** CuSO₄ × 5H₂O, натријум-аскорбат, *t*-BuOH, ДХМ, H₂O, СТ, 30 мин., 61%

(8-3): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорфенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилна киселина [377]

Једињење **(8-3)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилата (257 mg, 0,5418 mmol), EtOH (5,7 mL), H₂O (0,57 mL) и NaOH (43 mg, 1,0836 mmol). Испирањем талога уз H₂O, EtOH и Et₂O и сушењем добијен је производ (183 mg, 76%) у виду жуте, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(26-2): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорфенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида

Једињење **(26-2)** синтетисано је према општем поступку за синтезу етил-амида из деривата 2-аминотиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем једињења **(8-3)** (102 mg, 0,2285 mmol), SOCl₂ (4 mL), ДХМ-а (6 mL) и EtNH₂ (180 μL, 2,2854 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 8/2 → 4/6 (v/v)) добијен је производ (47 mg, 44%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [377].

(27-2): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамида

Једињење **(27-2)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем једињења **(26-2)** (47 mg, 0,0993 mmol), ТФСК (3 mL) и PhOMe (20 μL, 0,1986 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полусасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ:

ДХМ/МеОН = 98/2 (v/v)) добијен је производ (32 mg, 84%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [377].

(30): Пент-4-ин-1-ил метансулфонат

Једињење **(30)** синтетисано је према општем поступку за синтезу мезилата из одговарајућих алкохола коришћењем пент-4-ин-1-ола (364 mg, 4,3272 mmol), Et_3N (905 μL , 6,4907 mmol), ДХМ-а (8 mL) и MsCl (405 μL , 5,1926 mmol). Реакциона смеша је разблажена ДХМ-ом (200 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO_3 (5×20 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/ Et_2O = 1/1 (v/v)) добијен је производ (655 mg, 93%) у виду бледожуте течности. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [381].

(31): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(пент-4-ин-1-илокси)фенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(31)** синтетисано је према општем поступку за алкиловање фенола мезилатима коришћењем једињења **(27-2)** (32 mg, 0,0835 mmol), АЦН-а (6 mL), K_2CO_3 (23 mg, 0,1670 mmol) и једињења **(30)** (20 mg, 0,1252 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/ AcOEt = 5/1 \rightarrow 1/1 (v/v)) добијен је производ (27 mg, 71%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CD_3CN): δ = 7,69 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,19 (s, 1H), 4,17 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,33 (quint, J = 8,0 Hz, 2H), 2,43 (td, J = 7,0, 2,6 Hz, 2H), 2,21 (t, J = 2,6 Hz, 1H), 2,02 (quint, J = 8,0 Hz, 2H), 1,16 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CD_3CN): δ = 172,28, 162,51, 161,74, 158,01, 154,00, 136,38, 134,31, 131,34, 124,64, 123,58, 122,91, 121,54, 115,72, 83,72, 69,96, 68,54, 35,04, 28,33, 15,03, 14,48.

(12-3): 3-(4-((3-Азидопропил)амино)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион [384]

У раствор 3-(4-((3-бромпропил)амино)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (22 mg, 0,0579 mmol, 1 equiv) у ДМФ-у (2 mL) додат је NaN_3 (11 mg, 0,1736 mmol, 3 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 60°C током 16 сати. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 99/1 (v/v)), чиме је добијено једињење **(12-3)** (19 mg, 95%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [385].

(32): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(3-(1-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)пропокси)фенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

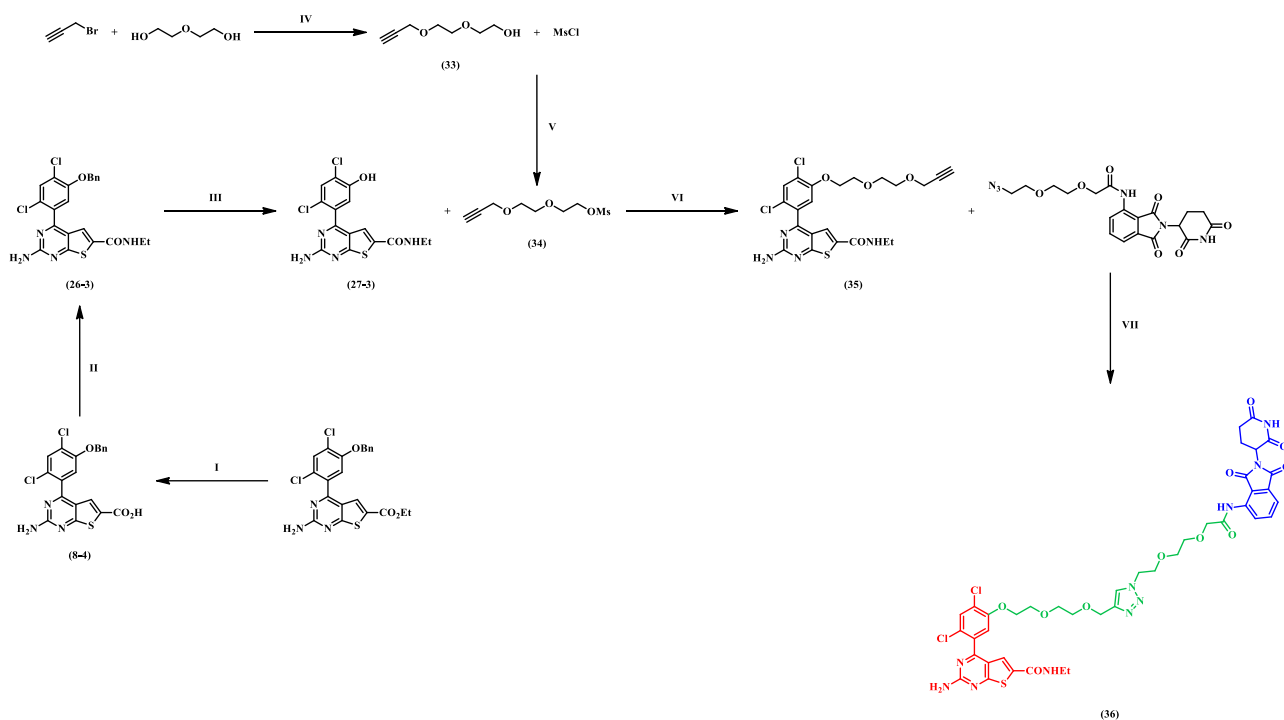
Једињење **(32)** синтетисано је према општем поступку за „клик“ реакцију коришћењем једињења **(31)** (10 mg, 0,0223 mmol), једињења **(12-3)** (7 mg, 0,0204 mmol), натријум-аскорбата (13 mg, 0,0668 mmol), *t*-BuOH (0,70 mL), ДХМ-а (0,35 mL), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (11 mg, 0,0445 mmol) и H_2O (0,35 mL). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана 12,5% (w/w) раствором NH_4OH у H_2O (5×10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 100/0 \rightarrow 94/6 (v/v)) добијен је производ (11 mg, 61%) у виду беле, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CD_3OD): δ = 7,75 (s, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,26 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,15 (s, 1H), 7,04 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,70 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,13 (dd, J = 13,0, 5,0 Hz, 1H), 4,48 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 4,29 – 4,18 (m, 2H), 4,08 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 3,36 – 3,32 (m, 2H), 3,21 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,90 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 2,82 – 2,73 (m, 1H), 2,44 (dd, J = 24,2, 11,0 Hz, 1H), 2,17 (dt, J = 20,7, 6,5 Hz, 5H), 1,15 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CD_3OD): $\delta = 173,31, 171,91, 170,97, 170,88, 162,36, 162,09, 161,23, 153,52, 146,86, 143,22, 135,41, 132,79, 131,65, 130,59, 129,22, 126,85, 124,52, 123,07, 122,36, 121,86, 121,74, 114,74, 112,21, 110,90, 68,25, 52,16, 47,02, 45,88, 39,87, 34,44, 30,99, 29,02, 28,29, 22,88, 21,32, 13,39$.

HRMS (ESI): m/z израчунато за $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_5\text{S}^+$ као $[\text{M} + \text{H}]^+$: 791,2041, добијено: 791,2051.

Синтеза једињења (36) [369]



Шема 10. Реакциони услови: **I)** NaOH, EtOH, H_2O , 80°C , 1 сат, 62%; **II)** а) SOCl_2 , 75°C , 3 сата; б) EtNH_2 , ДХМ, 0°C - СТ, 16 сати, 52%; **III)** ТФСК, PhOMe, 70°C , 16 сати, 85%; **IV)** t -BuOK, ТХФ, 0°C -СТ, 16 сати, 67%; **V)** Et_3N , ДХМ, 0°C - СТ, 10 мин., 96%; **VI)** K_2CO_3 , АЦН, 80°C , 16 сати, 80%; **VII)** $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, нагријум-аскорбат, t -BuOH, ДХМ, H_2O , СТ, 30 мин., 47%

(8-4): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3- d]пиримидин-6-карбоксилна киселина

Једињење **(8-4)** синтетисано је према општем поступку за хидролизу етил-естара деривата 2-аминотиено[2,3- d]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем етил-2-амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)тиено[2,3- d]пиримидин-6-карбоксилата (200 mg, 0,4216 mmol), EtOH (4,4 mL), H_2O (0,44 mL) и NaOH (34 mg, 0,8432 mmol). Испирањем талога уз H_2O , EtOH и Et_2O и сушењем добијен је производ (117 mg, 62%) у виду жуте, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(26-3): 2-Амино-4-(5-(бензилокси)-2,4-дихлорофенил)- N -етилтиено[2,3- d]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(26-3)** синтетисано је према општем поступку за синтезу етил-амида из деривата 2-аминотиено[2,3- d]пиримидин-6-карбоксилне киселине коришћењем једињења **(8-4)** (88 mg, 0,1972 mmol), SOCl_2 (8 mL), ДХМ-а (4 mL) и EtNH_2 (160 μL , 1,9717 mmol). Флеш

хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 8/2 → 4/6 (v/v)) добијен је производ (48 mg, 52%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце. ¹Н и ¹³С НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [377].

(27-3): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-хидроксифенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(27-3)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију фенола коришћењем једињења **(26-3)** (48 mg, 0,1014 mmol), ТФСК (6 mL) и PhOMe (20 μL, 0,2028 mmol). Реакциона смеша је концентрисана, разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (3 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 98/2 (v/v)) добијен је производ (33 mg, 85%) у виду бледосмеђе, чврсте супстанце. ¹Н и ¹³С НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [377].

(33): 2-(2-(Проп-2-ин-1-илокси)етокси)етанол [373]

Суспензији *t*-BuOK (534 mg, 4,7588 mmol, 1,01 equiv) у сувом ТХФ-у (13 mL) на 0°C, у атмосфери азота, додат је раствор диетилен-гликола (1000 mg, 9,4233 mmol, 2,00 equiv) у сувом ТХФ-у (2 mL). Смеша је мешана на 0°C током 15 мин., након чега је укапавањем додат пропаргил-броид (80% (w/w) у ксилену, 520 μL, 4,7116 mmol, 1,00 equiv). Реакциона смеша је затим остављена да се загреје до собне температуре и мешана је током 16 сати. Потом је реакција заустављена додавањем засићеног воденог раствора NH₄Cl (10 mL). Смеша је разблажена Et₂O (50 mL) и испрана H₂O (5 × 10 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованога Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/Et₂O = 1/1 → 1/9 (v/v)), чиме је добијено једињење **(33)** (458 mg, 67%) у виду бледожутог уља. ¹Н и ¹³С НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [373].

(34): 2-(2-(Проп-2-ин-1-илокси)етокси)етил-метансулфонат

Једињење **(34)** синтетисано је према општем поступку за синтезу мезилата из одговарајућих алкохола коришћењем једињења **(33)** (458 mg, 3,1768 mmol), Et₃N (665 μL, 4,7652 mmol), ДХМ-а (8 mL) и MsCl (295 μL, 3,8122 mmol). Реакциона смеша је разблажена ДХМ-ом (200 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (5 × 20 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et₂O/петрол-етар/ДХМ = 6/4/1 (v/v)) добијен је производ (678 mg, 96%) у виду бледожуте течности. ¹Н и ¹³С НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [389].

(35): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)етокси)етокси)фенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(35)** синтетисано је према општем поступку за алкиловање фенола мезилатима коришћењем једињења **(27-3)** (19 mg, 0,0496 mmol), АЦН-а (3 mL), K₂CO₃ (14 mg, 0,0992 mmol) и једињења **(34)** (17 mg, 0,0744 mmol). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 100/0 → 98/2 (v/v)) добијен је производ (20 mg, 80%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹Н НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 7,93 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 4,47 (s, 2H), 4,21 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 3,78 – 3,73 (m, 2H), 3,68 – 3,63 (m, 2H), 3,60 – 3,54 (m, 2H), 2,40 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H), 3,48 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,16 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

¹³С НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 164,55, 162,41, 162,18, 156,55, 152,91, 132,55, 131,67, 131,61, 127,81, 126,84, 119,23, 115,33, 113,57, 79,88, 74,81, 70,15, 69,94, 69,79, 68,29, 58,51, 36,67, 14,27.

(36): 2-Амино-4-(2,4-дихлоро-5-(2-(2-((1-(2-(2-(2-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)-2-оксоетокси)етокси)етил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)етокси)етокси)фенил)-*N*-етилтиено[2,3-*d*]пиримидин-6-карбоксамид

Једињење **(36)** синтетисано је према општем поступку за „клик“ реакцију коришћењем једињења **(35)** (8 mg, 0,0157 mmol), 2-(2-(2-азидоетокси)етокси)-*N*-(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)ацетамида (7 mg, 0,0157 mmol), натријум-аскорбата (9 mg, 0,0471 mmol), *t*-BuOH (0,50 mL), ДХМ-а (0,25 mL), CuSO₄ × 5H₂O (8 mg, 0,0314 mmol) и H₂O (0,25 mL). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана 12,5% (w/w) раствором NH₄OH у H₂O (5 × 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/MeOH = 100/0 → 98/2 (v/v)) добијен је производ (7 mg, 47%) у виду беле, чврсте супстанце.

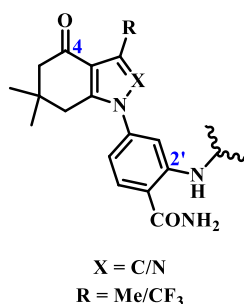
¹H НМР спектар (400 MHz, CD₃OD): δ = 8,74 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,75 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,55 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,26 (s, 1H), 5,06 (dd, *J* = 12,8, 5,4 Hz, 1H), 4,54 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,47 (s, 2H), 4,21 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,11 (s, 2H), 3,92 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,81 (t, *J* = 4,0 Hz, 2H), 3,78 – 3,69 (m, 4H), 3,68 – 3,63 (m, 2H), 3,60 – 3,55 (m, 2H), 3,48 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,91 – 2,58 (m, 3H), 2,18 – 2,09 (m, 1H), 1,16 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CD₃OD): δ = 173,09, 171,87, 169,91, 169,84, 168,51, 166,82, 162,30, 162,10, 161,23, 153,61, 136,14, 135,93, 135,39, 132,74, 131,62, 130,60, 124,57, 124,41, 123,28, 121,84, 121,71, 118,16, 116,33, 115,37, 71,05, 70,50, 70,29, 69,99, 69,39, 69,31, 69,14, 69,11, 65,50, 63,67, 50,06, 49,20, 34,43, 30,75, 22,24, 14,03, 13,38.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₄₁H₄₃Cl₂N₁₀O₁₁S⁺ као [M + H]⁺: 953,2205, добијено: 953,2210.

3.4. Дизајн и синтеза PROTAC молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола

Путем скрининга, молекулског моделовања и оптимизације вођене структуром (енг. *structure-guided optimization*) Huang и сар. су пронашли 2'-аминобензамиде изведене из 4,5,6,7-тетрахидроиндол-4-она и 4,5,6,7-тетрахидроиндазол-4-она као хемијски нову класу малих молекула инхибитора HSP90 (Слика 49) [390].

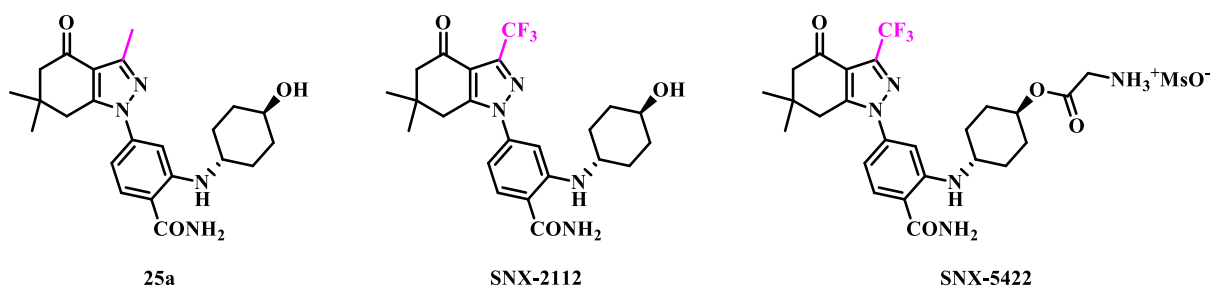


Слика 49. Инхибитори HSP90 засновани на бензамиду

Компјутерски модели везивања иницијалног молекула из скрининга приказали су бензамидни остатак као изостер аденина и предвидели директне и водом посредоване интеракције водоничним везама са Asp93 и Thr184 у оквиру *N*-терминалног цепа за везивање АТП-а у HSP90. Кондензовани бициклични мотив је моделован тако да карбонил тетрахидроиндолона остварује водонично везивање са Tyr139, док је гем-диметил група заузимала хидрофобни регион који садржи Leu107, Phe138 и Trp162. Резултати рендгенске кристалографије добијени

3.4.3. Развој скелета 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола

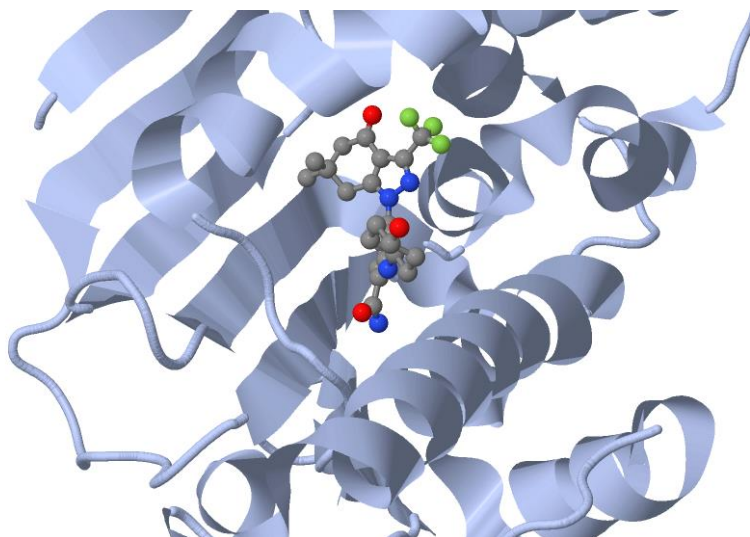
Даља еволуција скелета обухватила је замену једне -CH= јединице унутар језгра тетрахидроиндолона атомом азота, чиме је генерисан тетрахидроиндазолонски систем. Ова модификација је смањила електронску густину и повећала поларност. У оквиру ове серије, описано је да је 3-метил аналог **25a** мање потентан од једињења **34**, док је 3-трифлуорометил аналог SNX-2112 испољио потентност упоредиву са једињењем **34**. SNX-2112 је потентан инхибитор HSP90 са антипролиферативном активношћу, а његов пролек SNX-5422 је орално биорасположив, ефикасан у више модела ксенографта тумора и напредовао је до I фазе клиничких испитивања (Слика 51) [391–394].



Слика 51. Хемијске структуре инхибитора HSP90 заснованих на скелету тетрахидроиндазолна

3.4.4. Основа за избор 2'-позиције као места припајања линкера

Показано је да постојана водонична веза између карбонилне групе тетрахидроиндолона или тетрахидроиндазолна и Tyr139 представља кључну интеракцију за ову класу инхибитора. Рендгенска кристалографија комплекса SNX-2112 са *N*-терминалним доменом HSP90α директно визуализује начин везивања бензамидног скелета тетрахидроиндазолна. У овом кристалографском комплексу, бензамидни прстен је оријентисан тако да се супституција на 2' позицији пројектује ка региону који је доступан растварачу [395]. Овакав структурни распоред указује да 2' позиција бензамида није укључена у директне протеин-лиганд контакте унутар *N*-терминалног цепа HSP90α и да је изложена растварачу када је лиганд везан. Сходно томе, ова позиција представља одговарајуће место за увођење линкера приликом дизајна PROTAC молекула, уз очување кључних интеракција које остварује лиганд за HSP90 изведен из 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола (Слика 52).



Слика 52. Кристална структура *N*-терминалног домена HSP90 α у комплексу са SNX-2112 која илуструје његову оријентацију унутар џепа за везивање АТП-а (PDB код: 4NH7 [395])

3.4.5. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула базираних на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола

PROTAC молекули засновани на 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазолу синтетисани су применом модулларне, конвергентне стратегије, у оквиру које је за тетрахидроиндазолни фрагмент најпре везан линкер, а фрагмент који регрутује CRBN уведен је у касној фази синтезе. Уопштено, тетрахидроиндазолни фрагмент је садржао арил-флуорид, који је затим коришћен као кључна функционална група за реакцију нуклеофилне ароматичне супституције са линкерима који садрже аminer и који су током увођења били заштићени на одговарајућим местима. Након увођења линкера, заштитне групе су уклоњене, чиме је ослобођен амин погодан за накнадну реакцију купловања. У појединим синтетичким секвенцама, нитрилна група присутна на ароматичном делу тетрахидроиндазолног фрагмента претворена је у бензамид, чиме су добијене блиско сродне варијанте овог фрагмента без промене укупног плана синтезе. Коначна синтеза PROTAC молекула постигнута је повезивањем тетрахидроиндазолног интермедијера који садржи линкер са лигандом за CRBN, било путем нуклеофилне ароматичне супституције на активираним ароматичном систему лиганда за CRBN, било путем амидног купловања са киселином садржаном у лиганду за CRBN. Овај приступ је омогућио варирање дужине и састава линкера уз задржавање истог тетрахидроиндазолног скелета.

Општи поступак за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида [371]

У ДМСО-у помешани су арил-флуорид (1 equiv), амин (2 equiv) и ДИПЕА (3 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 90°C током 16 сати. Потом је разблажена Et₂O или AcOEt и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући арил-амини.

Општи поступак А за оксидацију деривата бензонитрила [396]

У H₂SO₄ (95% (w/w)) растворен је бензонитрил на 0°C, а затим је реакциона смеша мешана на 70°C током 2 сата. Реакциона смеша је разблажена H₂O на 0°C, неутралисана Na₂CO₃ и екстрахована AcOEt. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском, чиме су добијени одговарајући бензамиди.

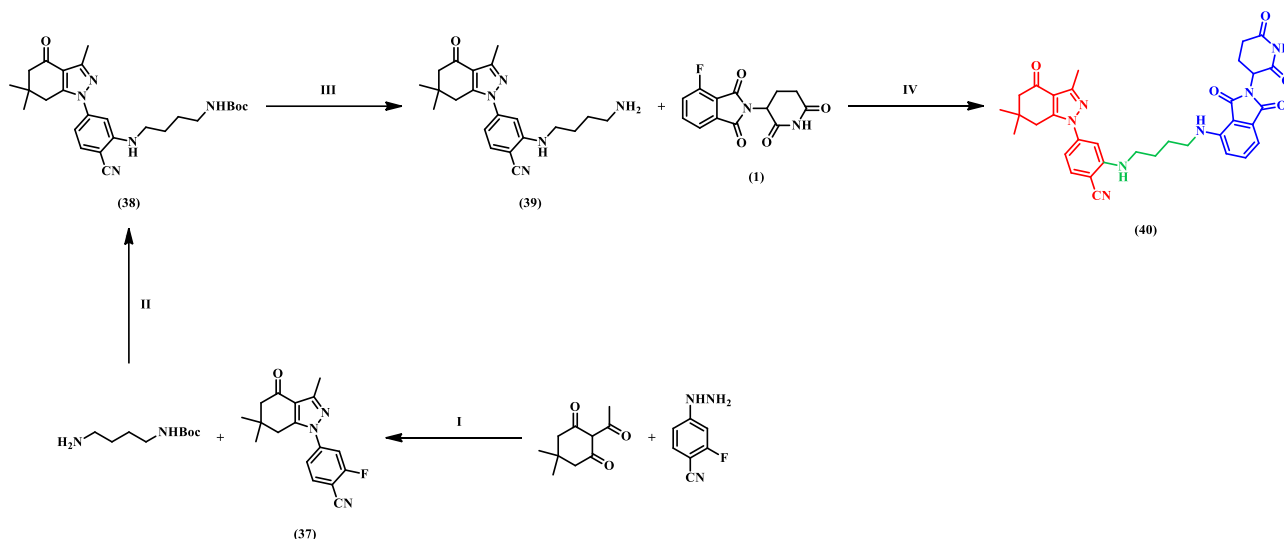
Општи поступак Б за оксидацију деривата бензонитрила [397]

У 1,4-диоксану помешани су бензонитрил (1,0 equiv), NaOH (1 M, 0,4 equiv) и H₂O₂ (30% (w/w) у H₂O, 80,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена H₂O и AcOEt, водена фаза је одбачена, а органска фаза је испрана полузасићеним воденим раствором NaHCO₃. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском, чиме су добијени одговарајући бензамиди.

Општи поступак за депротекцију амина заштићених Вос групом [398]

Раствору амина заштићеног Вос групом (1 equiv) у ДХМ-у додата је H₃PO₄ (85% (w/w), 5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 1 сата. Потом је неутралисана засићеним воденим раствором K₂CO₃ и екстрахована AcOEt. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском, чиме су добијени одговарајући амини.

Синтеза једињења (40) [369]



Шема 11. Реакциони услови: **I)** AcOH, MeOH, СТ, 3 дана, 84%; **II)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 80%; **III)** H₃PO₄, ДХМ, СТ, 1 сат, 79%; **IV)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 31%

(37): 2-Флуоро-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазол-1-ил)бензонитрил [371]

У раствор 2-флуоро-4-хидразинилбензонитрила (600 mg, 3,9698 mmol, 1 equiv) и 2-ацетил-5,5-диметилциклохексан-1,3-диона (723 mg, 3,9698 mmol, 1 equiv) у MeOH (2,2 mL) додата је AcOH (55 µL), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 3 дана. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/AcOEt = 9/1 → 8/2 (v/v)), чиме је добијено једињење **(37)** (991 mg, 84%) у виду наранџасте, чврсте супстанце. ¹H НМР спектар био је у сагласности са литературним подацима [371].

(38): *tert*-Бутил (4-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазол-1-ил)фенил)амино)бутил)карбамат

Једињење **(38)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (2 mL), једињења **(37)** (98 mg, 0,3296 mmol), *tert*-бутил (4-аминобутил)карбамата (124 mg, 0,6592 mmol) и ДИПЕА (170 μ L, 0,9888 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (200 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 20 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et₂O/петролетар = 5/5 \rightarrow 6/4 (v/v)) добијен је производ (123 mg, 80%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,71 (dd, *J* = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 3,29 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,19 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,77 – 1,68 (m, 2H), 1,67 – 1,58 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,12 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 157,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 80,65, 51,39, 44,52, 41,51, 33,50, 33,12, 28,82, 28,41, 27,31, 27,23, 14,47.

(39): 2-((4-Аминобутил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење **(39)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења **(38)** (80 mg, 0,1718 mmol), ДХМ-а (4 mL) и H₃PO₄ (60 μ L, 0,8591 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K₂CO₃ (10 mL) и екстракцијом AcOEt (3 \times 30 mL) добијен је производ (50 mg, 79%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,47 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,69 (dd, *J* = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 3,27 (q, *J* = 6,3 Hz, 2H), 2,86 – 2,75 (m, 4H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,83 – 1,72 (m, 2H), 1,66 – 1,55 (m, 2H), 1,11 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 51,39, 44,52, 41,23, 33,50, 33,12, 30,14, 28,82, 27,00, 14,47.

(40): 2-((4-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)бутил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

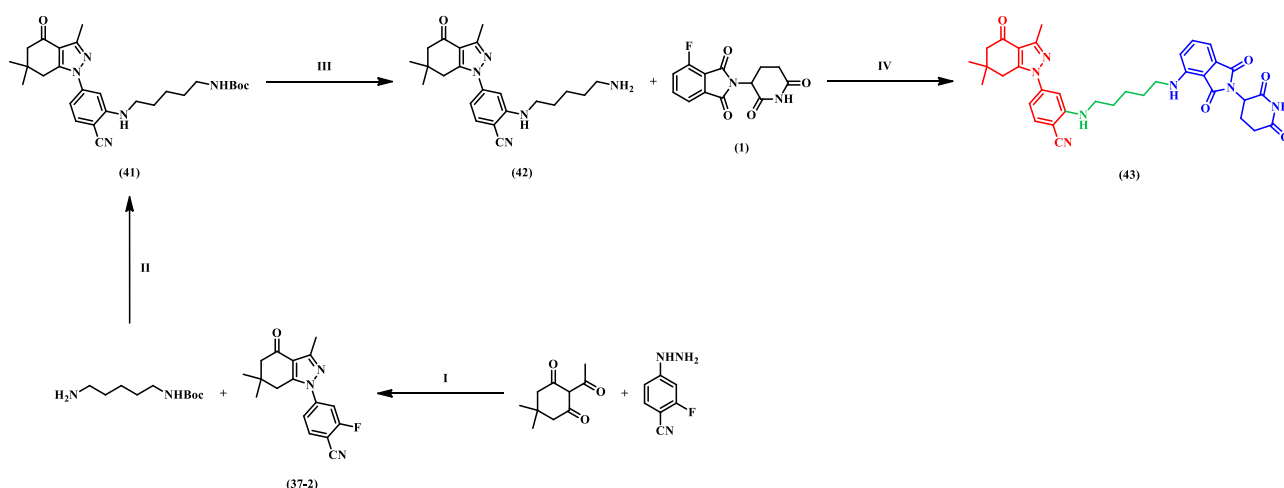
Једињење **(40)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (2 mL), једињења **(39)** (30 mg, 0,0820 mmol), једињења **(1)** (11 mg, 0,0410 mmol) и ДИПЕА (20 μ L, 0,1231 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МР: ДХМ/Me₂CO = 9,5/0,5 \rightarrow 9,0/1,0 (v/v)) добијен је производ (8 mg, 31%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,55 – 7,45 (m, 2H), 7,12 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 6,92 – 6,86 (m, 2H), 6,72 (dd, *J* = 8,3, 1,8 Hz, 1H), 4,91 (dd, *J* = 12,3, 5,3 Hz, 1H), 3,35 (dd, *J* = 11,9, 5,7 Hz, 4H), 2,93 – 2,72 (m, 5H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 2,17 – 2,10 (m, 1H), 1,87 – 1,80 (m, 4H), 1,11 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,28, 170,81, 169,53, 168,19, 167,50, 151,04, 150,52, 149,14, 146,76, 143,62, 136,27, 133,76, 132,57, 117,70, 117,12, 116,53, 111,82, 110,80, 110,32, 105,47, 94,95, 52,32, 48,94, 43,11, 42,26, 37,77, 35,92, 31,42, 28,43, 26,75, 26,54, 22,82, 13,42.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₄H₃₆N₇O₅⁺ као [M + H]⁺: 622,2772, добијено: 622,2799.

Синтеза једињења (43) [369]



Шема 12. Реакциони услови: **I)** АсОН, МеОН, СТ, 3 дана, 81%; **II)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 83%; **III)** Н₃РО₄, ДХМ, СТ, 1 сат, 67%; **IV)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 39%

(37-2): 2-Флуоро-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил [371]

У раствор 2-флуоро-4-хидразинилбензонитрила (200 mg, 1,3233 mmol, 1 equiv) и 2-ацетил-5,5-диметилциклохексан-1,3-диона (241 mg, 1,3233 mmol, 1 equiv) у МеОН (740 μ L) додата је АсОН (20 μ L), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 3 дана. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 9/1 \rightarrow 8/2 (v/v)), чиме је добијено једињење **(37-2)** (320 mg, 81%) у виду наранџасте, чврсте супстанце. ¹Н НМР спектар био је у сагласности са литературним подацима [371].

(41): *tert*-Бутил (5-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)пентил)карбамат

Једињење **(41)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (2 mL), једињења **(37-2)** (30 mg, 0,1009 mmol), *tert*-бутил (5-аминопентил)карбамата (41 mg, 0,2018 mmol) и ДИПЕА (50 μ L, 0,3027 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et₂O/петрол-етар = 5/5 \rightarrow 6/4 (v/v)) добијен је производ (40 mg, 83%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹Н НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,71 (dd, J = 8,3, 1,6 Hz, 1H), 3,26 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 3,14 (q, J = 6,1 Hz, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,73 (quint, J = 7,3 Hz, 2H), 1,56 (quint, J = 7,0 Hz, 2H), 1,50 – 1,41 (m, 11H), 1,12 (s, 6H).

¹³С НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 157,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 80,65, 51,39, 44,52, 41,51, 33,50, 33,12, 29,49, 29,42, 28,82, 28,41, 24,80, 14,47.

(42): 2-((5-Аминопентил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење **(42)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења **(41)** (50 mg, 0,1043 mmol), ДХМ-а (3 mL) и Н₃РО₄ (35 μ L, 0,5213

mmol). Неутрализацијом реакционе смеше zasiћеним воденим раствором K_2CO_3 (5 mL) и екстракцијом $AcOEt$ (3×20 mL) добијен је производ (27 mg, 67%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

1H НМР спектар (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,47$ (dd, $J = 8,3, 1,3$ Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,71 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H), 3,27 (q, $J = 5,9$ Hz, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,80 – 1,66 (m, 4H), 1,56 – 1,44 (m, 4H), 1,11 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 194,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 51,39, 44,52, 41,23, 33,50, 33,12, 32,42, 29,42, 28,82, 24,89, 14,47$.

(43): 2-((5-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)пентил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазол-1-ил)бензонитрил

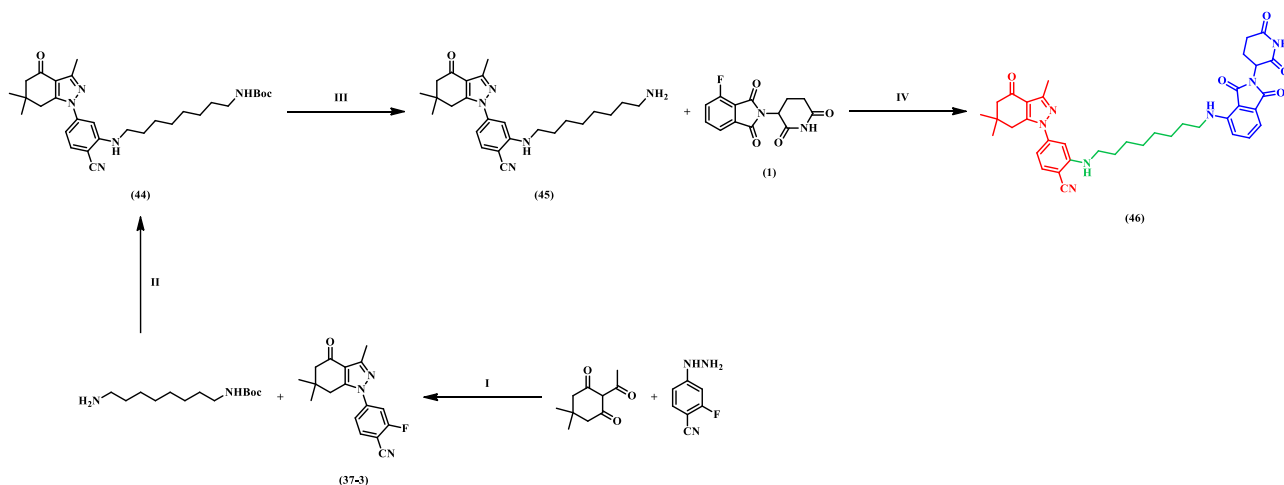
Једињење (43) синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (2 mL), једињења (42) (27 mg, 0,0711 mmol), једињења (1) (10 mg, 0,0356 mmol) и ДИПЕА (20 μ L, 0,1067 mmol). Реакциона смеша је разблажена $AcOEt$ (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором $NaCl$ (5×5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/ $Me_2CO = 9,5/0,5 \rightarrow 9,0/1,0$ (v/v)) добијен је производ (9 mg, 39%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

1H НМР спектар (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,53 - 7,44$ (m, 2H), 7,10 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,91 – 6,84 (m, 2H), 6,71 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H), 4,92 (dd, $J = 12,0, 5,3$ Hz, 1H), 3,30 (sext, $J = 6,0$ Hz, 4H), 2,92 – 2,67 (m, 5H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 2,19 – 2,09 (m, 1H), 1,76 (sext, $J = 7,5$ Hz, 4H), 1,61 – 1,52 (m, 2H), 1,11 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 193,29, 170,95, 169,57, 168,32, 167,56, 151,16, 150,48, 149,15, 146,90, 143,62, 136,20, 133,74, 132,57, 117,67, 117,19, 116,57, 111,62, 110,73, 110,15, 105,50, 94,84, 52,33, 48,95, 43,29, 42,47, 37,76, 35,91, 31,43, 28,99, 28,81, 28,42, 24,42, 22,83, 13,40$.

HRMS (ESI): m/z израчунато за $C_{35}H_{38}N_7O_5^+$ као $[M + H]^+$: 636,2929, добијено: 636,2918.

Синтеза једињења (46)



Шема 13. Реакциони услови: **I)** $AcOH$, $MeOH$, СТ, 3 дана, 84%; **II)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 99%; **III)** H_3PO_4 , ДХМ, СТ, 1 сат, 80%; **IV)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 40%

(37-3): 2-Флуоро-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил [371]

У раствор 2-флуоро-4-хидразинилбензонитрила (166 mg, 1,0976 mmol, 1 equiv) и 2-ацетил-5,5-диметилциклохексан-1,3-диона (200 mg, 1,0976 mmol, 1 equiv) у МеОН (600 μ L) додата је АсОН (15 μ L), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 3 дана. Потом је концентрисана под сниженим притиском, а остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 9/1 \rightarrow 8/2 (v/v)), чиме је добијено једињење **(37-3)** (275 mg, 84%) у виду наранџасте, чврсте супстанце. ^1H НМР спектар био је у сагласности са литературним подацима [371].

(44): *tert*-Бутил (8-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)октил)карбамат

Једињење **(44)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1 mL), једињења **(37-3)** (40 mg, 0,1345 mmol), *tert*-бутил (8-аминооктил)карбамата (66 mg, 0,2691 mmol) и ДИПЕА (70 μ L, 0,4036 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (100 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 9/1 \rightarrow 7/3 (v/v)) добијен је производ (69 mg, 99%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,72 (dd, J = 8,3, 1,5 Hz, 1H), 3,25 (q, J = 6,3 Hz, 2H), 3,10 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,70 (quint, J = 7,0 Hz, 2H), 1,48 – 1,41 (m, 13H), 1,37 – 1,30 (m, 6H), 1,12 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,28, 156,01, 151,26, 150,43, 149,12, 143,58, 133,71, 117,63, 117,22, 110,64, 105,42, 94,72, 79,06, 52,35, 43,45, 37,75, 35,90, 30,07, 29,23, 29,16, 29,01, 28,45, 28,42, 26,90, 26,70, 13,40.

(45): 2-((8-Аминооктил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење **(45)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења **(44)** (68 mg, 0,1303 mmol), ДХМ-а (2 mL) и H₃PO₄ (45 μ L, 0,6517 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K₂CO₃ (10 mL) и екстракцијом АсОЕт (3 \times 30 mL) добијен је производ (44 mg, 80%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,72 (dd, J = 8,3, 1,5 Hz, 1H), 3,25 (q, J = 6,3 Hz, 2H), 3,10 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,70 (quint, J = 7,0 Hz, 2H), 1,47 – 1,32 (m, 10H), 1,12 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 51,39, 44,52, 41,23, 33,50, 33,12, 32,42, 29,42, 28,96, 28,82, 27,59, 27,41, 14,47.

(46): 2-((8-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)октил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

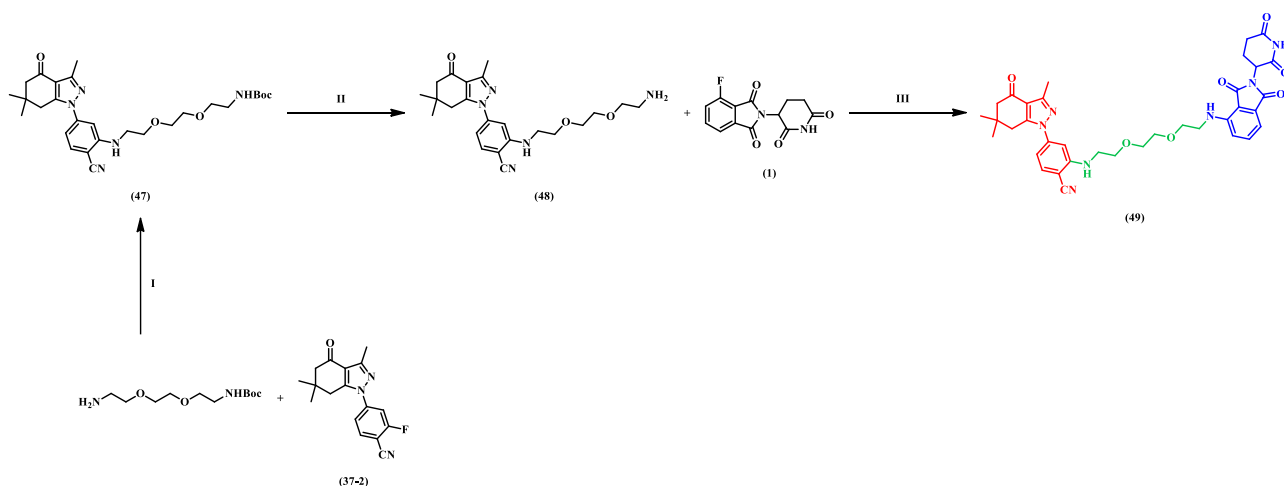
Једињење **(46)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1 mL), једињења **(45)** (44 mg, 0,1044 mmol), једињења **(1)** (14 mg, 0,0522 mmol) и ДИПЕА (30 μ L, 0,1566 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 10/0 \rightarrow 10/0,1 (v/v)) добијен је производ (14 mg, 40%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,55 – 7,43 (m, 2H), 7,08 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 6,93 – 6,80 (m, 2H), 6,70 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,91 (dd, J = 11,2, 4,8 Hz, 1H), 3,32 – 3,19 (m, 4H), 2,92 – 2,70 (m, 5H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 2,17 – 2,09 (m, 1H), 1,76 – 1,61 (m, 6H), 1,49 – 1,33 (m, 6H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,27, 170,97, 169,55, 168,36, 167,62, 151,28, 150,44, 149,14, 147,05, 143,60, 136,12, 133,71, 132,57, 117,64, 117,24, 116,64, 111,40, 110,64, 109,98, 105,48, 94,74, 52,35, 48,93, 43,46, 42,63, 37,76, 35,89, 31,44, 29,15, 28,98, 28,42, 26,86, 26,82, 22,84, 13,38.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₃₈H₄₄N₇O₅⁺ као [M + H]⁺: 678,3398, добијено: 678,3395.

Синтеза једињења (49) [369]



Шема 14. Реакциони услови: **I)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 87%; **II)** Н₃РО₄, ДХМ, СТ, 1 сат, 94%; **III)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 65%

(47): *tert*-Бутил (2-(2-(2-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)етокси)етокси)етил)карбамат

Једињење **(47)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (5 mL), једињења **(37-2)** (96 mg, 0,3229 mmol), *tert*-бутил (2-(2-(2-аминоетокси)етокси)етил)карбамата (160 mg, 0,6457 mmol) и ДИПЕА (165 μ L, 0,9686 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (200 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 20 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et₂O/циклохексан = 8/2 (v/v)) добијен је производ (148 mg, 87%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,49 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,73 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 3,77 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,70 – 3,62 (m, 4H), 3,56 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 3,46 (q, J = 5,1 Hz, 2H), 3,37 – 3,28 (m, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,53 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,28, 156,02, 151,22, 150,43, 149,15, 143,52, 133,81, 117,65, 117,06, 110,88, 105,73, 95,30, 79,16, 70,57, 70,43, 70,27, 68,93, 52,34, 43,08, 37,74, 35,90, 28,43, 13,38.

(48): 2-((2-(2-(2-Аминоетокси)етокси)етил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење (48) синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења (47) (65 mg, 0,1237 mmol), ДХМ-а (2 mL) и H₃PO₄ (40 μL, 0,6183 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K₂CO₃ (10 mL) и екстракцијом AcOEt (3 × 30 mL) добијен је производ (50 mg, 94%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,49 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,72 (dd, *J* = 8,3, 1,8 Hz, 1H), 3,78 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,71 – 3,64 (m, 4H), 3,54 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,45 (q, *J* = 4,9 Hz, 2H), 2,94 – 2,82 (m, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,11 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 73,57, 72,15, 69,94, 51,39, 42,22, 41,42, 33,50, 33,12, 28,82, 14,47.

(49): 2-((2-(2-(2-((2-(2-(2-(2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)етокси)етокси)етил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

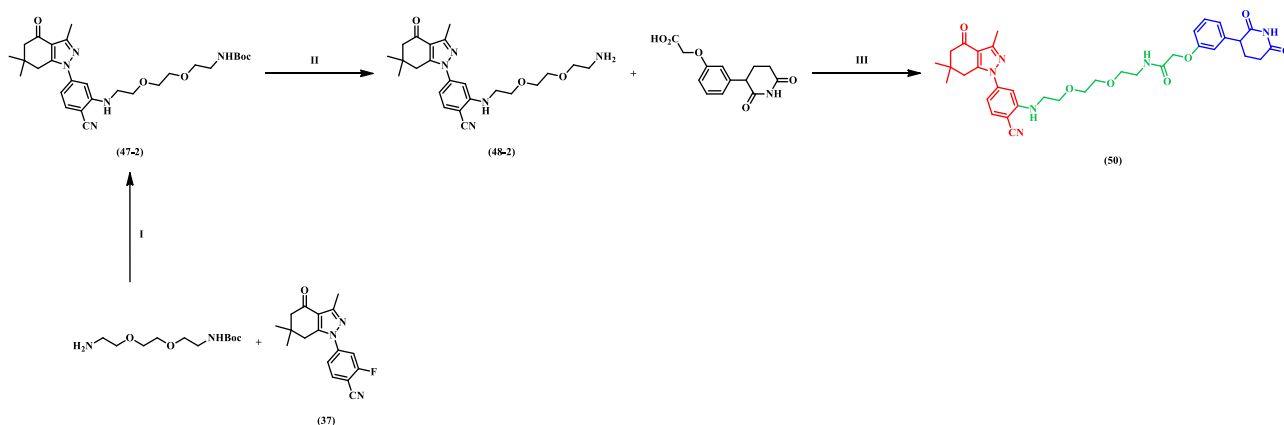
Једињење (49) синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1 mL), једињења (48) (29 mg, 0,0682 mmol), једињења (1) (9 mg, 0,0341 mmol) и ДИПЕА (15 μL, 0,1022 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: CHCl₃/Me₂CO = 9/1 (v/v)) добијен је производ (15 mg, 65%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,50 – 7,43 (m, 2H), 7,08 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,94 – 6,89 (m, 2H), 6,69 (dd, *J* = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 4,89 (dd, *J* = 12,1, 5,3 Hz, 1H), 3,79 – 3,74 (m, 4H), 3,72 – 3,69 (m, 4H), 3,49 (q, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,42 (q, *J* = 5,1 Hz, 2H), 2,87 – 2,68 (m, 5H), 2,53 (s, 3H), 2,39 (s, 2H), 1,11 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,30, 171,05, 169,31, 168,42, 167,60, 151,33, 150,46, 149,21, 146,84, 143,45, 136,02, 133,77, 132,53, 117,61, 117,26, 116,84, 111,62, 110,71, 110,32, 105,78, 95,13, 70,93, 70,63, 69,53, 69,19, 52,34, 48,92, 43,09, 42,34, 37,68, 35,88, 31,46, 30,91, 22,78, 13,33.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₆H₄₀N₇O₇⁺ као [M + H]⁺: 682,2984, добијено: 682,3008.

Синтеза једињења (50) [369]



Шема 15. Реакциони услови: **I)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 82%; **II)** H₃PO₄, ДХМ, СТ, 1 сат, 96%; **III)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 20%

(47-2): *tert*-Бутил (2-(2-(2-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)етокси)етокси)етил)карбамат

Једињење **(47-2)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (5 mL), једињења **(37)** (96 mg, 0,3229 mmol), *tert*-бутил (2-(2-(2-аминоетокси)етокси)етил)карбамата (160 mg, 0,6457 mmol) и ДИПЕА (165 μ L, 0,9686 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (200 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 20 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et₂O/циклохексан = 8/2 (v/v)) добијен је производ (140 mg, 82%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су идентични онима који су претходно описани за једињење **(47)**.

(48-2): 2-((2-(2-(2-Аминоетокси)етокси)етил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење **(48-2)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења **(47-2)** (58 mg, 0,1103 mmol), ДХМ-а (2 mL) и H₃PO₄ (40 μ L, 0,5517 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K₂CO₃ (10 mL) и екстракцијом AcOEt (3 \times 30 mL) добијен је производ (45 mg, 96%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су идентични онима који су претходно описани за једињење **(48)**.

(50): *N*-(2-(2-(2-((2-Цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)етокси)етокси)етил)-2-(3-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)фенокси)ацетамид [158]

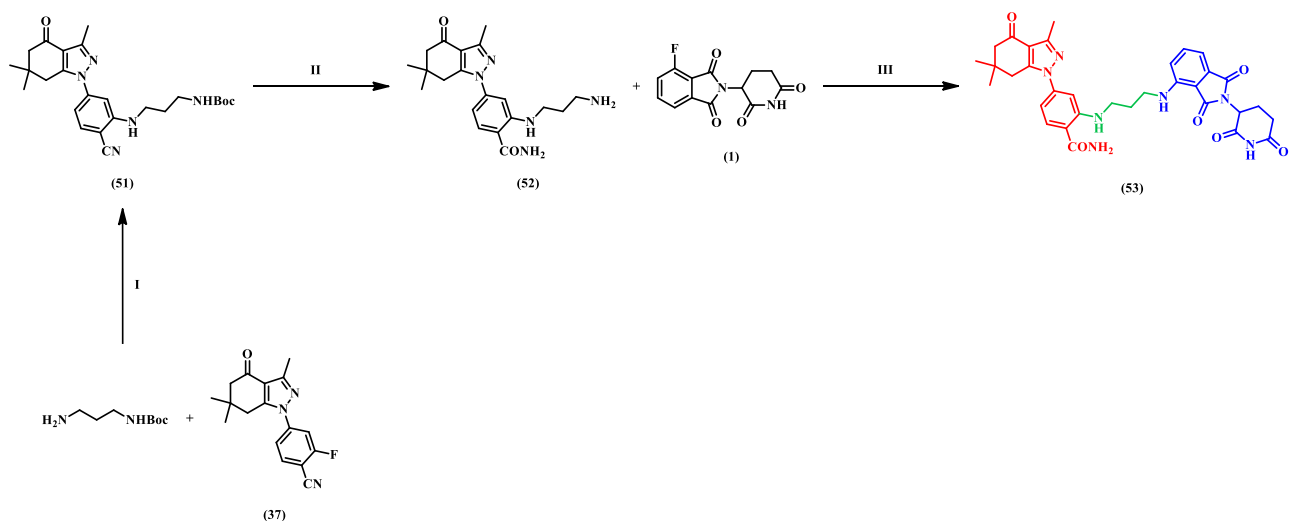
У раствор једињења **(48-2)** (16 mg, 0,0380 mmol, 1,0 equiv), 2-(3-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)фенокси)сирћетне киселине (10 mg, 0,0380 mmol, 1,0 equiv) и ХАТУ (16 mg, 0,0418 mmol, 1,1 equiv) у ДМФ-у (2 mL) додата је ДИПЕА (20 μ L, 0,1140 mmol, 3,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 10 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: AcOEt/петрол-етар = 6/4 (v/v)), чиме је добијено једињење **(50)** (5 mg, 20%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,47 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,30 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,90 – 6,79 (m, 4H), 6,71 (dd, *J* = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 4,49 (s, 2H), 3,77 – 3,72 (m, 3H), 3,65 – 3,55 (m, 8H), 3,42 (q, *J* = 5,1 Hz, 2H), 2,81 (s, 2H), 2,72 – 2,63 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 2,29 – 2,19 (m, 2H), 1,11 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,33, 172,75, 171,99, 168,09, 157,70, 151,24, 150,45, 149,19, 143,52, 139,00, 133,81, 130,24, 121,69, 117,64, 117,18, 115,40, 113,45, 110,81, 105,69, 95,11, 70,48, 70,29, 69,84, 68,83, 67,53, 52,32, 47,86, 42,96, 38,85, 37,70, 35,90, 30,90, 28,44, 28,38, 26,28, 13,39.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₆H₄₃N₆O₇⁺ као [M + H]⁺: 671,3188, добијено: 671,3217.

Синтеза једињења (53)



Шема 16. Реакциони услови: **I)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 82%; **II)** H₂SO₄, 0-90°C, 2 сата, 100%; **III)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 50%

(51): *tert*-Бутил (3-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)пропил)карбамат

Једињење **(51)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1,5 mL), једињења **(37)** (40 mg, 0,1346 mmol), *tert*-бутил (3-аминопропил)карбамата (47 mg, 0,2691 mmol) и ДИПЕА (70 μ L, 0,4036 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (100 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/Et₂O = 6/4 \rightarrow 3/7 (v/v)) добијен је производ (50 mg, 82%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,89 (s, 1H), 6,71 (dd, J = 8,3, 1,6 Hz, 1H), 3,35 (q, J = 6,3 Hz, 2H), 3,27 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,88 (quint, J = 6,7 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,12 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,34, 156,25, 151,16, 150,38, 149,18, 143,53, 133,84, 117,60, 117,14, 110,64, 105,47, 94,93, 79,51, 52,32, 40,66, 37,96, 37,67, 35,89, 29,61, 28,39, 13,40.

(52): 2-((3-Аминопропил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(52)** синтетисано је према општем поступку А за оксидацију деривата бензонитрила коришћењем H₂SO₄ (1,5 mL) и једињења **(51)** (49 mg, 0,1086 mmol). Разблаживањем реакционе смеше H₂O (15 mL), неутрализацијом Na₂CO₃ и екстракцијом AcOEt (4 \times 15 mL) добијен је производ (40 mg, 100%) у виду прљавобеле, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(53): 2-((3-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)пропил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(53)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1,5 mL), једињења **(52)** (40 mg, 0,1086

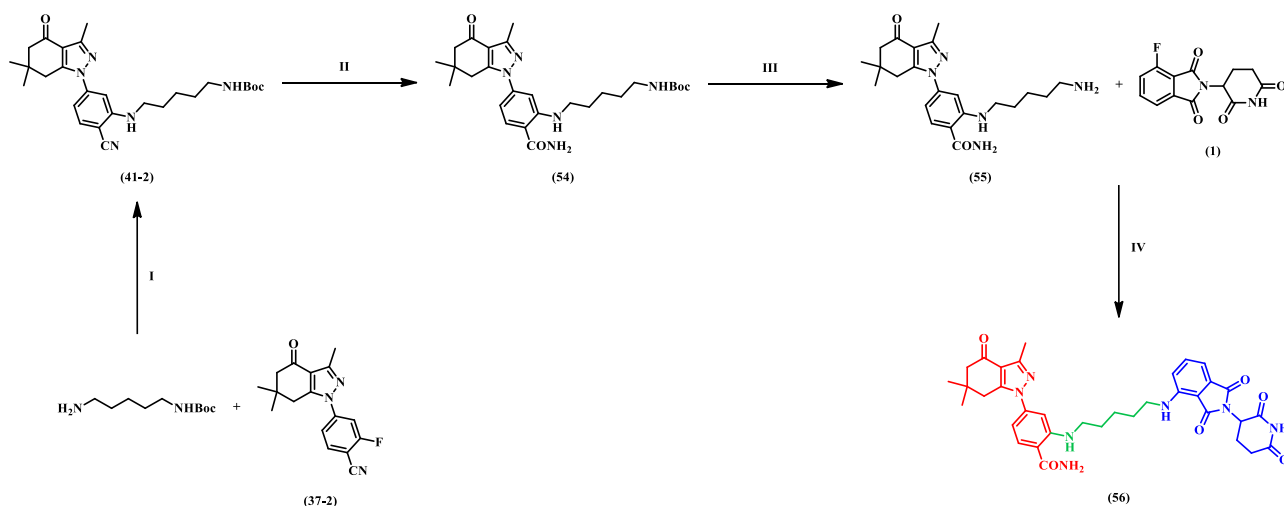
mmol), једињења (**1**) (15 mg, 0,0543 mmol) и ДИПЕА (30 μ L, 0,1628 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/МеОН = 10/0 \rightarrow 10/0,2 (v/v)) добијен је производ (17 mg, 50%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 8,19 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,42 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,60 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,91 (dd, J = 11,6, 5,6 Hz, 1H), 3,44 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 3,35 (q, J = 5,7 Hz, 2H), 2,88 – 2,72 (m, 5H), 2,53 (s, 3H), 2,38 (s, 2H), 2,13 – 2,00 (m, 3H), 1,08 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,46, 171,57, 171,54, 169,35, 168,92, 167,62, 151,03, 150,01, 149,12, 146,69, 142,74, 136,10, 132,45, 129,54, 117,25, 116,58, 112,34, 111,50, 110,18, 109,09, 106,25, 52,36, 48,84, 40,49, 37,57, 35,83, 31,42, 28,57, 28,40, 22,81, 13,42.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₃₃H₃₆N₇O₆⁺ као [M + H]⁺: 626,2722, добијено: 626,2755.

Синтеза једињења (**56**) [369]



Шема 17. Реакциони услови: **I**) ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 91%; **II**) H₂O₂, NaOH, 1,4-диоксан, СТ, 16 сати, 84%; **III**) H₃PO₄, ДХМ, СТ, 1 сат, 60%; **IV**) ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 24%

(41-2): *tert*-Бутил (5-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазол-1-ил)фенил)амино)пентил)карбамат

Једињење (**41-2**) синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (5 mL), једињења (**37-2**) (172 mg, 0,5785 mmol), *tert*-бутил (5-аминопентил)карбамата (234 mg, 1,1570 mmol) и ДИПЕА (300 μ L, 1,7354 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (300 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 30 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петролетар/Et₂O = 6/4 \rightarrow 3/7 (v/v)) добијен је производ (252 mg, 91%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,72 (dd, J = 8,3, 1,2 Hz, 1H), 3,26 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 3,14 (q, J = 6,0 Hz, 2H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,73 (quint, J = 7,1 Hz, 2H), 1,56 (quint, J = 7,0 Hz, 2H), 1,45 – 1,42 (m, 11H), 1,12 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 193,30, 156,03, 151,19, 150,38, 149,16, 143,56, 133,73, 117,61, 117,20, 110,67, 105,43, 94,73, 79,13, 52,33, 43,32, 37,69, 35,89, 29,89, 28,71, 28,42, 28,39, 24,16, 20,62, 13,39.$

(54): *tert*-Бутил (5-((2-карбамоил-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)пентил)карбамат

Једињење **(54)** синтетисано је према општем поступку Б за оксидацију деривата бензонитрила коришћењем 1,4-диоксана (8,9 mL), једињења **(41-2)** (170 mg, 0,3545 mmol), NaOH (140 μ L, 0,1418 mmol) и H₂O₂ (2,9 mL, 28,3564 mmol). Разблаживањем реакционе смеше H₂O (180 mL) и AcOEt (200 mL), одбацивањем водене фазе и испирањем органске фазе полузасићеним воденим раствором NaHCO₃ (5 \times 20 mL) добијен је производ (148 mg, 84%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,48$ (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,61 (dd, $J = 8,4, 1,8$ Hz, 1H), 3,21 – 3,11 (m, 4H), 2,82 (s, 2H), 2,55 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,72 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,59 – 1,49 (m, 4H), 1,43 (s, 9H), 1,11 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 194,34, 171,43, 157,34, 153,69, 146,89, 144,60, 136,32, 132,97, 128,54, 123,41, 116,33, 110,54, 80,65, 51,39, 44,52, 41,51, 33,50, 33,12, 29,49, 29,42, 28,82, 28,41, 24,80, 14,47.$

(55): 2-((5-Аминопентил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(55)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења **(54)** (148 mg, 0,2974 mmol), ДХМ-а (5 mL) и H₃PO₄ (100 μ L, 1,4870 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K₂CO₃ (15 mL) и екстракцијом AcOEt (3 \times 50 mL) добијен је производ (71 mg, 60%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,49$ (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,76 (s, 1H), 6,60 (dd, $J = 8,3, 1,6$ Hz, 1H), 3,19 (q, $J = 6,3$ Hz, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,75 – 2,67 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,72 (quint, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,56 – 1,42 (m, 4H), 1,10 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 193,46, 171,51, 151,28, 149,97, 149,10, 142,72, 129,52, 117,20, 112,08, 108,79, 106,26, 52,40, 42,92, 37,59, 35,84, 28,85, 28,41, 24,50, 13,42.$

(56): 2-((5-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)пентил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

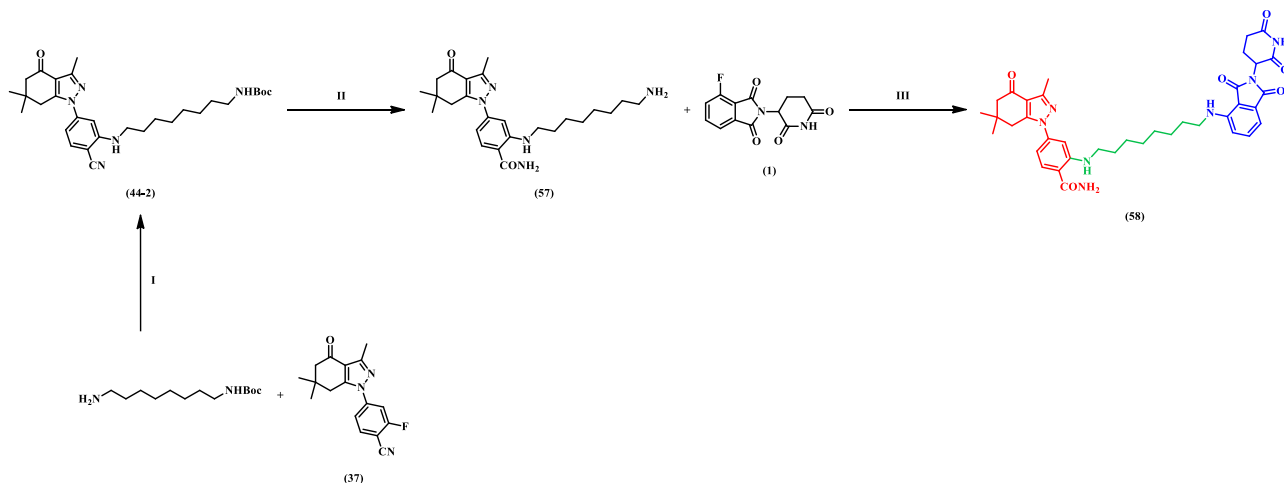
Једињење **(56)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (2 mL), једињења **(55)** (30 mg, 0,0755 mmol), једињења **(1)** (10 mg, 0,0377 mmol) и ДИПЕА (20 μ L, 0,1132 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 10/0 \rightarrow 10/2 (v/v)) добијен је производ (6 mg, 24%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,46$ (dd, $J = 17,4, 8,2$ Hz, 2H), 7,05 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 6,87 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,78 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,60 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H), 4,91 (dd, $J = 11,8, 5,3$ Hz, 1H), 3,29 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H), 3,22 (q, $J = 6,1$ Hz, 2H), 2,90 – 2,72 (m, 5H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 2,15 – 2,06 (m, 1H), 1,77 – 1,67 (m, 4H), 1,58 (q, $J = 7,9$ Hz, 2H), 1,10 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): $\delta = 194,34, 174,38, 174,23, 171,43, 169,12, 166,79, 153,69, 146,89, 144,60, 143,33, 136,32, 132,97, 131,70, 130,36, 128,54, 124,01, 123,41, 119,62, 116,33, 112,05, 110,54, 53,81, 51,39, 44,52, 33,50, 33,12, 29,80, 29,42, 28,82, 24,80, 24,03, 14,47.$

HRMS (ESI): m/z израчунато за $C_{35}H_{40}N_7O_6^+$ као $[M + H]^+$: 654,3035, добијено: 654,3024.

Синтеза једињења (58)



Шема 18. Реакциони услови: **I)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 98%; **II)** H₂SO₄, 0-90°C, 2 сата, 51%; **III)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 50%

(44-2): *tert*-Бутил (8-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)октил)карбамат

Једињење **(44-2)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (2 mL), једињења **(37)** (80 mg, 0,2691 mmol), *tert*-бутил (8-аминооктил)карбамата (131 mg, 0,5381 mmol) и ДИПЕА (140 μ L, 0,8072 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et₂O (150 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 15 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/АсОЕт = 9/1 \rightarrow 8/2 (v/v)) добијен је производ (137 mg, 98%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су идентични онима који су претходно описани за једињење **(44)**.

(57): 2-(((8-Аминооктил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(57)** синтетисано је према општем поступку А за оксидацију деривата бензонитрила коришћењем H₂SO₄ (1,5 mL) и једињења **(44-2)** (81 mg, 0,1553 mmol). Разблаживањем реакционе смеше H₂O (15 mL), неутрализацијом Na₂CO₃ и екстракцијом АсОЕт (4 \times 25 mL) добијен је производ (35 mg, 51%) у виду прљавобеле, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(58): 2-(((8-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)октил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(58)** синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1,5 mL), једињења **(57)** (35 mg, 0,0796 mmol), једињења **(1)** (11 mg, 0,0398 mmol) и ДИПЕА (20 μ L, 0,1194 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 10/0,5 \rightarrow 10/1,5 (v/v)) добијен је производ (14 mg, 50%) у виду жуто-зелене, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,51 – 7,43 (m, 2H), 7,08 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,60 (dd, J = 8,4, 1,6 Hz, 1H), 4,91 (dd, J = 11,9, 5,3 Hz, 1H), 3,26 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 3,18 (q, J = 6,1 Hz, 2H), 2,88 – 2,73 (m, 5H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 2,16 – 2,08 (m, 1H), 1,74 – 1,62 (m, 6H), 1,40 – 1,31 (m, 6H), 1,10 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,44, 171,47, 171,29, 169,55, 168,50, 167,66, 151,33, 150,00, 149,07, 147,06, 142,80, 136,11, 132,53, 129,44, 117,22, 116,69, 111,87, 111,36, 109,89, 108,73, 106,30, 52,40, 48,91, 42,97, 42,67, 37,61, 35,84, 31,45, 29,20, 29,13, 28,90, 28,42, 27,02, 26,83, 22,86, 13,43.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₃₈H₄₆N₇O₆⁺ као [M + H]⁺: 696,3504, добијено: 696,3509.

3.5. Дизајн и синтеза НуТ молекула усмерених на HSP90 који су засновани на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола

Надовезујући се на бензамидни скелет 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола описан у Одељку 3.4., дизајнирана је комплементарна серија деградера усмерених на HSP90 применом концепта хидрофобног обележавања који је описан у Одељку 1.8. За разлику од PROTAC молекула, НуТ молекули се не ослањају на директно регрутовање Е3 убиквитин лигазе. Уместо тога, они садрже хидрофобно обележје (најчешће адамантил, *tert*-бутил или сродне групе) које је спојено са лигандом који се везује за циљни протеин, са циљем да се на протеину изложи хидрофобни елемент и да се на тај начин активирају ћелијски системи контроле квалитета.

3.5.1. Образложење дизајна и избор места припајања линкера

Дизајн НуТ молекула заснованих на тетрахидроиндазолу пратио је исту методологију која је коришћена за дизајн PROTAC молекула заснованих на истоветном скелету. Као што је описано у Одељку 3.4.4., рендгенска кристална структура једињења SNX-2112 везаног за *N*-терминални домен HSP90 α директно визуализује начин везивања овог бензамидног скелета и указује да се супституент на 2'-позицији бензамида пројектује ка региону који је доступан растварачу. На основу тог кристалографског комплекса закључено је да супституент на 2'-позицији није укључен у директне протеин-лиганд контакте унутар *N*-терминалног цепа HSP90 α , као и да је изложен растварачу. Сходно томе, 2'-позиција представља рационално место припајања линкера НуТ молекула, чиме кључне интеракције које остварује лиганд за HSP90 изведен из 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола бивају очуване.

3.5.2. Синтеза и структурна карактеризација НуТ молекула базираних на скелету 4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазола

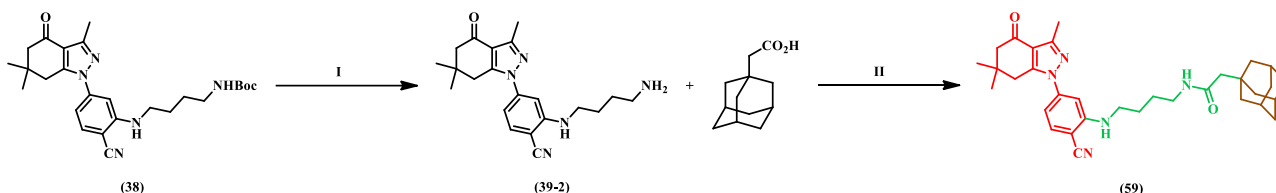
Синтетичка стратегија за добијање НуТ молекула заснованих на тетрахидроиндазолу осмишљена је као модулarna и уско усклађена са хемијом описаном у Одељку 3.4.5. која је коришћена за синтезу серије PROTAC молекула заснованих на истом скелету. У овом приступу, језгро тетрахидроиндазола се најпре функционализује на 2'-позицији ради увођења линкера. Добијени бензонитрилни или бензамидни интермедијер након депротекције амина затим служи за увођење хидрофобног обележја, чиме се добијају одговарајући НуТ молекули. У целини, ова стратегија имплементира исти приступ приликом избора места припајања линкера који је успостављен за PROTAC молекуле засноване на тетрахидроиндазолу, уз замену елемента који регрутује Е3 лигазу хидрофобним обележјем.

Општи поступак за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине [399]

У ДМФ-у су помешани 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетна киселина (1,0 equiv), амин (1,0 equiv), ХАТУ (1,2 equiv) и ДИПЕА (4,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена АсОEt и испрана полусасићеним воденим

раствором NaCl. Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући амиди.

Синтеза једињења (59) [369]



Шема 19. Реакциони услови: **I)** H₃PO₄, ДХМ, СТ, 1 сат, 60%; **II)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 61%

(39-2): 2-((4-Аминобутил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење **(39-2)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Вос групом коришћењем једињења **(38)** (25 mg, 0,0537 mmol), ДХМ-а (2 mL) и H₃PO₄ (20 μL, 0,2685 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K₂CO₃ (2 mL) и екстракцијом AcOEt (3 × 15 mL) добијен је производ (12 mg, 60%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су идентични онима који су претходно описани за једињење **(39)**.

(59): 2-((1*s*,3*s*)-Адамантан-1-ил)-N-(4-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1H-индазол-1-ил)фенил)амино)бутил)ацетамид

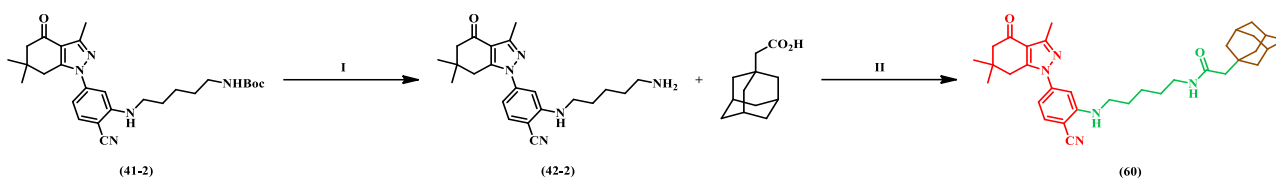
Једињење **(59)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине (6 mg, 0,0328 mmol), једињења **(39-2)** (12 mg, 0,0328 mmol), ХАТУ (15 mg, 0,0394 mmol) и ДИПЕА (20 μL, 0,1313 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (30 mL) и испрана полусасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: AcOEt/петрол-етар = 5/5 (v/v)) добијен је производ (8 mg, 61%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,71 (dd, *J* = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 3,35 – 3,26 (m, 4H), 2,83 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,96 (brs, 3H), 1,91 (s, 2H), 1,78 – 1,60 (m, 16H), 1,12 (s, 6H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,34, 171,10, 151,12, 150,47, 149,20, 143,60, 133,73, 117,65, 117,21, 110,76, 105,51, 94,81, 52,34, 51,88, 42,95, 42,68, 38,74, 37,69, 36,76, 35,92, 32,75, 28,63, 28,42, 27,36, 26,36, 13,42.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₃H₄₄N₅O₂⁺ као [M + H]⁺: 542,3490, добијено: 542,3512.

Синтеза једињења (60) [369]



Шема 20. Реакциони услови: **I)** H_3PO_4 , ДХМ, СТ, 1 сат, 79%; **II)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 62%

(42-2): 2-((5-Аминопентил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење **(42-2)** синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених *Boc* групом коришћењем једињења **(41-2)** (80 mg, 0,1668 mmol), ДХМ-а (3 mL) и H_3PO_4 (50 μL , 0,8340 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K_2CO_3 (10 mL) и екстракцијом AcOEt (3×30 mL) добијен је производ (50 mg, 79%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ^1H и ^{13}C НМР спектри били су идентични онима који су претходно описани за једињење **(42)**.

(60): 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-Адамантан-1-ил)-*N*-(5-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)пентил)ацетамид

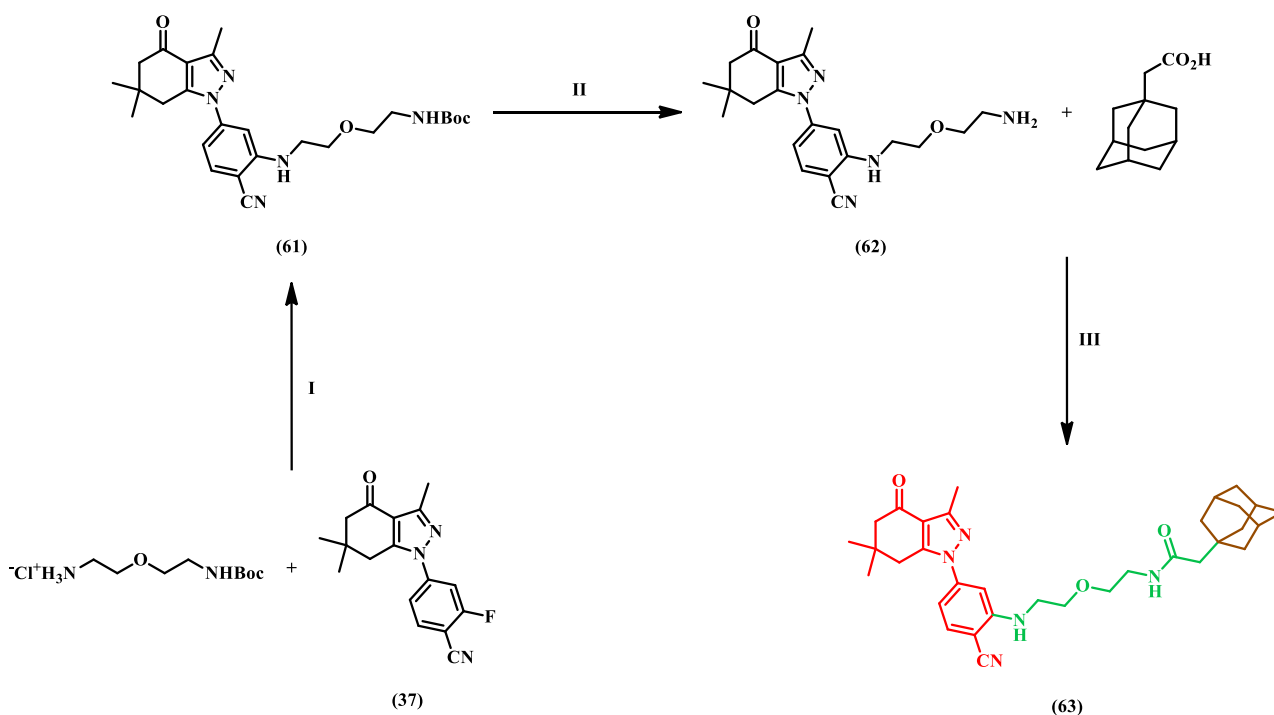
Једињење **(60)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине (14 mg, 0,0711 mmol), једињења **(42-2)** (27 mg, 0,0711 mmol), ХАТУ (32 mg, 0,0854 mmol) и ДИПЕА (50 μL , 0,2846 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5×5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Et_2O /петрол-етар = 8/2 \rightarrow 9/1 (v/v)) добијен је производ (25 mg, 62%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,48 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,70 (dd, J = 8,3, 1,4 Hz, 1H), 3,31 – 3,22 (m, 4H), 2,82 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,95 (brs, 3H), 1,90 (s, 2H), 1,78 – 1,54 (m, 18H), 1,11 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CDCl_3): δ = 193,33, 171,02, 151,21, 150,44, 149,18, 143,56, 133,72, 117,63, 117,22, 110,67, 105,50, 94,75, 52,34, 51,86, 43,27, 42,67, 39,09, 37,69, 36,78, 35,91, 32,73, 29,58, 28,68, 28,65, 28,41, 24,29, 13,41.

HRMS (ESI): m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_2^+$ као $[\text{M} + \text{H}]^+$: 556,3646, добијено: 556,3650.

Синтеза једињења (63)



Шема 21. Реакциони услови: **I)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 75%; **II)** H_3PO_4 , ДХМ, СТ, 1 сат, 100%; **III)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 50%

(61): *tert*-Бутил (2-(2-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)етокси)етил)карбамат

Једињење (61) синтетисано је према општем поступку за нуклеофилну ароматичну супституцију арил-флуорида коришћењем ДМСО-а (1,5 mL), једињења (37) (50 mg, 0,1682 mmol), 2-(2-((*tert*-бутоксикарбонил)амино)етокси)етанаминијум-хлорида (81 mg, 0,3363 mmol) и ДИПЕА (85 μL , 0,5045 mmol). Реакциона смеша је разблажена Et_2O (100 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5×10 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: петрол-етар/ Et_2O = 7/3 \rightarrow 2/8 (v/v)) добијен је производ (61 mg, 75%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

^1H НМР спектар (400 MHz, CDCl_3): δ = 7,49 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,71 (dd, J = 8,3, 1,8 Hz, 1H), 3,72 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,56 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,46 (q, J = 5,2 Hz, 2H), 3,34 (q, J = 5,2 Hz, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,11 (s, 6H).

^{13}C НМР спектар (101 MHz, CDCl_3): δ = 193,28, 151,29, 150,49, 149,13, 143,49, 133,63, 117,66, 117,13, 110,87, 105,99, 95,26, 79,33, 70,44, 69,22, 52,34, 43,14, 37,75, 35,91, 28,41, 28,39, 13,39.

(62): 2-((2-(2-Аминоетокси)етил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензонитрил

Једињење (62) синтетисано је према општем поступку за депротекцију амина заштићених Boc групом коришћењем једињења (61) (61 mg, 0,1267 mmol), ДХМ-а (3 mL) и H_3PO_4 (45 μL , 0,6333 mmol). Неутрализацијом реакционе смеше засићеним воденим раствором K_2CO_3 (6 mL) и екстракцијом AcOEt (3×20 mL) добијен је производ (48 mg, 100%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,49 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,71 (dd, J = 8,3, 1,8 Hz, 1H), 3,77 – 3,69 (m, 4H), 3,46 (q, J = 5,1 Hz, 2H), 3,39 (q, J = 4,9 Hz, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 153,69, 147,39, 144,03, 136,32, 132,93, 128,54, 117,68, 115,21, 107,33, 98,98, 73,57, 72,15, 51,39, 42,22, 41,42, 33,50, 33,12, 28,82, 14,47.

(63): 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-Адамантан-1-ил)-*N*-(2-(2-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)етокси)етил)ацетамид

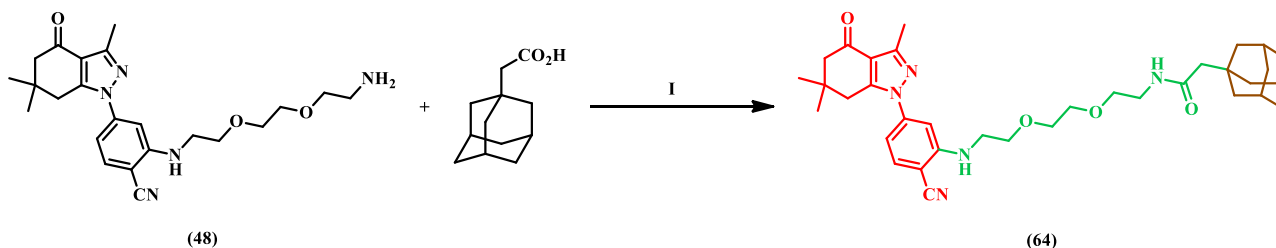
Једињење **(63)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине (7 mg, 0,0367 mmol), једињења **(62)** (14 mg, 0,0367 mmol), ХАТУ (17 mg, 0,0440 mmol) и ДИПЕА (25 μ L, 0,1468 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (40 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 4 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Ме₂СО = 10/0 \rightarrow 10/2 (v/v)) добијен је производ (10 mg, 50%) у виду бледојуте, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,49 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,15 (s, 1H), 6,69 (dd, J = 8,3, 1,8 Hz, 1H), 3,70 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 3,57 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,48 (quint, J = 5,3 Hz, 4H), 2,82 (s, 2H), 2,52 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,89 (brs, 3H), 1,84 (s, 2H), 1,69 – 1,51 (m, 12H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,25, 171,26, 151,69, 150,56, 149,17, 143,41, 133,36, 117,64, 117,27, 110,78, 106,71, 95,16, 70,53, 70,18, 52,34, 51,31, 43,44, 42,51, 39,13, 37,64, 36,79, 35,92, 32,68, 28,68, 28,41, 22,34, 14,06, 13,31.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₃₃H₄₄N₅O₃⁺ као [M + H]⁺: 558,3439, добијено: 558,3459.

Синтеза једињења **(64)** [369]



Шема 22. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 48%

(64): 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-Адамантан-1-ил)-*N*-(2-(2-(2-((2-цијано-5-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)фенил)амино)етокси)етокси)етил)ацетамид

Једињење **(61)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине (9 mg, 0,0447 mmol), једињења **(48)** (19 mg, 0,0447 mmol), ХАТУ (20 mg, 0,0536 mmol) и ДИПЕА (30 μ L, 0,1786 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: СНCl₃/Ме₂СО = 10/0 \rightarrow 8/2 (v/v)) добијен је производ (13 mg, 48%) у виду бледојуте, чврсте супстанце.

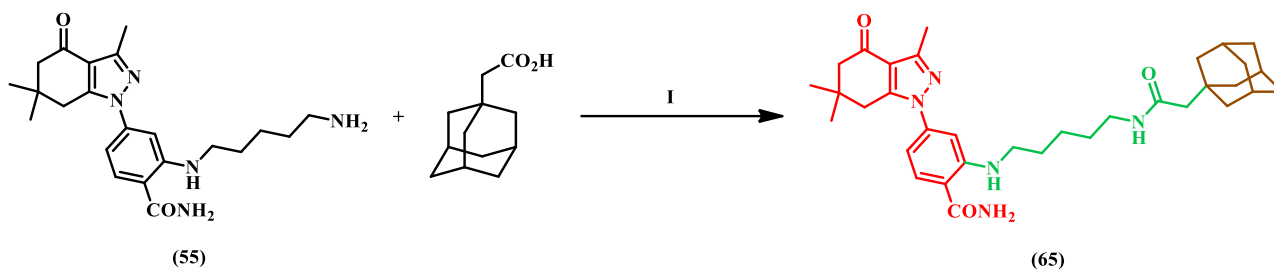
¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,50 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,91 (s, 1H), 6,73 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 3,77 (t, J = 5,1 Hz, 2H), 3,70 – 3,62 (m, 4H), 3,57 (t, J = 5,0 Hz, 2H), 3,45 (quint, J =

4,8 Hz, 4H), 2,82 (s, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,41 (s, 2H), 1,93 (brs, 5H), 1,70 – 1,57 (m, 12H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,31, 171,15, 151,26, 150,47, 149,16, 143,61, 133,76, 117,66, 117,18, 110,83, 105,69, 95,09, 70,52, 70,28, 70,16, 68,67, 52,31, 51,58, 42,98, 42,60, 39,13, 37,74, 36,81, 35,91, 32,71, 28,69, 28,41, 13,40.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₃₅H₄₈N₅O₄⁺ као [M + H]⁺: 602,3701, добијено: 602,3733.

Синтеза једињења (65) [369]



Шема 23. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 53%

(65): 2-((5-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-Адамантан-1-ил)ацетамидо)пентил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

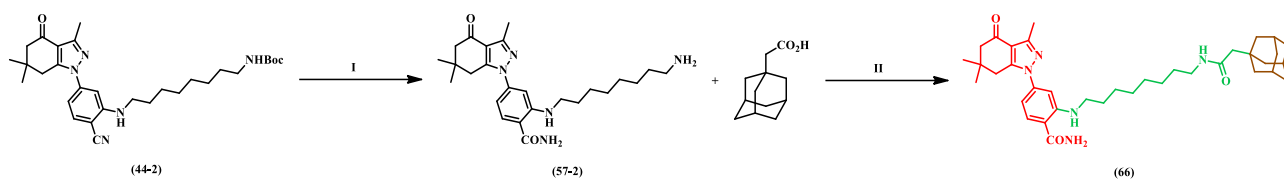
Једињење **(65)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине (13 mg, 0,0654 mmol), једињења **(55)** (26 mg, 0,0654 mmol), ХАТУ (30 mg, 0,0785 mmol) и ДИПЕА (45 μ L, 0,2616 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: АсОЕт/петрол-етар = 8/2 \rightarrow 9/1 (v/v)) добијен је производ (20 mg, 53%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,61 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 3,26 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 3,23 – 3,16 (m, 2H), 2,82 (s, 2H), 2,55 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,95 (brs, 3H), 1,90 (s, 2H), 1,76 – 1,59 (m, 18H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 194,34, 171,90, 171,43, 153,69, 146,89, 144,60, 136,32, 132,97, 128,54, 123,41, 116,33, 110,54, 51,39, 50,02, 44,52, 41,86, 40,56, 37,76, 33,50, 33,12, 29,49, 29,42, 28,82, 28,28, 24,80, 14,47.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₃₄H₄₈N₅O₃⁺ као [M + H]⁺: 574,3752, добијено: 574,3750.

Синтеза једињења (66)



Шема 24. Реакциони услови: **I)** H₂SO₄, 0-90°C, 2 сата, 69%; **II)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 24%

(57-2): 2-((8-Аминооктил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(57-2)** синтетисано је према општем поступку А за оксидацију деривата бензонитрила коришћењем H₂SO₄ (1,5 mL) и једињења **(44-2)** (41 mg, 0,0786 mmol). Разблаживањем реакционе смеше H₂O (15 mL), неутрализацијом Na₂CO₃ и екстракцијом AcOEt (4 × 15 mL) добијен је производ (24 mg, 69%) у виду прљавобеле, чврсте супстанце, који је коришћен без структурне анализе.

(66) 2-((8-(2-((3*r*,5*r*,7*r*)-Адамантан-1-ил)ацетамидо)октил)амино)-4-(3,6,6-триметил-4-оксо-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазол-1-ил)бензамид

Једињење **(66)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине коришћењем ДМФ-а (2 mL), 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адамантан-1-ил)сирћетне киселине (11 mg, 0,0546 mmol), једињења **(57-2)** (24 mg, 0,0546 mmol), ХАТУ (25 mg, 0,0656 mmol) и ДИПЕА (35 μL, 0,2184 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 10/0,5 → 10/1,5 (v/v)) добијен је производ (8 mg, 24%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,76 (s, 1H), 6,61 (dd, *J* = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 3,26 – 3,14 (m, 4H), 2,82 (s, 2H), 2,55 (s, 3H), 2,40 (s, 2H), 1,95 (brs, 3H), 1,90 (s, 2H), 1,72 – 1,59 (m, 14H), 1,52 – 1,31 (m, 10H), 1,11 (s, 6H).

¹³C NMR спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 193,43, 171,35, 170,95, 151,30, 150,00, 149,07, 142,77, 129,47, 117,21, 111,94, 108,77, 106,31, 52,41, 51,95, 42,94, 42,66, 39,39, 37,60, 36,79, 35,85, 32,72, 29,72, 29,11, 29,02, 28,83, 28,66, 28,42, 26,93, 26,78, 13,43.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₃₇H₅₄N₅O₃⁺ као [M + H]⁺: 616,4221, добијено: 616,4231.

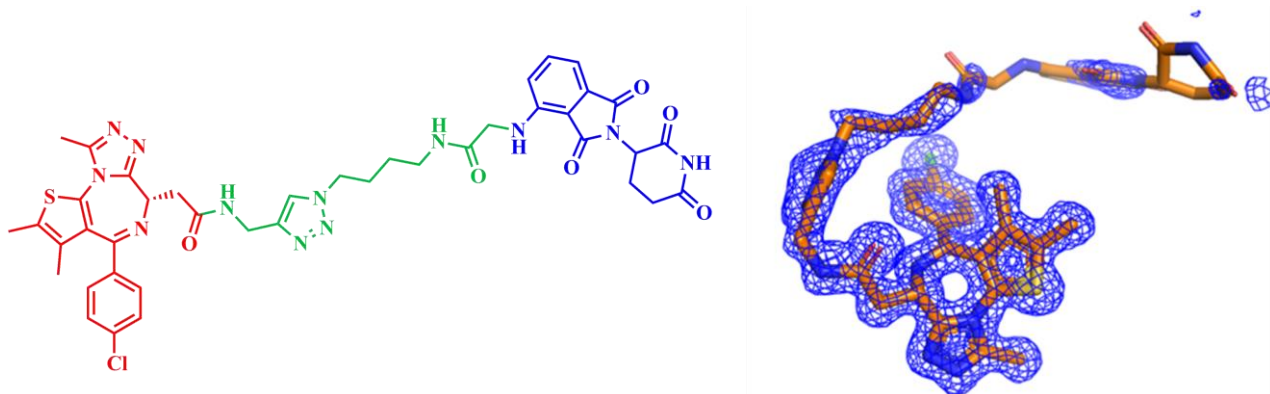
3.6. Дизајн и синтеза једињења усмерених на ВЕТ протеине

Поред стратегија деградера усмерених на HSP90 описаних у Одељцима 3.2.-3.5., обављена је независна линија истраживања са циљем да се испита хемијска модулација ВЕТ протеина [400]. Ово је проистекло из почетног интересовања за развој PROTAC молекула усмерених на ВЕТ протеине који користе (+)-JQ1 као лиганд за ПОИ, са циљем индукције деградације ВЕТ протеина. Током рада, међутим, експериментална запажања су подстакла стратешку реevaluацију тога да ли је приступ заснован на деградацији протеина оптималан. Током испитивања PROTAC молекула усмерених на ВЕТ протеине уочена је серија једињења добијених путем „клик“ реакције која су у биохемијским тестовима показала изражено повећан афинитет према бромодоменима ВЕТ протеина у поређењу са полазним инхибитором (+)-JQ1 и познатим деградером ВЕТ протеина dBET1 (Слика 14). Ови резултати су указали да

структурни елементи уведени у PROTAC молекуле могу значајно утицати на везивање за бромодомене, независно од ефикасности деградације.

3.6.1. Сазнања и закључци који су подстакли прелаз са деградера на инхибиторе

Структурна анализа репрезентативног „клик“ PROTAC молекула (**71**) усмереног на BET протеине (Слика 53) везаног за BRD2(BD2) показала је да је уочено повећање афинитета према бромодоменима последица додатних интеракција лиганд-протеин. Ове интеракције су формиране од стране триазолног региона молекула, укључујући мрежу водом посредованих водоничних веза унутар цепа бромодомена. Насупрот томе, део PROTAC молекула који регрутује E3 лигазу показивао је слабу електронску густину. Стога, кристалографском анализом се није могла протумачити улога овог дела молекула у везивању за протеин, што може сугерисати да он не доприноси значајно укупном афинитету према бромодоменима (Слика 53). Поређење са доступним кристалним структурама (+)-JQ1 (PDB код: 3ONI [362]) и његовог клинички испитиваног амидног аналога бирабресиба (PDB код: 5WMD [401]) показало је да, иако општи начин везивања за бромодомене BET протеина остаје очуван, лиганд изведен из PROTAC молекула остварује додатне интеракције које нису присутне код полазног инхибитора. Ова запажања су сугерисала да уочена повећања афинитета присутна код PROTAC молекула нису инхерентно повезана са њиховом бифункционалном природом, већ са специфичним структурним карактеристикама које се налазе у непосредној близини фрагмента који се везује за BET протеине. Детаљнија анализа ових додатних интеракција и њихових структурних детерминанти изложена је у каснијим одељцима. У овом тренутку, кристалографски подаци служе да илуструју стратешки прелаз са дизајна деградера на усмерену оптимизацију инхибитора BET протеина.



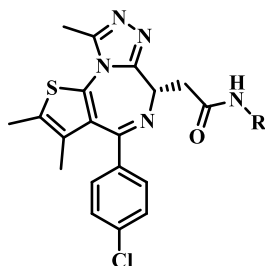
Слика 53. Хемијска структура једињења (**71**) (лево) и електронска густина око овог молекула у комплексу са BRD2(BD2) (PDB код: 6WWB [158])

3.6.2. Стратегија дизајна за оптимизацију инхибитора BET протеина

На основу претходно наведеног, фокус истраживања померен је са развоја PROTAC молекула усмерених на BET протеине ка рационалном дизајну структурно оптимизованих инхибитора BET протеина. Стога, амидни регион скелета (+)-JQ1 одабран је као кључно место за модификацију, што је диктирано интеракцијама везивања уоченим у претходно поменутој кристалној структури комплекса PROTAC молекула (**71**) и BRD2(BD2). Супституенти су бирани тако да испитају регион који заузима триазолни део „клик“ PROTAC молекула, са посебним нагласком на хетероцикличне супституенте способне да успоставе интеракције водоничним везама аналогне онима које су идентификоване кристалографски.

3.6.3. Опсег серије инхибитора ВЕТ протеина

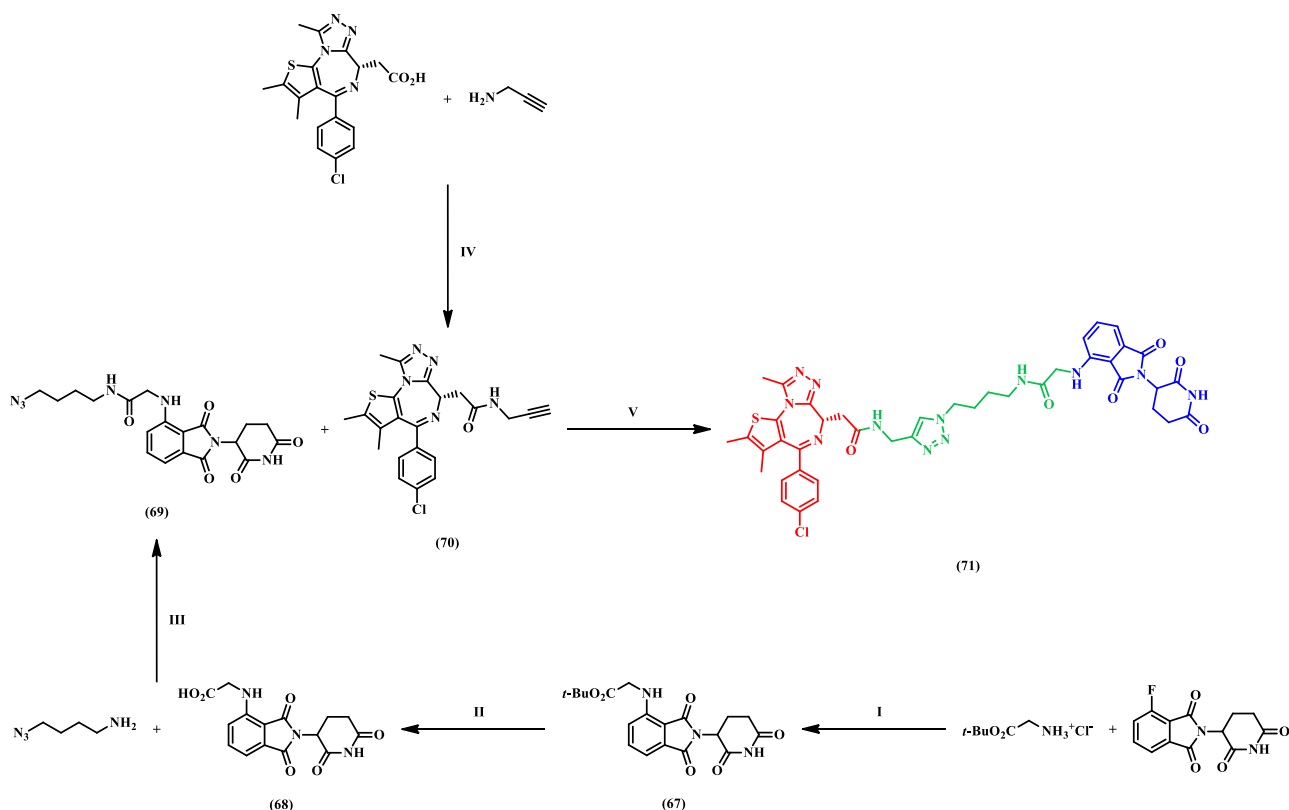
Применом претходно објашњене стратегије, серија амида (Слика 54) је осмишљена и синтетисана из киселине (+)-JQ1-CO₂H добијене из (+)-JQ1 естра и различитих амина, што је омогућило директно поређење како са полазним инхибитором (+)-JQ1, тако и са референтним амидом бирабресибом. Добијена једињења су послужила као платформа за процену на који начин се сазнања стечена током дизајна PROTAC молекула усмерених на ВЕТ протеине могу искористити за развој потентних, структурно оптимизованих инхибитора.



Слика 54. Општа структура амида изведених из (+)-JQ1

3.6.4. Синтеза и структурна карактеризација PROTAC молекула усмереног на ВЕТ протеине

Синтеза једињења (71)



Шема 25. Реакциони услови: **I)** ДИПЕА, ДМСО, 90°C, 16 сати, 42%; **II)** ТФСК, ДХМ, СТ, 2 сата, 94%; **III)** EDC × HCl, ДМАП, ДХМ, ДМФ, 0°C-СТ, 16 сати, 61%; **IV)** EDC × HCl, ДМАП, ДХМ, СТ, 16 сати, 89%; **V)** CuSO₄, натријум-аскорбат, H₂O, ДМСО, СТ, 16 сати, 60%

(67): *tert*-Бутил 2-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)ацетат [158]

У ДМСО-у (1,5 mL) су помешани 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-флуороизоиндолин-1,3-дион (160 mg, 0,5792 mmol, 1,0 equiv), 2-(*tert*-бутоксиди)аминамијум-хлорид (136 mg, 0,8109 mmol, 1,4 equiv) и ДИПЕА (395 μ L, 2,3170 mmol, 4,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на 90°C током 16 сати. Потом је разблажена АсОЕт (250 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 25 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH II* g, МФ: градијент хексан/АсОЕт (0-50% АсОЕт)), чиме је добијено једињење **(67)** (95 mg, 42%) у виду бледожуте, чврсте супстанце. ¹H НМР спектар био је у сагласности са литературним подацима [402].

(68): 2-((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)сирћетна киселина [158]

У раствор једињења **(67)** (20 mg, 0,0516 mmol, 1 equiv) у ДХМ-у (1 mL) додата је ТФСК (80 μ L, 1,0326 mmol, 20 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 2 сата. Потом је концентрисана под сниженим притиском, чиме је добијено једињење **(68)** (16 mg, 94%) у виду жуте, чврсте супстанце. ¹H и ¹³C НМР спектри били су у сагласности са литературним подацима [370].

(69): *N*-(4-Азидобутил)-2-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)ацетамид [158]

У ДХМ-у (1 mL) и ДМФ-у (100 μ L) су на 0°C помешани једињење **(68)** (14 mg, 0,0423 mmol, 1,0 equiv), 4-азидобутан-1-амин (1 M у метил-*tert*-бутил етру, 45 μ L, 0,0465 mmol, 1,1 equiv), EDC \times HCl (11 mg, 0,0549 mmol, 1,3 equiv) и ДМАП (2,6 mg, 0,0211 mmol, 0,5 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена ДХМ-ом (50 mL) и испрана H₂O (5 \times 10 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH II* g, МФ: градијент хексан/АсОЕт (0-75% АсОЕт), а затим градијент ДХМ/МеОН (0-5% МеОН)), чиме је добијено једињење **(69)** (11 mg, 61%) у виду жуте, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,55 (s, 1H), 7,56 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 6,74 (t, J = 5,8 Hz, 1H), 6,68 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 4,95 (dd, J = 12,3, 5,3 Hz, 1H), 3,96 (d, J = 6,1 Hz, 2H), 3,26 (d, J = 5,8 Hz, 4H), 2,73 (s, 3H), 2,15 (dd, J = 12,8, 4,9 Hz, 1H), 1,60 – 1,49 (m, 4H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 171,16, 169,39, 169,07, 168,67, 167,23, 145,85, 136,60, 132,39, 117,01, 113,47, 111,69, 50,94, 49,07, 47,26, 38,79, 31,43, 26,74, 26,16, 22,71.

(70): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]диазепин-6-ил)-*N*-(проп-2-ин-1-ил)ацетамид [158]

У ДХМ-у (1 mL) су помешани (+)-JQ1-CO₂H (40 mg, 0,0998 mmol, 1,0 equiv), проп-2-ин-1-амин (10 μ L, 0,1497 mmol, 1,5 equiv), EDC \times HCl (25 mg, 0,1297 mmol, 1,3 equiv) и ДМАП (5 mg, 0,0399 mmol, 0,4 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтриран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH II* g, МФ: градијент ДХМ/МеОН (0-8% МеОН)), чиме је добијено једињење **(70)** (39 mg, 89%) у виду беле, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,42 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,03 (s, 1H), 4,62 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 4,24 – 4,16 (m, 1H), 3,99 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 3,56 (dd, J = 14,2, 6,9 Hz, 1H), 3,44 (dd, J = 14,2, 6,9 Hz, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,24 (s, 1H), 1,67 (s, 3H).

¹³C NMR спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,32, 163,99, 155,53, 149,92, 136,81, 136,56, 132,16, 130,93, 130,85, 130,41, 129,87, 128,69, 79,65, 71,39, 54,33, 39,10, 29,24, 14,41, 13,10, 11,86.

(71): 2-((*S*)-4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)-*N*-((1-(4-(2-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1,3-диоксоизоиндолин-4-ил)амино)ацетамидо)бутил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метил)ацетамид [158]

У раствор једињења (**70**) (10 mg, 0,0228 mmol, 1,0 equiv), једињења (**69**) (13 mg, 0,0297 mmol, 1,3 equiv) и CuSO₄ (8 mg, 0,0525 mmol, 2,3 equiv) у H₂O (450 μ L) и ДМСО-у (450 μ L) додат је натријум-аскорбат (0,5 M у H₂O, 105 μ L, 0,0525 mmol, 2,3 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Органски слој је осушен преко анхидрованога Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH 11 g*, МФ: градијент хексан/AcOEt (0-100% AcOEt), а затим градијент ДХМ/MeOH (0-8% MeOH)), чиме је добијено једињење (**71**) (12 mg, 60%) у виду беле, чврсте супстанце.

¹H NMR спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 9,15 (s, 1H), 7,57 – 7,44 (m, 3H), 7,39 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,25 – 7,19 (m, 1H), 7,12 (dd, J = 9,8, 7,3 Hz, 1H), 6,82 – 6,70 (m, 2H), 4,94 – 4,85 (m, 1H), 4,71 – 4,61 (m, 2H), 4,48 – 4,39 (m, 1H), 4,26 (dt, J = 13,7, 6,9 Hz, 1H), 4,22 – 4,15 (m, 1H), 3,97 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 3,61 – 3,53 (m, 1H), 3,41 – 3,29 (m, 2H), 3,25 (q, J = 6,3 Hz, 1H), 3,17 (dd, J = 13,3, 6,3 Hz, 1H), 2,86 – 2,66 (m, 3H), 2,60 (d, J = 9,2 Hz, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,07 (d, J = 5,5 Hz, 1H), 1,86 – 1,77 (m, 2H), 1,67 (s, 3H), 1,49 – 1,41 (m, 2H).

¹³C NMR спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 171,42, 171,37, 170,66, 169,39, 169,26, 169,21, 168,98, 168,93, 167,53, 167,46, 164,30, 164,16, 155,60, 149,97, 145,76, 145,73, 145,38, 145,35, 136,89, 136,51, 136,49, 136,37, 132,35, 132,16, 132,13, 130,96, 130,94, 130,92, 130,90, 130,38, 130,36, 129,91, 129,88, 128,74, 122,31, 122,26, 116,97, 116,93, 112,93, 112,89, 111,42, 54,30, 49,62, 49,58, 49,07, 49,04, 46,95, 38,70, 38,59, 38,52, 35,32, 35,30, 31,41, 27,32, 27,24, 26,10, 26,03, 22,69, 22,63, 14,40, 13,10, 11,71, 11,68.

HRMS (ESI): m/z израчунато за C₄₁H₄₂ClN₁₂O₆S⁺ као [M + H]⁺: 865,2754, добијено: 865,2751.

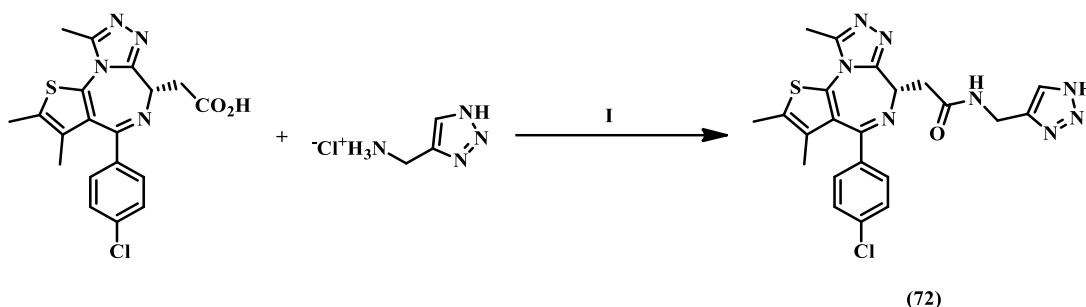
3.6.5. Синтеза и структурна карактеризација амида извезених из (+)-JQ1

Амиди изведени из (+)-JQ1 добијени су тако што је као један заједнички реактант употребљена (+)-JQ1-CO₂H која је претворена у низ различитих амида. Експериментално, (+)-JQ1-CO₂H је реаговала са различитим аминима под стандардним условима за амидно купловање, а производи су потом изоловани и пречишћени како би се добили аналози (+)-JQ1 који су се углавном разликовали по амидном супституенту, док је језгро (+)-JQ1 остало очувано.

Општи поступак за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H [400]

У ДМФ-у су помешани (+)-JQ1-CO₂H (1,0 equiv), амин (1,5 equiv), ХАТУ (2,0 equiv) и ДИПЕА (5,0 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 16 сати. Потом је разблажена AcOEt и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl. Органски слој је осушен преко анхидрованога Na₂SO₄, профилиран и концентрисан под сниженим притиском. Остатак је пречишћен флеш хроматографијом на колони силика-гела, чиме су добијени одговарајући амиди.

Синтеза једињења (72)



Шема 26. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 50%

(72): (*S*)-*N*-((1*H*-1,2,3-Триазол-4-ил)метил)-2-(4-(4-хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)ацетамид

Једињење (**72**) синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (30 mg, 0,0748 mmol), (1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метанаминијум-хлорида (15 mg, 0,1123 mmol), ХАТУ (57 mg, 0,1497 mmol) и ДИПЕА (65 μ L, 0,3742 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 \times 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH 11 g*, МФ: градијент ДХМ/МеОН (0-8% МеОН)) добијен је производ (18 mg, 50%) у виду беле, чврсте супстанце.

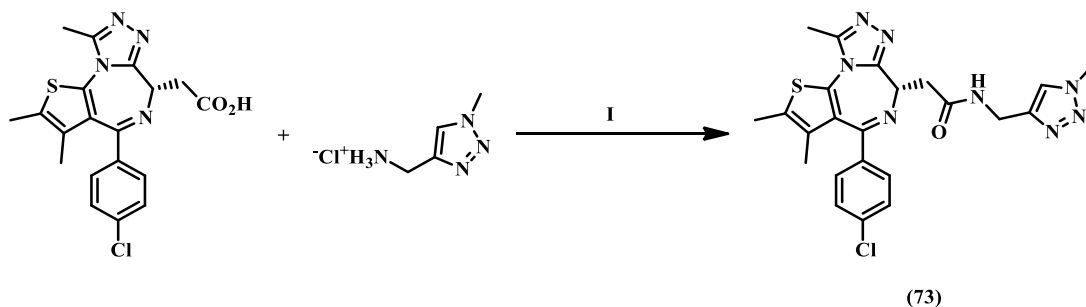
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,56 (s, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,29 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,75 (dd, *J* = 8,0, 6,3 Hz, 1H), 4,58 (qd, *J* = 15,4, 5,7 Hz, 2H), 3,66 (dd, *J* = 14,8, 8,1 Hz, 1H), 3,47 (dd, *J* = 14,8, 6,3 Hz, 1H), 2,69 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,66 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,63, 164,52, 155,69, 150,24, 137,03, 136,45, 132,01, 131,32, 131,16, 130,77, 130,00, 128,87, 54,46, 38,94, 14,52, 13,25, 11,95.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₂H₂₂ClN₈OS⁺ као [M + H]⁺: 481,1320, добијено: 481,1317.

$[\alpha]_D^{28,2}$ (C = 0,310 g/mL, l = 1 dm, растварач: МеОН): +41,0°

Синтеза једињења (73)



Шема 27. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 54%

(73): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)-*N*-((1-метил-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метил)ацетамид

Једињење **(73)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (21 mg, 0,0524 mmol), (1-метил-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метанаминајум-хлорида (12 mg, 0,0786 mmol), ХАТУ (40 mg, 0,1048 mmol) и ДИПЕА (45 μL, 0,2619 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH 11 g*, МФ: градијент ДХМ/МеОН (0-8% МеОН)) добијен је производ (14 mg, 54%) у виду беле, чврсте супстанце.

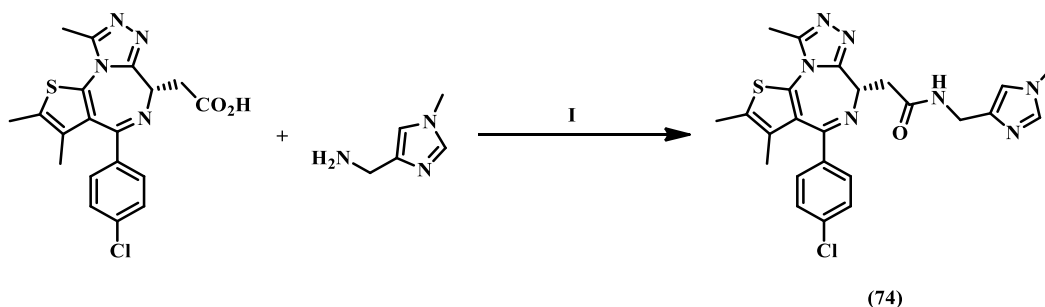
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,57 (s, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 4,63 – 4,55 (m, 3H), 4,01 (s, 3H), 3,53 (dd, *J* = 14,5, 7,4 Hz, 1H), 3,40 (dd, *J* = 14,5, 6,4 Hz, 1H), 2,67 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 1,67 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,82, 164,18, 155,72, 150,07, 145,51, 137,01, 136,65, 132,34, 131,00, 130,48, 129,97, 128,88, 123,43, 54,47, 39,19, 36,73, 35,51, 14,54, 13,24, 11,99.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₃H₂₄ClN₈OS⁺ као [M + H]⁺: 495,1477, добијено: 495,1485.

[α]_D^{28,4} (*C* = 0,260 g/mL, *l* = 1 dm, растварач: МеОН): +24,4°

Синтеза једињења (74)



Шема 28. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 61%

(74): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)-*N*-((1-метил-1*H*-имидазол-4-ил)метил)ацетамид

Једињење **(74)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (15 mg, 0,0374 mmol), (1-метил-1*H*-имидазол-4-ил)метанамина (6 mg, 0,0561 mmol), ХАТУ (28 mg, 0,0748 mmol) и ДИПЕА (30 μL, 0,1871 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (30 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH 11 g*, МФ: градијент ДХМ/МеОН (0-7% МеОН)) добијен је производ (11 mg, 61%) у виду беле, чврсте супстанце.

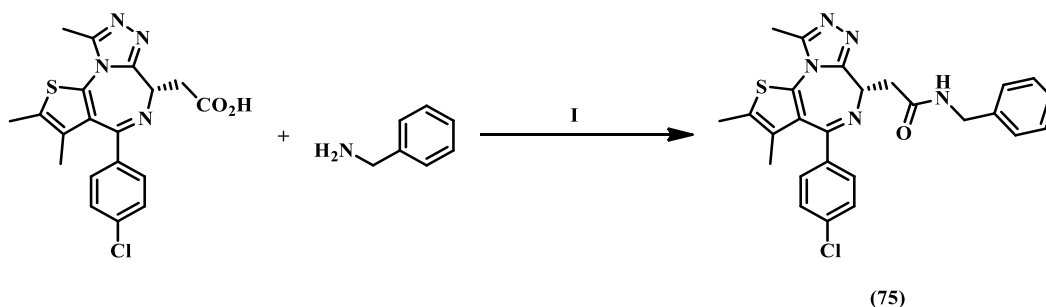
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,41 – 7,34 (m, 3H), 7,30 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,85 (s, 1H), 4,66 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,46 – 4,35 (m, 2H), 3,63 (s, 3H), 3,54 (dd, *J* = 14,5, 6,9 Hz, 1H), 3,40 (dd, *J* = 14,5, 7,1 Hz, 1H), 2,66 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,67 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,45, 163,97, 155,78, 149,96, 139,34, 137,57, 136,82, 136,77, 132,32, 131,01, 130,85, 130,56, 130,01, 128,77, 117,80, 54,55, 39,29, 37,85, 33,49, 14,52, 13,21, 11,97.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₄H₂₅ClN₇OS⁺ као [M + H]⁺: 494,1524, добијено: 494,1523.

[α]_D^{27,9} (C = 0,230 g/mL, l = 1 dm, растварач: MeOH): +33,3°

Синтеза једињења (75)



Шема 29. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 62%

(75): (*S*)-*N*-Бензил-2-(4-(4-хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)ацетамид

Једињење **(75)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (20 mg, 0,0499 mmol), фенилметанамина (8 mg, 0,0748 mmol), ХАТУ (38 mg, 0,0998 mmol) и ДИПЕА (40 μL, 0,2495 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (30 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (*Biotage SNAP Cartridge KP-NH II g*, МФ: градијент хексан/АсОЕт (0-76% АсОЕт), а затим градијент ДХМ/МеОН (0-5% МеОН)) добијен је производ (15 mg, 62%) у виду беле, чврсте супстанце.

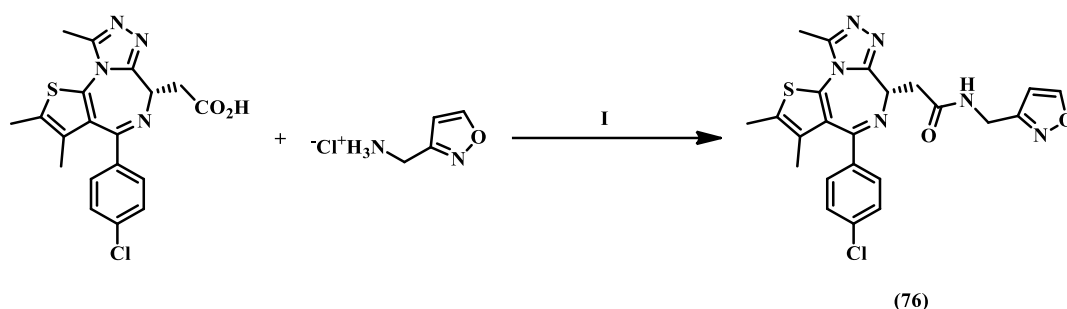
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,34 – 7,26 (m, 9H), 4,68 – 4,62 (m, 2H), 4,36 (dd, *J* = 14,8, 5,2 Hz, 1H), 3,56 (dd, *J* = 14,2, 6,8 Hz, 1H), 3,43 (dd, *J* = 14,2, 7,1 Hz, 1H), 2,66 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,66 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,59, 164,11, 155,74, 149,99, 138,41, 136,88, 136,71, 132,30, 131,04, 130,94, 130,57, 129,93, 128,82, 128,78, 127,90, 127,53, 54,65, 43,79, 39,55, 14,53, 13,23, 11,98.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₆H₂₅ClN₅OS⁺ као [M + H]⁺: 490,1463, добијено: 490,1458.

[α]_D^{28,3} (C = 0,410 g/mL, l = 1 dm, растварач: MeOH): +60,1°

Синтеза једињења (76) [369]



Шема 30. Реакциони услови: **I)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 36%

(76): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]диазепин-6-ил)-*N*-(изоксазол-3-илметил)ацетамид

Једињење **(76)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (15 mg, 0,0374 mmol), изоксазол-3-илметанаминијум-хлорида (8 mg, 0,0561 mmol), ХАТУ (28 mg, 0,0748 mmol) и ДИПЕА (30 μL, 0,1871 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОEt (30 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Me₂CO/ДХМ = 6/4 → 8/2 (v/v)) добијен је производ (6 mg, 36%) у виду беле, чврсте супстанце.

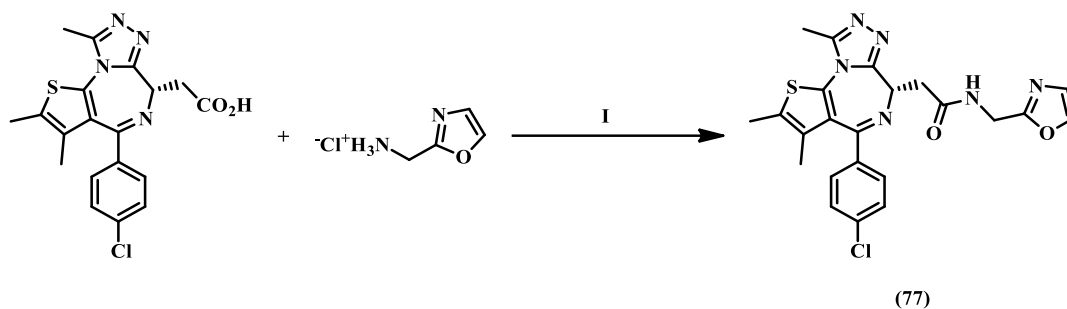
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,30 (s, 1H), 7,38 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,39 (s, 1H), 4,68 – 4,61 (m, 2H), 4,56 (dd, *J* = 15,6, 5,2 Hz, 1H), 3,57 (dd, *J* = 14,3, 7,1 Hz, 1H), 3,50 – 3,44 (m, 1H), 2,67 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 1,67 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,89, 164,02, 160,45, 158,59, 136,83, 136,46, 132,13, 130,88, 130,42, 129,83, 128,65, 103,97, 54,30, 38,98, 35,20, 29,24, 14,34, 13,04, 11,77.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₃H₂₂ClN₆O₂S⁺ као [M + H]⁺: 481,1208, добијено: 481,1209.

[α]_D^{20,0} (*C* = 0,002 g/mL, *l* = 1 dm, растварач: CHCl₃): +38,0°

Синтеза једињења (77) [369]



Шема 31. Реакциони услови: **I)** ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 44%

(77): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]диазепин-6-ил)-*N*-(оксазол-2-илметил)ацетамид

Једињење (77) синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (15 mg, 0,0374 mmol), оксазол-2-илметанаминијум-хлорида (8 mg, 0,0561 mmol), ХАТУ (28 mg, 0,0748 mmol) и ДИПЕА (30 μL, 0,1871 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (30 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Me₂CO/ДХМ = 6/4 → 9/1 (v/v)) добијен је производ (8 mg, 44%) у виду беле, чврсте супстанце.

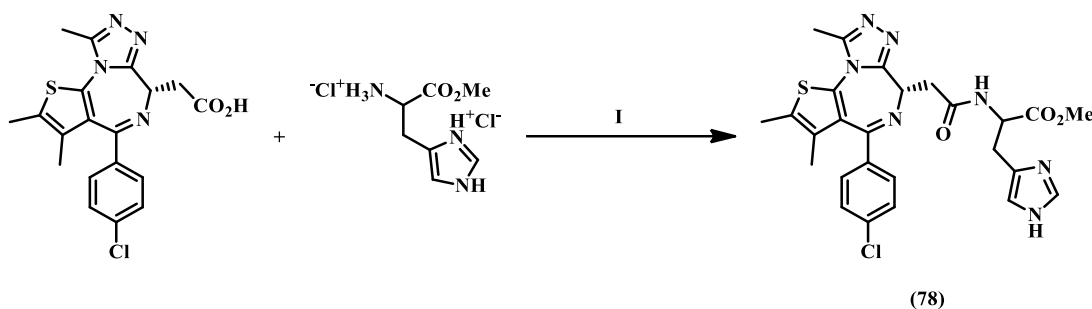
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,61 (s, 1H), 7,41 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,07 (s, 1H), 4,74 (dd, *J* = 16,5, 6,0 Hz, 1H), 4,65 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,54 (dd, *J* = 16,5, 5,0 Hz, 1H), 3,62 (dd, *J* = 14,5, 6,9 Hz, 1H), 3,52 – 3,45 (m, 1H), 2,67 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,67 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 171,01, 164,20, 161,11, 155,82, 150,11, 139,31, 137,03, 136,79, 132,38, 131,16, 131,07, 130,71, 130,13, 128,90, 127,42, 54,56, 39,23, 37,17, 29,50, 14,60, 13,30, 12,03.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₃H₂₂ClN₆O₂S⁺ као [M + H]⁺: 481,1208, добијено: 481,1225.

[α]_D^{20,0} (*C* = 0,002 g/mL, *l* = 1 dm, растварач: CHCl₃): +31,5°

Синтеза једињења (78) [369]



Шема 32. Реакциони услови: I) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 54%

(78): Метил-2-(2-((*S*)-4-(4-хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)ацетамидо)-3-(1*H*-имидазол-4-ил)пропаноат

Једињење (78) синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (19 mg, 0,0474 mmol), 4-(2-амонио-3-метокси-3-оксопропил)-1*H*-имидазол-3-ијум-хлорида (17 mg, 0,0711 mmol), ХАТУ (36 mg, 0,0948 mmol) и ДИПЕА (40 μL, 0,2370 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Me₂CO/ДХМ = 1/1 → 9/1 (v/v)) добијен је производ (14 mg, 54%) у виду беле, чврсте супстанце.

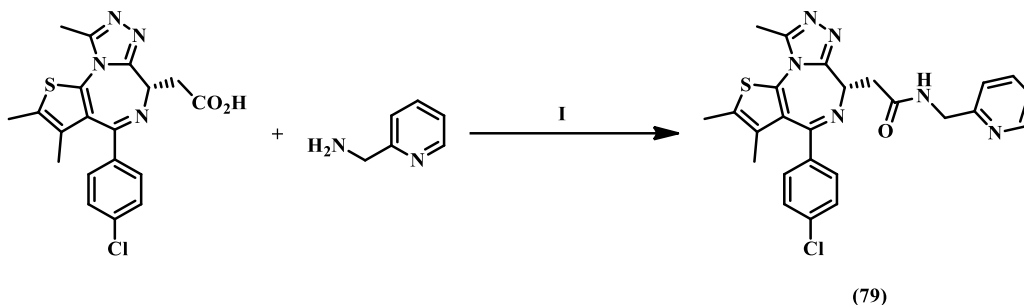
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,52 (s, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,29 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,86 (s, 1H), 4,72 – 4,60 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 3,58 – 3,47 (m, 2H), 3,25 – 3,15 (m, 2H), 2,66 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 1,66 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 171,47, 170,39, 164,18, 155,68, 149,90, 136,84, 136,41, 132,00, 130,95, 130,54, 129,87, 128,66, 53,98, 53,80, 53,27, 52,33, 38,28, 29,24, 14,32, 13,04, 11,75.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₆H₂₇ClN₇O₃S⁺ као [M + H]⁺: 552,1579, добијено: 552,1585.

$[\alpha]_D^{20,0}$ ($C = 0,002 \text{ g/mL}$, $l = 1 \text{ dm}$, растварач: CHCl_3): $+14,0^\circ$

Синтеза једињења (79) [369]



Шема 33. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 35%

(79): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дизаепин-6-ил)-*N*-(пиридин-2-илметил)ацетамид

Једињење **(79)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (16 mg, 0,0399 mmol), пиридин-2-илметанамина (6 mg, 0,0599 mmol), ХАТУ (30 mg, 0,0798 mmol) и ДИПЕА (35 μL, 0,1996 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (30 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Me₂CO/ДХМ = 4/6 → 6/4 (v/v)) добијен је производ (7 mg, 35%) у виду беле, чврсте супстанце.

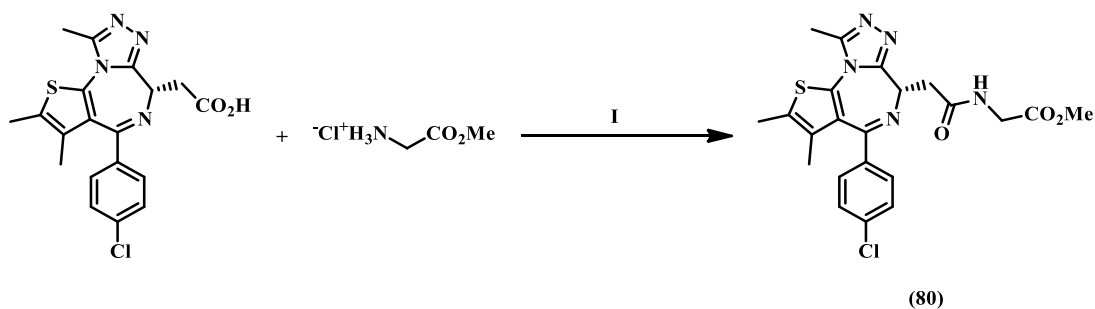
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,55 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 7,63 (td, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,33 – 7,27 (m, 3H), 7,19 (dd, *J* = 7,2, 5,0 Hz, 1H), 4,72 – 4,65 (m, 2H), 4,59 (dd, *J* = 16,2, 4,9 Hz, 1H), 3,56 (ddd, *J* = 22,0, 14,5, 6,9 Hz, 2H), 2,66 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,67 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,68, 163,86, 156,76, 155,66, 149,05, 136,71, 136,59, 132,18, 130,87, 130,73, 130,45, 129,86, 128,62, 122,23, 121,81, 54,37, 44,79, 39,13, 14,35, 13,03, 11,79.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₅H₂₄ClN₆OS⁺ као [M + H]⁺: 491,1415, добијено: 491,1425.

$[\alpha]_D^{20,0}$ ($C = 0,002 \text{ g/mL}$, $l = 1 \text{ dm}$, растварач: CHCl_3): $+9,5^\circ$

Синтеза једињења (80) [369]



Шема 34. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 75%

(80): (*S*)-Метил-2-(2-(4-(4-хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]диазепин-6-ил)ацетамидо)ацетат

Једињење **(80)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (27 mg, 0,0674 mmol), 2-метокси-2-оксоетанаминијум-хлорида (13 mg, 0,1010 mmol), ХАТУ (51 mg, 0,1347 mmol) и ДИПЕА (60 μL, 0,3368 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Ме₂СО/ДХМ = 2/5 → 5/5 (v/v)) добијен је производ (24 mg, 75%) у виду беле, чврсте супстанце.

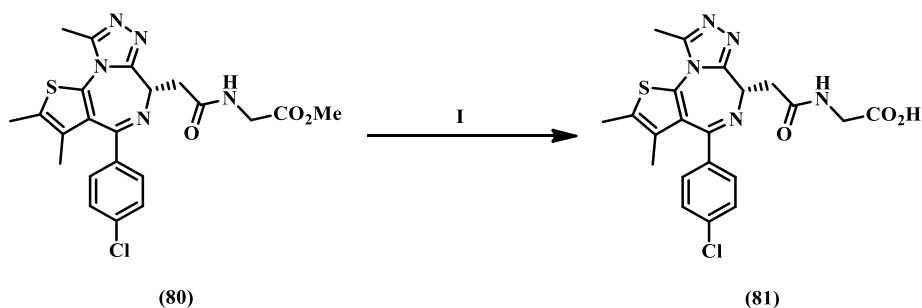
¹H НМР спектар (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,41 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 4,60 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,16 (dd, *J* = 18,1, 5,7 Hz, 1H), 3,99 (dd, *J* = 18,2, 4,9 Hz, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,60 (dd, *J* = 14,7, 6,9 Hz, 1H), 3,44 (dd, *J* = 14,7, 7,0 Hz, 1H), 2,65 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 1,66 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (101 MHz, CDCl₃): δ = 170,87, 170,15, 163,99, 155,62, 149,93, 136,84, 136,59, 132,17, 130,98, 130,86, 130,53, 129,94, 128,72, 54,34, 52,27, 41,45, 38,96, 14,39, 13,09, 11,82.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₂H₂₃ClN₅O₃S⁺ као [M + H]⁺: 472,1205, добијено: 472,1200.

[α]_D^{20,0} (*C* = 0,004 g/mL, *l* = 1 dm, растварач: CHCl₃): +32,7°

Синтеза једињења (81) [369,403]



Шема 35. Реакциони услови: **I**) LiOH, МеОН, H₂O, СТ, 3 сата, 95%

(81): (*S*)-2-(2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]диазепин-6-ил)ацетамидо)сирћетна киселина

У раствор једињења (**80**) (20 mg, 0,0424 mmol, 1 equiv) у MeOH (1 mL) додат је LiOH (0,5 M у H₂O, 170 μL, 0,0848 mmol, 2 equiv), а затим је реакциона смеша мешана на собној температури током 3 сата. Потом је закисељена додавањем 10% (w/w) раствора лимунске киселине у H₂O до рН вредности 3, екстрахована AcOEt (3 × 20 mL), осушена преко анхидрованог Na₂SO₄, профильтрирана и концентрисана под сниженим притиском, чиме је добијено једињење (**81**) (18 mg, 95%) у виду беле, чврсте супстанце.

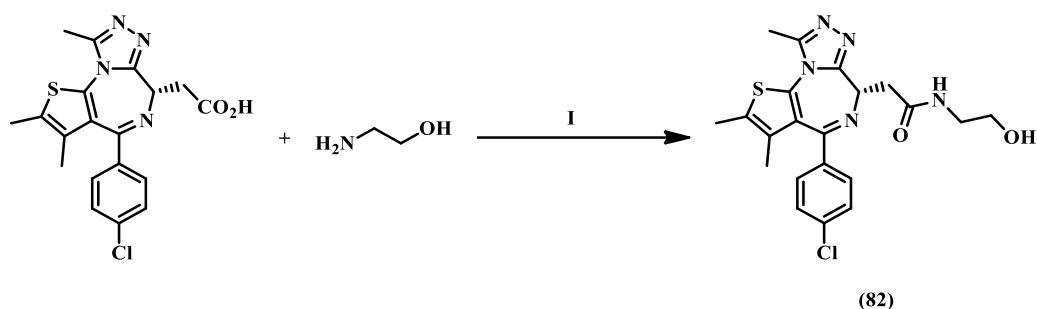
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,41 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 4,73 – 4,58 (m, 1H), 4,17 – 4,02 (m, 2H), 3,71 (dd, J = 15,7, 8,9 Hz, 1H), 3,51 – 3,41 (m, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 1,67 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 172,08, 170,71, 164,24, 155,34, 149,99, 136,89, 136,27, 131,61, 131,29, 131,06, 130,83, 129,94, 128,69, 54,19, 41,85, 38,37, 14,32, 13,06, 11,60.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₁H₂₁ClN₅O₃S⁺ као [M + H]⁺: 458,1048, добијено: 458,1053.

[α]_D^{20,0} (C = 0,002 g/mL, l = 1 dm, растварач: CHCl₃): +28,5°

Синтеза једињења (82)



Шема 36. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 32%

(**82**): (S)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6H-тиено[3,2-f][1,2,4]триазоло[4,3-a][1,4]дiazепин-6-ил)-N-(2-хидроксиетил)ацетамид

Једињење (**82**) синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (20 mg, 0,0499 mmol), 2-аминоетанола (5 mg, 0,0748 mmol), ХАТУ (38 mg, 0,0998 mmol) и ДИПЕА (40 μL, 0,2495 mmol). Реакциона смеша је разблажена AcOEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: Me₂CO/ДХМ = 6/4 → 9/1 (v/v)) добијен је производ (7 mg, 32%) у виду прљавобеле, чврсте супстанце.

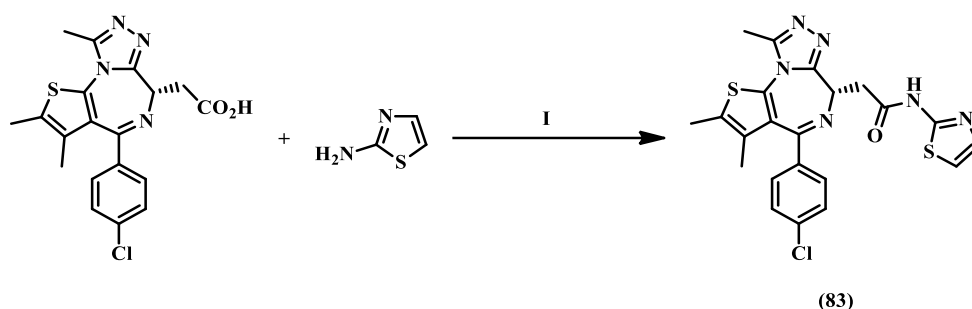
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,40 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 4,69 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 3,78 – 3,69 (m, 2H), 3,58 (dd, J = 14,3, 7,8 Hz, 1H), 3,51 – 3,40 (m, 3H), 2,68 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 1,68 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 171,57, 164,29, 156,02, 150,23, 137,10, 136,70, 132,15, 131,28, 131,23, 130,91, 130,11, 128,94, 62,10, 54,64, 43,07, 39,31, 14,59, 13,31, 12,01.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₁H₂₃ClN₅O₂S⁺ као [M + H]⁺: 444,1255, добијено: 444,1259.

[α]_D^{20,0} (C = 0,002 g/mL, l = 1 dm, растварач: CHCl₃): +16,5°

Синтеза једињења (83)



Шема 37. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 19%

(83): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)-*N*-(тиазол-2-ил)ацетамид

Једињење **(83)** синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (31 mg, 0,0773 mmol), тиазол-2-амина (12 mg, 0,1160 mmol), ХАТУ (59 mg, 0,1547 mmol) и ДИПЕА (65 μL, 0,3866 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОEt (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂СО = 8/2 → 6/4 (v/v)) добијен је производ (7 mg, 19%) у виду бледожуте, чврсте супстанце.

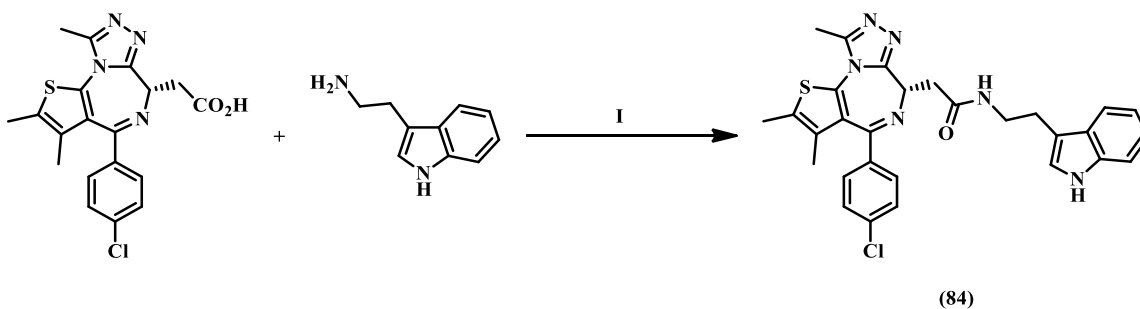
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,59 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,95 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 4,77 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 3,87 (ddd, *J* = 21,2, 15,1, 6,9 Hz, 2H), 2,72 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 1,69 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 169,03, 164,44, 158,97, 155,62, 150,38, 137,82, 137,11, 136,70, 132,43, 131,24, 131,14, 130,64, 130,15, 128,93, 113,41, 54,20, 39,07, 14,70, 13,32, 12,05.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₂H₂₀ClN₆OS₂⁺ као [M + H]⁺: 483,0823, добијено: 483,0814.

[α]_D^{20,0} (*C* = 0,002 g/mL, *l* = 1 dm, растварач: CHCl₃): +12,0°

Синтеза једињења (84)



Шема 38. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 78%

(84): (*S*)-*N*-(2-(1*H*-Индол-3-ил)етил)-2-(4-(4-хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)ацетамид

Једињење (**84**) синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (20 mg, 0,0499 mmol), 2-(1*H*-индол-3-ил)етанамина (12 mg, 0,0748 mmol), ХАТУ (38 mg, 0,0998 mmol) и ДИПЕА (40 μL, 0,2495 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 8/2 → 4/6 (v/v)) добијен је производ (21 mg, 78%) у виду беле, чврсте супстанце.

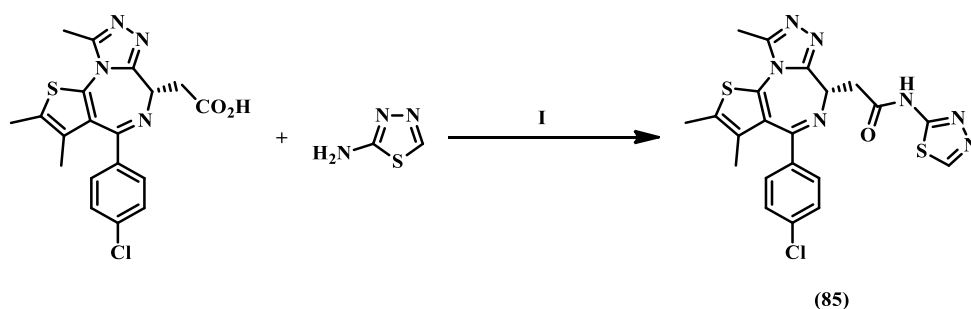
¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,43 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,34 (t, *J* = 8,7 Hz, 3H), 7,28 – 7,24 (m, 2H), 7,16 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,09 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 4,63 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,69 – 3,56 (m, 2H), 3,50 (td, *J* = 13,7, 7,2 Hz, 1H), 3,32 (dd, *J* = 14,4, 6,5 Hz, 1H), 3,00 – 2,93 (m, 2H), 2,61 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 1,65 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 170,71, 164,11, 155,85, 150,08, 136,97, 136,82, 136,65, 132,33, 131,13, 131,04, 130,68, 130,02, 128,90, 127,56, 122,63, 122,17, 119,47, 118,87, 112,95, 111,51, 54,62, 39,90, 39,52, 25,49, 14,58, 13,29, 11,96.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₉H₂₈ClN₆OS⁺ као [M + H]⁺: 543,1728, добијено: 543,1729.

[α]_D^{20,0} (*C* = 0,005 g/mL, *l* = 1 dm, растварач: CHCl₃): +8,4°

Синтеза једињења (85)



Шема 39. Реакциони услови: **I**) ХАТУ, ДИПЕА, ДМФ, СТ, 16 сати, 64%

(**85**): (*S*)-2-(4-(4-Хлорофенил)-2,3,9-триметил-6*H*-тиено[3,2-*f*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*][1,4]дiazепин-6-ил)-*N*-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)ацетамид

Једињење (**85**) синтетисано је према општем поступку за синтезу амида из (+)-JQ1-CO₂H коришћењем ДМФ-а (2 mL), (+)-JQ1-CO₂H (27 mg, 0,0674 mmol), 1,3,4-тиадиазол-2-амина (10 mg, 0,1010 mmol), ХАТУ (51 mg, 0,1347 mmol) и ДИПЕА (60 μL, 0,3368 mmol). Реакциона смеша је разблажена АсОЕт (50 mL) и испрана полузасићеним воденим раствором NaCl (5 × 5 mL). Флеш хроматографијом на колони силика-гела (МФ: ДХМ/Me₂CO = 7/3 → 4/6 (v/v)) добијен је производ (21 mg, 64%) у виду беле, чврсте супстанце.

¹H НМР спектар (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,78 (s, 1H), 7,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,26 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,85 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,29 (dd, *J* = 15,2, 7,7 Hz, 1H), 4,03 (dd, *J* = 15,2, 6,8 Hz, 1H), 2,84 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 1,68 (s, 3H).

¹³C НМР спектар (126 MHz, CDCl₃): δ = 169,81, 164,16, 159,00, 155,16, 150,45, 147,25, 136,77, 136,49, 131,99, 131,03, 131,00, 130,47, 129,85, 128,60, 54,12, 38,64, 14,43, 13,07, 11,78.

HRMS (ESI): *m/z* израчунато за C₂₁H₁₉ClN₇OS₂⁺ као [M + H]⁺: 484,0776, добијено: 484,0779.

$[\alpha]_D^{20,0}$ ($C = 0,005 \text{ g/mL}$, $l = 1 \text{ dm}$, растварач: CHCl_3): $+8,6^\circ$

3.7. TR-FRET тест за HSP90 α

Афинитети синтетисаних PROTAC и НуТ једињења према HSP90 α одређени су применом компетитивног TR-FRET теста. Тест је укључивао HSP90 α , гелданамицин обележен флуоресцеин-изотиоцијанатом и антители обележено тербијумом, све набављено од компаније *BPS Bioscience (San Diego, CA)*. Испитивана једињења су припремљена као раствори у ДМСО-у, а затим преношена у плоче за тестирање у запремини од 100 nL по бунарићу употребом уређаја *Echo 655T (Labcyte; San Jose, CA)*. Укупна запремина теста износила је 20 μL по бунарићу. Експерименти зависности дозе и одговора спроведени су применом серијског разблажења са фактором разблажења 200. Мерења зависности дозе и одговора извршена су уз коришћење корелираних репликата. Након преношења једињења, у сваки бунарић додаване су тест-смеше које су садржале HSP90 α , гелданамицин обележен флуоресцеин-изотиоцијанатом и антители обележено тербијумом. Након инкубације, TR-FRET мерења су обављена употребом читача плоча *PHERASTAR (BMG LABTECH; Durham, NC)*. TR-FRET сигнали су нормализовани на проценат инхибиције за све тачке података. Необележени гелданамицин коришћен је као позитивна контрола, док су бунарићи третирани слепом пробом служили као негативне контроле. Генерисане су криве зависности дозе и одговора и одређене су IC_{50} вредности. У случајевима у којима су резултати при високим концентрацијама показивали неправилно понашање због преципитације једињења, поједине тачке су искључене ради побољшања фитовања криве. Добијене IC_{50} вредности одговарају препорученим вредностима на основу квалитета криве и конзистентности између репликата. Квалитет теста је процењен применом Z' анализе, која је указала на поузданост теста.

3.8. TR-FRET тест за бромодомене ВЕТ протеина

Афинитети синтетисаног PROTAC молекула и амида изведених из (+)-JQ1 према бромодоменима ВЕТ протеина одређени су применом TR-FRET теста. TR-FRET комплети реагенаса за BRD2(BD1), BRD2(BD2), BRD4(BD1) и BRD4(BD2) набављени су од компаније *Sayman Chemical (Ann Arbor, MI)*. Тестови су изведени у складу са протоколом прилагођеним упутствима произвођача. Реагенси су припремани тако да коначна запремина теста износи 26 mL по комплекту за BRD2(BD2) тест и 10 mL по комплекту за BRD4(BD2) тест. Испитивана и контролна једињења припремљена су као раствори у ДМСО-у и пренесена у нисковолуменске, чврсте, црне плоче за тестирање са 384 бунарића помоћу акустичног уређаја за преношење течности *Echo 655T (Labcyte; San Jose, CA)*. За стандардна мерења, у сваки бунарић је пренесено 100 nL раствора једињења. За веома потентна једињења, коришћена је мања запремина преношења од 5 nL по бунарићу. Биолошки реагенси су пренесени у плоче за тестирање у запремини од 20 μL по бунарићу помоћу уређаја за преношење течности *Tempest (Formulatrix; Bedford, MA)*. Плоче су инкубиране на собној температури 1 сат пре мерења сигнала. TR-FRET сигнали су снимани помоћу читача плоча *PHERASTAR (BMG LABTECH; Durham, NC)*. Флуоресцентне емисије на 620 nm и 665 nm мерене су уз употребу ексцитационог филтера на 337 nm, са временом кашњења (енг. *delay time*) од 100 μs и временом интеграције (енг. *integration time*) од 200 μs . TR-FRET однос је израчунат као интензитет емисије на 665 nm подељен интензитетом емисије на 620 nm. ДМСО је коришћен као негативна контрола (0% инхибиције), а (+)-JQ1 као позитивна контрола (100% инхибиције). Подаци зависности дозе и одговора фитовани су у логистичку једначину како би се одредиле IC_{50} вредности.

3.9. Луминесцентни *CellTiter-Glo* тест вијабилности ћелија

Ћелије у експоненцијалној фази раста су засејане у одговарајућем броју по бунарићу у *Corning 8804BC* белој плочи за тестирање са 384 бунарића, а затим инкубиране преко ноћи на 37°C у инкубатору са 5% CO₂ и контролисаном влажношћу. Једињења су пренесена у плочу за тестирање из плоче за праћење дозе и одговора коришћењем игала (енг. *pin-tool*) на *Biomek FX^P* систему за лабораторијску аутоматизацију (*Beckman Coulter; Fullerton, CA*). Цитотоксичност је одређена након 72 сата инкубације применом *CellTiter-Glo* реагенса произвођача *Promega (Madison, WI)* у складу са препоруком произвођача. Луминесценција је мерена на *EnVision* читачу плоча (*PerkinElmer; Waltham, MA*). EC₅₀ вредности су одређене коришћењем софтвера *RISE (Robust Investigation of Screening Experiments)* развијеног интерно на платформи *Pipeline Pilot (BIOVIA, верзија 17.2.0)*.

3.10. Анализа стабилности у плазми

Стабилност једињења у плазми може утицати на њихову *in vivo* ефикасност. Деградација у мишјој или хуманој плазми одређена је у више временских тачака како би се пратила брзина нестајања полазног једињења током инкубације. Примењен је сет времена инкубације од 0, 3, 24 и 48 сати. Припремљени су матични (енг. *stock*) раствори тестираних једињења у ДМСО-у у концентрацији 10 mM и директно додати у хуману или мишју плазму (*GeneTex; Irvine, CA*) тако да коначна концентрација износи 10 μM. Потом су смеше пренете у плоче за 4 временске тачке (свака у три понављања по бунарићу). У плочу за 0 сати инкубације у сваки бунарић додат је хладан АЦН који садржи 40 ng/mL варфарина као интерни стандард, и инкубација није била потребна. Преостале плоче су инкубиране на 37°C током потребног периода, након чега је процес заустављен додавањем у сваки бунарић хладног АЦН-а који садржи 40 ng/mL варфарина као интерни стандард, на исти начин као и за плочу за 0 сати инкубације. Све плоче су затим запечаћене и мешане на 600 rpm током 10 мин., а потом центрифугиране на 4000 rpm током 20 мин. Супернатанти су пренети у аналитичке плоче (*Corning; Acton, MA*) и адекватно разблажени *Milli-Q* водом ради анализе UPLC-MS/MS методом (*Waters Corporation; Milford, MA*). Стабилност у плазми процењена је путем полувремена (*t*_{1/2}) добијеног фитовањем више временских тачака методом најмањих квадрата, пратећи кинетику првог реда [404].

3.11. Анализа стабилности у физиолошком пуферу са фосфатима

Стабилност једињења у Дулбековом физиолошком раствору пуферованом фосфатима (енг. *Phosphate-Buffered Saline, PBS*) (*Invitrogen; Carlsbad, CA*), pH = 7,4, одређена је на исти начин као што је описано за анализу стабилности у плазми, осим што је примењен другачији сет времена инкубације од 0, 1, 3, 6, 24 и 48 сати.

3.12. Тест растворљивости

Овај тест је изведен на радној станици *Biomek FX-ADMETox* (*Beckman Coulter; Fullerton, CA*) ради мерења растворљивости једињења у условима који имитирају средину биолошке течности. У сваки бунарић матичне (енг. *stock*) плоче је нането по 30 μL раствора једињења концентрације 10 mM у ДМСО-у. За референтну плочу, једињења су разблажена 600 пута у смеси PBS-а и 1-пропанола (1:1, v/v). Концентрације су одређене УВ спектроскопијом (230-500 nm). За плочу за испитивање, једињења су разблажена 100 пута у раствору пуфера, инкубирана на собној температури током 18 сати како би се омогућила њихова потпуна стабилизација, а затим је обављена филтрација кроз филтер-плочу са 96 бунарића (*Pion; Woburn, MA*). Фракције су сакупљене након филтрације, разблажене једноструко 1-пропанолом, и концентрације су одређене УВ спектроскопијом. Одређивање растворљивости

у води извршено је софтвером *μSOL Evolution*, а сва једињења су тестирана у трипликату. Добијене вредности представљају кинетичку (привидну) растворљивост [405].

3.13. PAMPA тест

PAMPA (енг. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) тест је коришћен за анализу пермеабилности различитих једињења кроз хомогену вештачку липидну мембрану применом протокола *Double-Sink PAMPA* на радној станици *Biomek FX-ADMETox* (*Beckman Coulter; Fullerton, CA*). У сваки бунарић матичне плоче је нането по 6 μL раствора једињења концентрације 10 mM у ДМСО-у. Једињења су разблажена 200 пута у PBS-у и 180 μL разблаженог раствора додато је у донорску плочу (*Pion; Woburn, MA*). Након што је акцепторска плоча (*Pion; Woburn, MA*) која садржи 200 μL акцепторског „sink“ пуфера, pH = 7,4 (*Pion; Woburn, MA*) третирана вештачким липидом, постављена је преко донорске плоче. Плоче су инкубирани на собној температури током 0,5 сати, уз мешање магнетом у сваком појединачном бунарићу, како би се омогућило да једињења пређу преко мембране. Фракције су прикупљене и са донорске и са акцепторске плоче, а концентрације су одређене УВ спектроскопијом (230-500 nm). Припрема и анализа узорака, као и обрада података били су у потпуности аутоматизовани применом радне станице *Biomek FX-ADMETox* (*Beckman Coulter; Fullerton, CA*) и софтвера *PAMPA Evolution 96 Command Software*. Сва једињења су тестирана у трипликату [406].

3.14. Тест пермеабилности на Сасо-2 ћелијама

Тест пермеабилности на Сасо-2 ћелијама изведен је у *Transwell* систему са 96 бунарића применом модификоване методе. Сасо-2 ћелије су одржаване на 37°C у инкубатору са 5% CO₂ и контролисаном влажношћу. Ћелије су култивисане у минималном есенцијалном медијуму (енг. *Minimum Essential Medium*, MEM) који садржи 10% феталног говеђег серума (енг. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 100 U/mL пеницилина и 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ стрептомицина, у тиквицама (енг. *flasks*) површине 75 cm². Сасо-2 ћелије су засејане на уметке плоче са 96 бунарића при густини од $0,165 \times 10^5$ ћелија/уметку и култивисане у MEM-у који садржи 10% FBS-а током 7 дана. Сваки култивисани монослој на плочи са 96 бунарића испран је два пута смешом Хенксовог избалансираног физиолошког раствора (енг. *Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS) и HEPES-а (4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонска киселина) (10 mM, pH = 7,4). Тест пермеабилности је започет додавањем раствора сваког једињења (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) у уметке (апикална страна – одељак A) или у пријемне делове (базолатерална страна – одељак B). Монослојеви Сасо-2 ћелија су инкубирани 2 сата на 37°C. Фракције су сакупљене из оба одељка, а концентрације су одређене UPLC-MS методом (*Waters Corporation; Milford, MA*). Сва једињења су тестирана у трипликату [407].

Привидни коефицијенти пермеабилности (P_{app}) у апикално-базолатералном смеру (A-B) или базолатерално-апикалном смеру (B-A) израчунати су помоћу следеће једначине:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

$\frac{dQ}{dt}$ – флуks једињења кроз монослој [$\mu\text{mol}/\text{s}$]

A – укупна површина уметка бунарића [cm²]

C_0 – почетна концентрација једињења на апикалној страни [$\mu\text{mol}/\text{L}$]

Коефицијент ефлуksа (енг. *efflux ratio*) израчунат је помоћу следеће једначине:

$$ER = \frac{P_{app} B-A}{P_{app} A-B}$$

$ER > 2$ указује на то да долази до ефлукса тестиране супстанце.

3.15. Испитивање везивања за протеине плазме

Испитивањем везивања за протеине плазме одређен је проценат слободног једињења у плазми и проценат једињења везаног за протеине плазме применом RED (енг. *Rapid Equilibrium Dialysis*) плоче за једнократну употребу (*Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL*). Овим је омогућено да водена компонента плазме која садржи слободно једињење прође кроз дијализну мембрану чија је граница пропустљивости (енг. *Molecular Weight Cut-Off, MWCO*) око 8000 Da. Раствори једињења су припремљени у концентрацији 10 mM у ДМСО-у. Тефлонска основна плоча са RED уметцима коришћена је без икаквог претходног кондиционирања мембранских уметака. Плазма (*GeneTex; Irvine, CA*) је одмрзнута и центрифугирана на 2000 rpm током 5 мин. ради уклањања евентуалних честица. Свако једињење је припремљено у концентрацији 10 μ M у хуманој плазми. Раствори плазме са додатим једињењем (300 μ L) унесени су у комору за узорак (означену црвеним прстеном), а 500 μ L Дулбековог PBS-а, pH = 7,4 (*Invitrogen; Carlsbad, CA*), унесено је у суседну комору. Плоча је запечаћена и инкубирана на 37°C на орбиталном шејкеру (100 rpm) током 4 сата. Након инкубације, заптивка је уклоњена са RED плоче. Аликвоти (50 μ L) су узети са обе стране уметка и пренети у дубоку плочу са 96 бунарића. Једнака запремина нетретиране (енг. *blank*) плазме или Дулбековог PBS-а додата је у одговарајуће бунариће ради формирања аналитички идентичних матрикса узорака (уједначавање матрикса) након чега је процес заустављен додавањем троструке запремине хладног АЦН-а који садржи 40 ng/mL варфарина као унутрашњи стандард. Све плоче су затим запечаћене и мешане на 600 rpm током 10 мин., а потом центрифугиране на 4000 rpm током 20 мин. Супернатанти су пренети у аналитичке плоче (*Corning; Acton, MA*) и адекватно разблажени *Milli-Q* водом ради анализе UPLC-MS/MS методом (*Waters Corporation; Milford, MA*). Концентрације тестираних једињења су квантификоване у комори са пуфером и у комори са плазмом на основу површина пикова у односу на унутрашњи стандард [408]. Проенти слободних и везаних фракција једињења израчунати су применом следећих једначина:

$$\text{Слободна фракција} = \frac{C_{\text{комора са пуфером}}}{C_{\text{комора са плазмом}}} \cdot 100\%$$

$$\text{Везана фракција} = 100\% - \text{Слободна фракција}$$

3.16. Тест стабилности у микрозомима јетре

Овај тест пружа важне информације о метаболичкој стабилности једињења током процеса откривања лекова. Деградација у микрозомима јетре миша или човека одређена је коришћењем више временских тачака ради праћења брзине нестанка полазног једињења. Примењен је сет времена инкубације од 0, 15, 30, 60, 120 и 240 мин. Матични раствори испитиваних једињења и верапамила (системска контрола) у ДМСО-у припремљени су у концентрацији 10 mM. Концентровани микрозоми јетре човека (*XenoTech; Lenexa, KS*) или концентровани микрозоми јетре миша CD-1 (*BD Gentest; Woburn, MA*) (концентрација протеина 20 mg/mL) и 0,5 M EDTA разблажени су у 0,1 M калијум-фосфатном пуферу, pH = 7,4, и измешани, након чега су додати раствори једињења. Овај раствор је измешан и по 90 μ L је пренето у плоче за 6 временских тачака (*MIDSCI; St. Louis, MO*) (свака у три понављања по бунарићу). У плочу за 0 мин. инкубације у сваки бунарић је додата трострука запремина хладног АЦН-а који садржи 40 ng/mL варфарина као унутрашњи стандард, након чега је додат реагенс за регенерацију

NADPH који је добијен мешањем раствора *A* и *B* реагенса за регенерацију NADPH (*BD Gentest; Woburn, MA*) у PBS-у, pH = 7,4, без инкубације. У сваки бунарић преосталих плоча је додат реагенс за регенерацију NADPH ради иницирања реакције, плоче су инкубирани на 37°C током потребног периода, након чега је процес заустављен додавањем троструке запремине хладног АЦН-а који садржи 40 ng/mL варфарина као унутрашњи стандард. Коначне концентрације компоненти примењених у овој реакцији биле су следеће: протеини микросома јетре – 0,5 mg/mL, EDTA – 1 mM, једињења – 10 µM, NADPH *A* – 1,3 mM, NADPH *B* – 0,4 U/mL. Све плоче су затим запечаћене и мешане на 600 rpm током 10 мин., а потом центрифугиране на 4000 rpm током 20 мин. Супернатанти су пренети у аналитичке плоче (*Corning; Acton, MA*) и адекватно разблажени *Milli-Q* водом ради анализе UPLC-MS/MS методом (*Waters Corporation; Milford, MA*). Метаболичка стабилност процењена је путем полувремена ($t_{1/2}$) добијеног фитовањем више временских тачака методом најмањих квадрата, пратећи кинетику првог реда [409,410].

3.17. Фармакокинетичко профилисање у *in silico* условима

Фармакокинетичко профилисање обављено је коришћењем платформе *ADMETlab 2.0*, а добијени резултати су затим коришћени за поређење са *in vitro* подацима за иста једињења. *ADMETlab 2.0* врши фармакокинетичке предикције применом модела квантитативног односа структуре и активности (енг. *Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR*) изграђених на основу 288967 [411,412] једињења, и примењује шест алгоритамоделовања [411]. Платформа садржи модуле који обухватају 17 физичко-хемијских својстава, 13 својства релевантна за медицинску хемију, 23 фармакокинетичка својства, 27 токсиколошких крајњих тачака и 8 правила токсикофора (751 подструктура) [413].

Хемијске структуре испитиваних једињења су нацртане у програму *ChemDraw Ultra 12.0*, а SMILES (енг. *Simplified Molecular Input Line Entry System*) низови су коришћени као улазни фајлови. Добијени резултати платформе *ADMETlab 2.0* преузети су у виду .csv датотека ради анализе.

Ради разликовања скупова података добијених компјутерски и експериментално, резултати добијени компјутерским предикцијама (*in silico*) означени су натписом „IS“, док су експериментално добијени резултати (*in vitro*) означени натписом „IV“, осим у табелама у којима је груписање експлицитно приказано.

За *in silico* процену параметара повезаних са апсорпцијом, *ADMETlab 2.0* је коришћен за предикцију седам параметара: $HIA\ prob.^{IS}$, $F(20\%)^{IS}$, $F(30\%)^{IS}$, $Caco-2\ perm.^{IS}$, $MDCCK\ perm.^{IS}$, $P-gp\ sub.^{IS}$ и $P-gp\ inh.^{IS}$. За *in silico* процену параметара повезаних са дистрибуцијом, *ADMETlab 2.0* је коришћен за предикцију вероватноће проласка кроз крвно-мождану баријеру ($BBB\ pen.^{IS}$), везивања за протеине плазме (PPB^{IS}), волумена дистрибуције (V_d^{IS}) и слободне фракције (F_u^{IS}). За *in silico* процену параметара повезаних са метаболизмом и екскрецијом, *ADMETlab 2.0* је коришћен за предикцију вероватноћа да једињења буду супстрати и/или инхибитори ензима CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4. Додатно, резултат платформе *ADMETlab 2.0* обухватао је и клиренс (CL^{IS}), као и процену вероватноће да полувреме елиминације премашује 3 сата ($t_{1/2}\ prob.^{IS}$). Пошто *ADMETlab 2.0* не предвиђа полувреме елиминације, већ процењује вероватноћу да једињење има полувреме елиминације дуже од 3 сата, израчунате вредности полувремена елиминације ($t_{1/2}\ calc.^{IS}$) добијене су применом следеће једначине:

$$t_{1/2}\ calc.^{IS} = \frac{0,693 \times V_d}{CL}$$

Осим платформе *ADMETlab 2.0*, програм *MarvinSketch 4.1.13* је коришћен за предикцију степена јонизације и log*D* вредности.

Статистичка анализа је спроведена у програму *IBM SPSS Statistics 28.0*. Повезаност између резултата платформе *ADMETlab 2.0* и експерименталних података процењена је применом биваријантне Спирманове корелације, уз приказ Спирманових коефицијената корелације рангова (ρ) и p вредности. Јачина корелације тумачена је према следећим критеријумима: $\rho \geq 0,700$ – јака корелација, $0,400 \leq \rho < 0,700$ – умерена корелација и $\rho < 0,400$ – слаба корелација [414]. Поређења *in silico* у односу на *in vitro* резултате такође су процењена Вилкоксиновим тестом означених рангова (енг. *Wilcoxon signed-rank test*), при чему су резултати визуализовани помоћу *box-and-whisker* дијаграма. Фармакокинетички параметри су сумирани коришћењем медијана и интерквartilних распона (*IQR*).

3.18. Фармакокинетичко профилисање једињења (85) у *in vivo* условима

Фармакокинетичко профилисање једињења (85) у *in vivo* условима спроведено је као уговорена студија од стране компаније *Sai Life Sciences* (Хајдерабад, Индија), на основу уговора закљученог између ове компаније и *St. Jude Children's Research Hospital*. У студији „SAIDMPK/ПК-22-07-0639“ је једињење (85) вођено под ознаком „МК-885-2“, а оригинални извештај о фармакокинетичком профилисању приложен је у Одељку 7.2.

Студија је имала за циљ одређивање фармакокинетичких параметара једињења (85) након његове једнократне интравенске примене у дози од 1 mg/kg и једнократне оралне примене у дозама од 3 и 10 mg/kg код мишева. У студији је коришћено укупно 27 здравих женки CD-1 мишева, распоређених у три групе према дизајну са ретким узорковањем (енг. *Sparse Sampling Design*), односно са по три животиње по временској тачки. Једној групи је једињење примењено интравенски као спори болус кроз репну вену у дози од 1 mg/kg, док је у преостале две групе једињење примењено орално у дозама од 3 и 10 mg/kg. Формулације су припремане свеже пре примене, у вехикулуму који је садржао 5% (v/v) *N*-метил-2-пирилолдона, 5% (v/v) *Solutol HS-15* и 90% (v/v) физиолошког раствора. Узорци крви су сакупљани под лакој анестезијом изофлураном из ретро-орбиталног плексуса. Након интравенске примене, узорковање је спроведено у временским тачкама 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 сата, док је након оралне примене узорковање спроведено у временским тачкама 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 сата. Плазма је издвајана центрифугирањем, а узорци су чувани на $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ до анализе. Концентрације једињења (85) у плазми миша одређене су LC-MS/MS методом након припреме узорака методом таложења протеина. Фармакокинетички параметри су израчунати применом непросторне анализе у програму *Phoenix WinNonlin* (верзија 8.3). Одређени су максимална концентрација у плазми (C_{max}) и време у којем се C_{max} постиже (t_{max}). Површине испод кривих концентрација-време (*AUC*) израчунате су применом линеарног правила трапеза. Константа терминалне брзине елиминације (k_{el}) израчуната је регресионом анализом линеарног дела криве концентрација-време (log-линеарна скала) након IV примене, и потом је коришћена за израчунавање полувремена елиминације ($t_{1/2el}$) применом следеће једначине:

$$t_{1/2el} = \frac{0,693}{k_{el}}$$

Плазматски клиренс (*CL*) израчунат је применом следеће једначине:

$$CL = \frac{D}{AUC_{IV}}$$

D – доза

Волумен дистрибуције у стању равнотеже (V_{ss}) израчунат је применом следеће једначине:

$$V_{SS} = CL \cdot MRT$$

MRT – средње време задржавања

Орална биорасположивост (*F*) израчуната је применом следеће једначине:

$$F = \frac{AUC_{PO}}{AUC_{IV}} \cdot \frac{D_{IV}}{D_{PO}} \cdot 100\%$$

Детаљан опис експерименталног поступка, припреме формулација, аналитичке методе и обраде података дат је у оригиналном извештају студије који се налази у Одељку 7.2.

3.19. Процена селективности једињења (85) према ВЕТ протеинима користећи „BROMOscan“ методу

Сојеви Т7 фага који експримирају бромодомене гајени су паралелно у блоковима са 24 бунарића у *E. coli* као домаћину изведеном из соја BL21. *E. coli* је гајена до log-фазе, инфицирана Т7 фагом из замрзнуте залихе (мултиплицитет инфекције = 0,4) и инкубирана уз мућкање на 32°C до лизе (90-150 мин.). Лизати су центрифугирани на 5000 × g и профилирани (0,2 μm) ради уклањања ћелијског дебриса. Магнетни носачи обложени стрептавидином третирани су биотинилованим малим молекулом или ацетилованим пептидним лигандима током 30 мин. на собној температури како би се добиле афинитетне смоле за тестове са бромодоменима. Носачи са имобилисаним лигандом блокирани су вишком биотина и испрани блокирајућим пуфером (*SeaBlock* (Pierce), 1% говеђег серумског албумина (енг. *Bovine Serum Albumin*, BSA), 0,05% *Tween 20*, 1 mM дитиотреитол) ради уклањања невезаног лиганда и смањења неспецифичног везивања фага. Реакције везивања омогућене су мешањем бромодомена, афинитетних носача са имобилисаним лигандом и тестираних једињења у 1× везивном пуферу (17% *SeaBlock* (Pierce), 0,33× PBS, 0,04% *Tween 20*, 0,02% BSA, 0,004% NaN₃, 7,4 mM дитиотреитол). Тестирана једињења су припремљена као 1000× матични раствори у ДМСО-у. Вредности *K_D* одређене су коришћењем серије од 11 концентрационих тачака добијених троструким узастопним разблаживањем једињења, уз једну контролну тачку са ДМСО-ом. Сви раствори једињења за мерење *K_D* су пренесени акустичним трансфером (бесконтактно преношење). Једињења су затим директно разблажена у тестовима тако да је коначна концентрација ДМСО-а износила 0,09%. Све реакције су извођене у полипропиленским плочама са 384 бунарића и свака је имала коначну запремину од 0,02 mL. Тест-плоче су инкубирани на собној температури уз мућкање током 1 сата, а афинитетни носачи су испрани пуфером за прање (1× PBS, 0,05% *Tween 20*). Носачи су затим ресуспендовани у елуционом пуферу (1× PBS, 0,05% *Tween 20*, 2 μM небиотинилованог афинитетног лиганда) и инкубирани на собној температури уз мућкање током 30 мин. Концентрација бромодомена у елуатима измерена је qPCR методом.

Вредности *K_D* израчунате су применом стандардне доза-одговор криве коришћењем Хилове једначине:

$$\text{Одговор} = \text{Позадина} + \frac{\text{Сигнал} - \text{Позадина}}{1 + \frac{K_D^{\text{Хилов нагиб}}}{D^{\text{Хилов нагиб}}}}$$

Вредност Хиловог нагиба је подешена на -1. Криве су фитоване применом нелинеарне методе најмањих квадрата са Левенберг-Маркуартовим алгоритмом.

3.20. Процена утицаја једињења (85) на ниво с-Мус *Western blot* анализом

Ћелије MV4-11 су засејане у плоче са 6 бунарића (3×10^6 ћелија по бунарићу) и, након инкубације преко ноћи, третиране одређеним концентрацијама једињења. Након 6 сати третмана, ћелије су сакупљене центрифугирањем на $2000 \times g$ током 10 мин., испране хладним PBS-ом и лизирани пуфером за радиоимунопреципитациони тест (енг. *radioimmunoprecipitation assay buffer*, RIPA) који је садржао коктел инхибитора протеаза. Припремљени узорци су раздвојени SDS-PAGE методом на 4-12% Bis-Tris геловима и затим пренети на нитроцелулозну мембрану. Након блокирања мембране *Intercept TBS* пуфером за блокирање (*LICORbio; Lincoln, NE*) и инкубације са примарним антителима преко ноћи, одговарајући протеински сигнали су детектовани коришћењем *IRDye* секундарних антитела и *Odyssey* система. Квантификација јачина трака је извршена помоћу софтвера *Image Studio Lite* (верзија 5.2). Зечја анти-с-Мус моноклонска антитела (1:1000) (*Cell Signaling Technology; Danvers, MA*) и мишја анти-GAPDH моноклонска антитела (1:4000) (*Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX*) су коришћена као примарна антитела, док су *IRDye 800CW* козји анти-мишји IgG (*LICORbio; Lincoln, NE*) и *IRDye 680RD* козји анти-зечји IgG (*LICORbio; Lincoln, NE*) коришћени као секундарна антитела.

3.21. Кристалографска анализа једињења (79) и (85)

Плазмид pNIC28-Bsa4 за експресију протеина BRD4(BD1) био је поклон лабораторије Штефана Кнапа. Протеин је експримиран и пречишћен као што је претходно описано [415]. Ко-кристали су добијени инкубацијом 300 μ M протеина са 10 mM лиганда солубилизованог у протеинском пуферу и 5% ДМСО-у, уз инкубацију на собној температури током 2 сата. Кристализација је изведена на 16°C применом методе дифузије паре у систему седеће капљице (енг. *sitting drop vapor diffusion*). Кристали су настали у смеси 0,1 M Bis-Tris пуфера, pH = 6,8, 20% ПЕГ-3350 и 15% етилен-гликола након 2-3 дана. Затим су нагло охлађени на криогеној температури у матичној течности, а подаци рендгенске дифракције прикупљени су на зрачној линији 22-ID помоћу *Advanced Photon Source* у *Argonne National Laboratory*, коришћењем детектора *EIGER2 X 16M (DECTRIS; Philadelphia, PA)*. Подаци су обрађени и редуковани применом програма *XDS* [416] или *HKL-2000* [417]. Почетне фазе су процењене молекулском заменом применом програма *Phaser* [418], уз коришћење координата структуре 3MXF [362]. Структуре су рафинисане програмима *Phenix* [419] и *Coot* [420]. Координате и структурни фактори депоновани су у бази *Protein Data Bank* под кодом „7RN2“ за комплекс BRD4(BD1)-једињење (79) и „7RMD“ за комплекс BRD4(BD1)-једињење (85). Визуализације протеина и предвиђања поларних интеракција генерисани су у програму *PyMOL (Schrödinger)*. Статистика прикупљања кристалографских података и рафинације приказана је у Табели 12.

Табела 12. Статистика прикупљања кристалографских података и рафинације*

	Једињење (79)	Једињење (85)
Прикупљање података		
PDB код	7RN2	7RMD
Таласна дужина [Å]	0,8	1,0
Опсег резолуције [Å]	29,45-1,05 (1,088-1,05)	39,12-1,18 (1,222-1,18)
Просторна група	P 21 21 21	P 21 21 21
Димензије јединичне ћелије:		
a, b, c [Å]	36,477, 44,626, 78,416	36,634, 44,740, 78,236
α , β , γ [°]	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Укупно рефлексја	654644 (65114)	431885 (24571)
Јединствене рефлексје	60471 (5950)	42281 (3600)
Мултиплицитет	10,8 (10,9)	10,2 (6,8)
Комплетност [%]	99,88 (99,92)	98,15 (85,30)
Средња вредност I/ σ (I)	11,35 (2,86)	22,09 (6,35)
Вилсонов B-фактор	14,17	12,26
<i>R</i> _{merge}	0,09056 (1,147)	0,05724 (0,3614)
<i>R</i> _{meas}	0,09503 (1,201)	0,0603 (0,391)
<i>R</i> _{pin}	0,02829 (0,3534)	0,01861 (0,1438)
<i>CC</i> _{1/2}	0,998 (0,909)	0,999 (0,948)
<i>CC</i> [*]	0,999 (0,976)	1 (0,987)
Статистика рафинације		
Рефлексје коришћене у рафинацији	60468 (5950)	42274 (3599)
Рефлексје коришћене за <i>R</i> _{free}	3044 (305)	2103 (197)
<i>R</i> _{work}	0,1645 (0,2666)	0,1532 (0,1980)
<i>R</i> _{free}	0,1849 (0,2589)	0,1728 (0,2237)
<i>CC</i> _{work}	0,963 (0,704)	0,967 (0,741)
<i>CC</i> _{free}	0,961 (0,740)	0,958 (0,693)
Број неводоничних атома:	1482	1412
макромолекул	1249	1180
лиганд	38	36
растварач	195	196
Остаци протеина	127	127
<i>RMS</i> _{везе} [Å]	0,009	0,017
<i>RMS</i> _{углови} [°]	1,11	1,35
Рамачандран: фаворизовано [%]	99,20	99,20
Рамачандран: дозвољено [%]	0,80	0,80
Рамачандран: одступајуће вредности [%]	0,00	0,00
Ротамерске одступајуће вредности [%]	1,40	1,45
Скор стерних судара	4,28	3,69
Просечни B-фактор [Å ²]:	18,76	16,90
макромолекул	16,96	15,23
лиганд	18,80	14,85
растварач	30,34	27,32
Број TLS група	1	1

*Вредности у заградама односе се на љуску највише резолуције.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. PROTAC молекули усмерени на HSP90

Процес развоја PROTAC молекула усмерених на HSP90 осмишљен је као приступ вођен кристалографским подацима са циљем да се валидирани инхибитори HSP90 преведу у бифункционалне деградере, уз очување детерминанти везивања полазних лиганата. Три хемијски различите класе инхибитора HSP90 су одабране, зато што је свака од њих имала потврђену активност према HSP90 и одређена места за дериватизацију за која се, на основу кристалографских података, проценило да су компатибилна са увођењем линкера. Коришћени су следећи скелети инхибитора HSP90: пироло[2,3-*d*]пиримидински скелет представљен једињењем EC144 (Слика 45), тиено[2,3-*d*]пиримидински скелет представљен једињењем NVP-VEP800 (Слика 48) и скелет 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола представљен једињењем SNX-2112 (Слика 51). У оквиру деривата тетрахидроиндазола укључен је и аналог бензонитрила као варијанта одабрана на основу физичко-хемијских својстава, пошто се очекивало да ће замена бензамида мање поларним нитрилом побољшати дескрипторе повезане са транспортом, иако је та модификација истовремено носила и ризик од слабљења мреже интеракција са HSP90. Сходно томе, централни принцип дизајна било је искоришћавање места изложених растварачу за припајање линкера на већ оптимизованим лигандима ради конструисања PROTAC молекула.

Након што су одабрани лиганди за HSP90, серија PROTAC молекула који регрутују CRBN је развијана кроз модуларни и емпиријски процес варирања линкера. Пошто није постојало опште правило које би могло да предвиди који ће линкер најбоље подржати деловање PROTAC молекула за дати лиганд за HSP90, дужина, састав, место припајања и оријентација линкера варијани су у оквиру све три класе скелета. Овај принцип дизајна одражен је и у синтетичкој стратегији. PROTAC молекули базирани на пироло[2,3-*d*]пиримидину синтетисани су у касним фазама Соногашириним купловањем фрагмената који се завршавају алкином, а који обухватају лиганд за CRBN и линкер, са лигандом за HSP90 који садржи арил-јодид (Шеме 1-2). PROTAC молекули базирани на тиено[2,3-*d*]пиримидину користили су или „северно“ (фенол на позицији 5') или „јужно“ (тиофен-6-карбоксилат) место припајања линкера, а њихова синтеза је обављена формирањем амидне везе (Шеме 5-7) или азид-алкинском „клик“ реакцијом (Шеме 3-4 и Шеме 8-10). PROTAC молекули базирани на 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазолу синтетисани су увођењем линкера који садрже заштићени амин реакцијом са арил-флуоридом, након чега је извршена депротекција и припајање фрагмента који регрутује CRBN у касној фази синтеза (Шеме 11-15), док је конверзија нитрила у бензамид омогућила добијање блиско сродних варијанти лиганата у оквиру исте опште синтетичке путање (Шеме 16-18). Дакле, коришћена су четири лиганда за HSP90 за синтезу осамнаест PROTAC молекула који регрутују CRBN, а сви су евалуирани помоћу TR-FRET теста којим је испитано везивање за HSP90 (резултати су изражени кроз IC_{50}), 72-сатног CTG теста којим је процењена антипролиферативна активност у ћелијама MV4-11 (резултати су изражени кроз EC_{50}), експериментално одређене водене растворљивости и Сасо-2 пермеабилности, као и дескриптора израчунатих у софтверу *SwissADME*. Дакле, ови подаци омогућавају да се испита како избор лиганда за ПОИ, место припајања линкера, архитектура линкера и физичко-хемијска својства утичу на серију PROTAC молекула усмерених на HSP90.

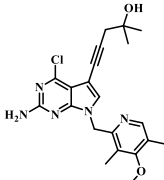
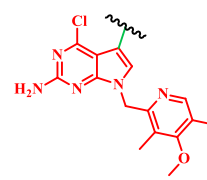
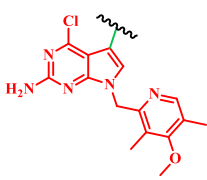
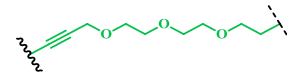
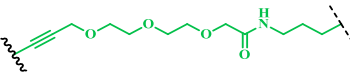
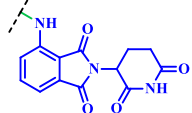
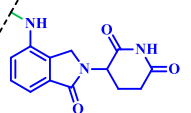
4.1.1. PROTAC молекули засновани на скелету пиролопиримидина

Серију PROTAC молекула заснованих на пиролопиримидину чинила су једињења (3) и (7), при чему је EC144 служио као референтни инхибитор HSP90 (Табела 13). Ова класа PROTAC молекула је показала добро везивање за HSP90 које је било на нивоу полазног инхибитора. Једињење EC144 се везивало за HSP90 при IC_{50} вредности од 0,0116 μM , док су једињења (3) и (7) имала вредности од 0,023 и 0,016 μM . Стога је, упркос повећању моларне масе (M) са 413,90 g/mol за EC144 на 759,21 и 816,30 g/mol за поменуте PROTAC молекуле, бинарна интеракција са HSP90 остала у великој мери очувана.

Исти тренд се одразио и у CTG тесту. MV4-11 је ћелијска линија АМЛ-а и одабрана је као модел за процену цитотоксичног ефекта PROTAC молекула будући да MV4-11 ћелије носе мутирани FLT3 протеин и представљају успостављен модел сигнализације у АМЛ-у посредоване овим протеином [421]. Пошто функција мутираног FLT3 протеина зависи од HSP90 [422], очекује се да нарушавање функције HSP90 утиче на путеве преживљавања у MV4-11 ћелијској линији. Стога, деградација или инхибиција HSP90 у овој ћелијској линији може се поуздано одразити на смањење вијабилности ћелија у CTG тесту. У MV4-11 ћелијама, једињења (3) и (7) испољила су EC_{50} вредности од 0,013 и 0,0295 μM , док је сам референтни инхибитор EC144 показао EC_{50} од 0,0029 μM . Умерени губитак потентности у ћелијама у односу на полазни инхибитор није неочекиван с обзиром на изражено повећање величине молекула, њихове поларности и флексибилности. Још је значајније да је тај губитак остао ограничен, што указује да је овакав спој лиганда за HSP90 и места припајања линкера добро толерисао увођење линкера и лиганда за E3 лигазу. Практично гледано, пиролопиримидински скелет представљао је добру полазну основу за дизајн PROTAC молекула усмерених на HSP90.

Овакав закључак је потребно истаћи јер пратеће физичко-хемијске особине, посматране изоловано, нису повољне. И једињење (3) и једињење (7) налазе се дубоко у bRo5 простору, свако са по два одступања од Липинскијевих и по два одступања од Веберових критеријума, високом тополошком поларном површином ($TPSA$) (202,12 и 214,15 \AA^2) и релативно високим бројем ротирајућих веза ($NRotB$) (15, односно 19). Њихове P_{app} A-B вредности су такође скромне (11,81 и 6,84 nm/s), а одговарајући коефицијенти ефлукса су релативно високи (4,26 и 4,96). Ипак, њихова активност у ћелијама остала је изузетна. Дакле, у овој серији ни ниска пасивна пермеабилност ни висок ефлукс нису били довољни да значајно утичу на активност у ћелијама. То указује да је афинитет према HSP90 био очуван у тој мери да су несавршене особине везане за транспорт ипак могле бити превазиђене у датом ћелијском контексту.

Табела 13. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства инхибитора EC144 изведеног из пиролопиримидина и PROTAC молекула (3) и (7) усмерених на HSP90

Једињење	EC144	(3)	(7)
Структура лиганда за HSP90			
Структура линкера	/		
Структура лиганда за E3 лигазу	/		
$IC_{50} \pm SD$ [μM]	0,0116 \pm 0,0001	0,0230 \pm 0,0015	0,0160 \pm 0,0008
$EC_{50} \pm SD$ [μM]	0,0029 \pm 0	0,0130 \pm 0,0012	0,0295 \pm 0,0027
$S \pm SD$ [$\mu\text{g/mL}$]	2,30 \pm 0,20	3,80 \pm 0,17	6,00 \pm 0,20
$S \pm SD$ [μM]	5,56 \pm 0,50	5,00 \pm 0,22	7,30 \pm 0,20
P_{app} A-B \pm SD [nm/s]	236,66 \pm 7,32	11,81 \pm 4,99	6,84 \pm 8,89
P_{app} B-A \pm SD [nm/s]	143,18 \pm 19,07	50,24 \pm 8,93	33,95 \pm 11,22
ER	0,60	4,26	4,96
M [g/mol]	413,90	759,21	816,30
TPSA [\AA^2]	99,08	202,12	214,15
NRotB	4	15	19

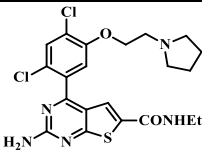
S – растворљивост; SD – стандардна девијација

Поређење једињења (3) и (7) указује да присуство леналидомида уместо помалидомида и модификација терминалног сегмента линкера нису били неповољни. Једињење (7) се везивало нешто јаче од једињења (3), док је једињење (3) било умерено потентније у СТГ тесту. Пошто су ове разлике мале, расположиви подаци не указују на супериорност ни помалидомида ни леналидомида посматрајући скелет пиролопиримидина. Стога, оба избора су прихватљива. Рад који су објавили Liu и сар. независно поткрепљује погодност ове класе скелета за даљи развој, јер је показано да пиролопиримидински PROTAC молекули изведени из ВПВ021 деградирају HSP90 у ћелијама карцинома дојке [339]. Сходно томе, уочено очување снажног везивања у потпуности је у складу са претходним литературним подацима о понашању пиролопиримидинских PROTAC молекула усмерених на HSP90.

4.1.2. PROTAC молекули засновани на скелету тиенопиримидина

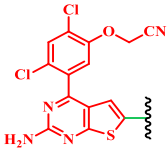
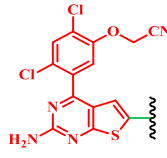
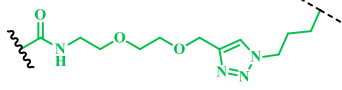
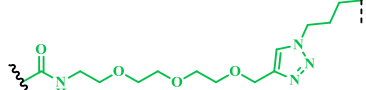
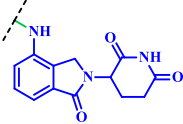
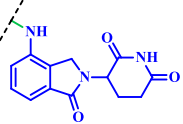
Деривати тиенопиримидина су структурно најразноврснији јер се овде користе оба дефинисана места припајања линкера – „северно“ и „јужно“. Молекул NVP-BEP800 (Табела 14), полазни инхибитор, везивао се за HSP90 при IC_{50} вредности од 0,034 μ M и показао EC_{50} вредност од 0,0396 μ M. Посматрајући кристалографску структуру овог референтног молекула (Слика 48) јасно је да препознавање HSP90 од стране PROTAC молекула може остати очувано кроз више стратегија конјугације линкера.

Табела 14. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства инхибитора NVP-BEP800 изведеног из тиенопиримидина

Структура	
$IC_{50} \pm SD$ [μ M]	0,0340 \pm 0,0017
$EC_{50} \pm SD$ [μ M]	0,0396 \pm 0,0025
$S \pm SD$ [μ g/mL]	0,40 \pm 0
$S \pm SD$ [μ M]	0,83 \pm 0,10
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	98,15 \pm 21,77
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	119,41 \pm 36,39
ER	1,22
M [g/mol]	480,41
$TPSA$ [\AA^2]	121,61
$NRotB$	8

Први пар, једињења (13) и (17) (Табела 15), носи на фенолу супституент $-\text{OCH}_2\text{CN}$, а преко тиофена су амидно повезани триазол/ПЕГ линкери на чијим је крајевима леналидомид. Оба једињења су задржала везивање за HSP90, са IC_{50} вредностима од 0,2107, односно 0,2304 μ M. Међутим, оба су показала слабу активност у СТГ тесту, са EC_{50} вредностима од 5,2603 и 5,8771 μ M. Дужи линкер код једињења (17) у односу на једињење (13) није побољшао ни везивање за HSP90 ни перформансе у СТГ тесту и довео је до смањења Caco-2 пермеабилност са 7,23 на 0,38 nm/s.

Табела 15. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства PROTAC молекула (13) и (17) усмерених на HSP90 и изведених из тиенопиримидина

Једињење	(13)	(17)
Структура лиганда за HSP90		
Структура линкера		
Структура лиганда за E3 лигазу		
<i>IC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	0,2107 ± 0,0158	0,2304 ± 0,0274
<i>EC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	5,2603 ± 0,2896	5,8771 ± 0,5193
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μg/mL]	3,30 ± 0	4,60 ± 0,40
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μM]	3,80 ± 0,10	5,10 ± 0,40
<i>P</i> _{app} <i>A-B</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	7,23 ± 1,74	0,38 ± 0,26
<i>P</i> _{app} <i>B-A</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	3,61 ± 3,54	1,07 ± 0,52
<i>ER</i>	0,50	2,82
<i>M</i> [g/mol]	862,74	906,79
<i>TPSA</i> [Å ²]	269,84	279,07
<i>NRotB</i>	19	22

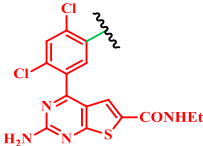
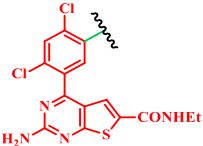
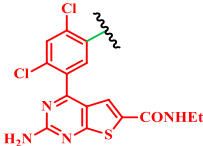
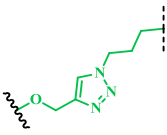
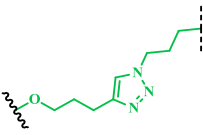
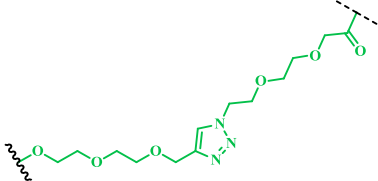
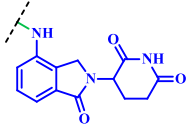
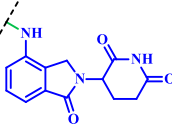
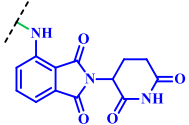
Повољнији исход уочен је када је тиенопиримидински фрагмент који садржи -OCH₃ групу био повезан са лигандом за E3 лигазу преко кратких алкилних ланаца. Замена -OCH₂CONH₂ групе присутне у једињењу (21) -OCH₃ групом, као у једињењима (24) и (25) (Табела 16), побољшала је везивање за HSP90. Једињење (24), пропиленски аналог који садржи леналидомид, показало је *IC*₅₀ вредност од 0,0404 μM и *EC*₅₀ вредност од 1,9251 μM. Сродни пентиленски аналог који садржи деоксоталидомид, једињење (25), задржао је везивање за HSP90 (0,1236 μM), али је показао знатно слабији резултат у СТГ тесту (> 4,533 μM). Пошто се између ова два једињења истовремено мењају и дужина линкера и лиганд који регрутује E3 лигазу, доступни подаци не дозвољавају да се уочени ефекат припише једној структурној променљивој. Ипак, у овом локалном поређењу, комбинација краћег линкера и леналидомида делује повољније од дизајна који укључује дужи линкер и деоксоталидомид.

Табела 16. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства PROTAC молекула (21), (24) и (25) усмерених на HSP90 и изведених из тиенопиримидина

Једињење	(21)	(24)	(25)
Структура лиганда за HSP90			
Структура линкера			
Структура лиганда за Е3 лигазу			
<i>IC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	0,1255 ± 0,0539	0,0404 ± 0,0045	0,1236 ± 0,0201
<i>EC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	> 8,2860	1,9251 ± 0,1452	> 4,5330
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μg/mL]	4,04 ± 0,08	1,92 ± 0,08	4,95 ± 0,31
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μM]	5,57 ± 0,11	2,87 ± 0,12	7,26 ± 0,45
<i>P</i> _{app} <i>A-B</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	0,64 ± 0,06	0,90 ± 0,40	0,95 ± 0,23
<i>P</i> _{app} <i>B-A</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	4,39 ± 1,53	8,40 ± 1,80	7,35 ± 2,86
<i>ER</i>	6,86	9,33	7,74
<i>M</i> [g/mol]	724,61	668,55	681,59
<i>TPSA</i> [Å ²]	227,94	196,88	184,85
<i>NRotB</i>	13	10	11

Деривати тиенопиримидина из којих се могу извући многи закључци чине једињења (29), (32) и (36) (Табела 17). Сва три садрже амид на тиофену, а разликују се по архитектури линкера који садрже триазол и повезани су преко фенола. Једињење (29) показало је *IC*₅₀ вредност од 0,0421 μM, али само граничну активност у СТG тесту (> 3 μM). Продужење линкера присутно код једињења (32) побољшало је везивање за HSP90 (*IC*₅₀ = 0,0175 μM) и истовремено побољшало *EC*₅₀ на 0,9763 μM. Овакав резултат је упадљив, јер побољшана активност у ћелијама није била праћена бољим параметрима који се тичу транспорта. Напротив, једињење (32) имало је нижу растворљивост (0,49 μM) и нижу вредност *P*_{app} *A-B* (0,43 nm/s) него једињење (29), уз задржавање нижег коефицијента ефлукса. Најједноставнији закључак јесте да је позиција лиганда за Е3 лигазу у простору, а не само пасивна пермеабилност, превасходно одредила разлику у перформансама између ова два једињења. Једињење (36) повећава сложеност резултата. Ово је највећи молекул у целокупној серији (*M* = 953,80 g/mol; *TPSA* = 298,65 Å²; 24 ротирајуће везе), а ипак се везивао за HSP90 при 0,0838 μM и показао *EC*₅₀ вредност од 0,6591 μM, што га чини најпотентнијим тиенопиримидинским PROTAC молекулом у тесту на ћелијама. Ово поново говори против сваког поједностављеног тумачења према којем величина, поларна површина или предвиђена орална апсорпција изоловано одређују да ли ће неки PROTAC молекул бити фармаколошки успешан. Уместо тога, подаци за деривате тиенопиримидина указују да топологија линкера може имати већи утицај него било који појединачни физичко-хемијски дескриптор.

Табела 17. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства PROTAC молекула (29), (32) и (36) усмерених на HSP90 и изведених из тиенопиримидина

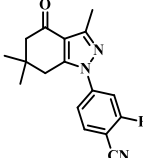
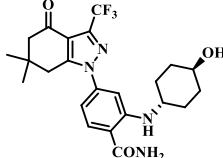
Једињење	(29)	(32)	(36)
Структура лиганда за HSP90			
Структура линкера			
Структура лиганда за Е3 лигазу			
$IC_{50} \pm SD$ [μM]	0,0421 \pm 0,0030	0,0175 \pm 0,0018	0,0838 \pm 0,0172
$EC_{50} \pm SD$ [μM]	> 3	0,9763 \pm 0,0593	0,6591 \pm 0,0390
$S \pm SD$ [$\mu\text{g/mL}$]	0,69 \pm 0,07	0,39 \pm 0,03	2,63 \pm 0,08
$S \pm SD$ [μM]	0,91 \pm 0,09	0,49 \pm 0,04	2,75 \pm 0,08
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	1,22 \pm 0,37	0,43 \pm 0,01	4,98 \pm 0,26
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	8,49 \pm 2,08	0,87 \pm 0,15	4,29 \pm 0,08
ER	6,96	2,02	0,86
M [g/mol]	763,65	791,71	953,80
$TPSA$ [\AA^2]	227,59	227,59	298,65
$NRotB$	13	15	24

4.1.3. PROTAC молекули засновани на скелету тетрахидроиндазола

Из деривата тетрахидроиндазола се могу извући многи закључци с обзиром да се у овом скупу једињења директно разматрају деривати бензамида насупрот дериватима бензонитрила. Бензонитрилни деривати тетрахидроиндазола испитани су првенствено из синтетичких разлога, јер су одговарајући интермедијери бензонитрилни лиганд-линкер већ настајали током синтезе бензамидних PROTAC молекула (Шеме 16-18). Због тога је добијање бензонитрилних PROTAC молекула представљало директно доступан циљ, без потребе за значајним додатним синтетичким напором. Као полазна основа за овај приступ, најпре је испитан бензонитрилни лиганд за HSP90, једињење (37), који је представљао интермедијер у синтези PROTAC молекула заснованих на скелету тетрахидроиндазола. Његова активност је упоређена са активношћу референтног бензамидног инхибитора SNX-2112 (Табела 18). Иако је једињење (37) показало знатно слабији афинитет према HSP90 ($IC_{50} = 43,8917 \mu\text{M}$) у односу на SNX-2112 ($IC_{50} = 0,0112 \mu\text{M}$), овај резултат није у потпуности искључио могућност његове примене у дизајну PROTAC молекула. Наиме, активност PROTAC молекула није одређена искључиво бинарним афинитетом лиганда према ПОИ, већ зависи и од геометрије и кооперативности ТК-а. Како су показали Bondeson и сар., слабо бинарно везивање за циљни протеин у појединим случајевима може бити компензовано повољним интеракцијама у комплексу ПОИ-PROTAC-Е3 лигаза, што може омогућити ефикасну деградацију и онда када сам афинитет лиганда не указује на такав исход [138]. Додатни разлог за испитивање деривата бензонитрила био је повољнији физичко-хемијски и фармакокинетички профил једињења (37) у односу на SNX-2112. У поређењу са бензамидним инхибитором, једињење (37) има мању моларну масу, нижу тополошку поларну површину, мањи број ротирајућих веза, већу растворљивост, већу $P_{app} A-B$ вредност и нижи коефицијент ефлукса. Стога је постојала могућност да се бар део ових

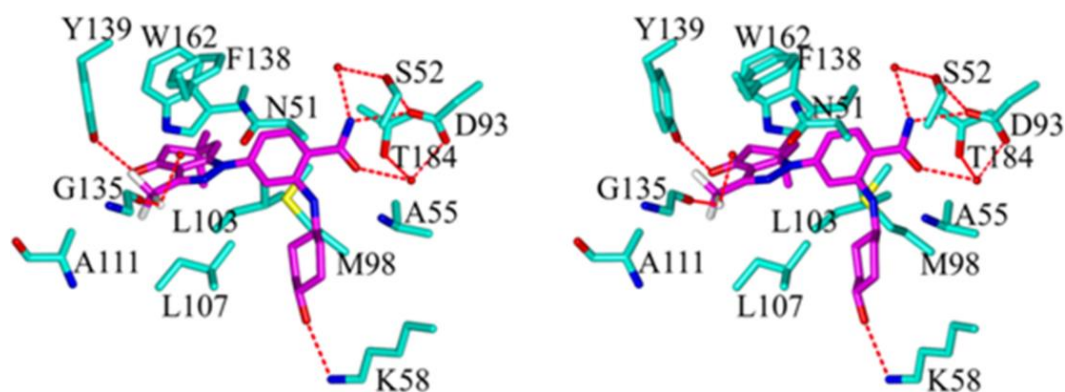
повољнијих својстава одрази и на одговарајуће бензонитрилне PROTAC молекуле. На основу тога, бензонитрилни PROTAC молекули су испитани као синтетички приступачна и концептуално оправдана серија, са циљем да се процени да ли лиганд са слабијим везивањем за HSP90, али повољнијим физичко-хемијским својствима, може бити користан у контексту циљане деградације.

Табела 18. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства инхибитора (37) и SNX-2112 изведених из тетрахидроиндазола

Једињење	(37)	SNX-2112
Структура		
$IC_{50} \pm SD$ [μ M]	$43,8917 \pm 4,1669$	$0,0112 \pm 0,0018$
$EC_{50} \pm SD$ [μ M]	> 10	$0,0001 \pm 0$
$S \pm SD$ [μ g/mL]	$35,44 \pm 0,78$	$37,03 \pm 11,83$
$S \pm SD$ [μ M]	$119,19 \pm 2,64$	$79,73 \pm 25,47$
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	$120,02 \pm 4,97$	$64,69 \pm 16,15$
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	$89,18 \pm 22,69$	$122,44 \pm 23,62$
ER	0,74	1,89
M [g/mol]	297,33	464,48
TPSA [\AA^2]	58,68	110,24
NRotB	1	5

Бензамидни PROTAC молекули засновани на скелету тетрахидроиндазола

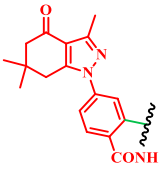
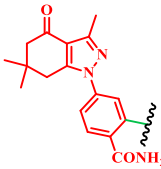
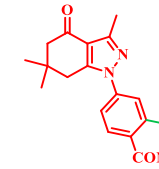
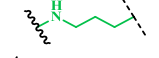
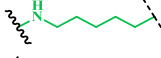
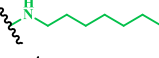

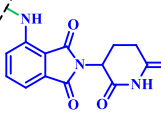
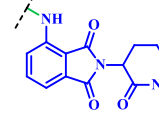
SNX-2112 је добро познат HSP90 инхибитор изведен из бензамида. Ово једињење показало је IC_{50} од $0,0112 \mu\text{M}$ и изузетно снажан EC_{50} од $0,0001 \mu\text{M}$ (Табела 18). У студији Zhao и сар. објављена је кристална структура комплекса SNX-2112 са HSP90 α (Слика 55) [423]. Овај инхибитор се налази у АТП-везујућем цењу и гради три директне водоничне везе са Tyr139, Asp93 (преко $-\text{NH}_2$ групе бензамида) и Lys58. Он остварује и водоничне везе посредоване водом са Ser52 (преко $-\text{NH}_2$ групе бензамида), Asp93 (преко $=\text{CO}$ групе бензамида) и Thr184 (преко $=\text{CO}$ групе бензамида), гради халогену везу са карбонилном групом на главном ланцу остатка Gly135, учествује у π - π интеракцији са Phe138 и успоставља вишеструке хидрофобне контакте који укључују Met98, Leu103, Leu107, Phe138, Tyr139, Trp162, Asn51, Ala55, Asp93 и Thr184.



Слика 55. Приказ интеракција између *N*-терминалног домена HSP90 α и SNX-2112 (PDB код: 6LTK [423])

Када је овај бензамидни лиганд уграђен у PROTAC молекуле, везивање за HSP90 је углавном задржано код аналога са краћим и средње дугим алкилним линкерима. Једињење **(53)**, пропиленски помалидомидни аналог, имало је IC_{50} вредност од 0,1461 μM и EC_{50} вредност од 0,7756 μM , док је пентиленски аналог **(56)** задржао веома слично везивање за HSP90 ($IC_{50} = 0,1268 \mu\text{M}$) и показао нешто бољу активност у ћелијама ($EC_{50} = 0,6708 \mu\text{M}$). Насупрот томе, октиленски аналог **(58)** није показао мерљиво везивање за HSP90 ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$) и био је неактиван у CTG тесту ($EC_{50} > 10 \mu\text{M}$) (Табела 19). Овај резултат не треба нужно тумачити као директну стерну сметњу између продуженог линкера и везивног цепа HSP90, јер се очекује да линкер полази из дела лиганда који је оријентисан ка растварачу. Уместо тога, подаци наводе на закључак да продужавање хидрофобног и флексибилног алкилног линкера може променити понашање целог PROTAC молекула у биохемијском тесту. То може укључити неповољну конформацију, делимично интрамолекулско маскирање фрагмента који се везује за HSP90, повећану склоност ка неспецифичним интеракцијама или смањење ефективне концентрације слободног једињења у условима теста.

Табела 19. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства PROTAC молекула **(53)**, **(56)** и **(58)** усмерених на HSP90 и изведених из бензамида

Једињење	(53)	(56)	(58)
Структура лиганда за HSP90			
Структура линкера			
Структура лиганда за E3 лигазу			
$IC_{50} \pm SD$ [μM]	0,1461 \pm 0,0158	0,1268 \pm 0,0109	> 50
$EC_{50} \pm SD$ [μM]	0,7756 \pm 0,0626	0,6708 \pm 0,0607	> 10
$S \pm SD$ [$\mu\text{g/mL}$]	1,12 \pm 0,58	0,98 \pm 0,45	0,85 \pm 0,38
$S \pm SD$ [μM]	1,79 \pm 0,73	1,50 \pm 0,70	1,22 \pm 0,63
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	2,89 \pm 0,48	3,19 \pm 0,53	3,31 \pm 0,48
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	4,80 \pm 1,60	5,21 \pm 2,23	5,11 \pm 2,12
ER	1,66	1,63	1,54
M [g/mol]	625,67	653,73	695,81
$TPSA$ [\AA^2]	185,59	185,59	185,59
$NRotB$	9	11	14

Бензонитрилни PROTAC молекули засновани на скелету тетрахидроиндазола

PROTAC молекули изведени из бензонитрила показали су слабе резултате. Једињења **(40)**, **(43)**, **(46)**, **(49)** и **(50)** (Табела 20) била су неактивна и у TR-FRET ($> 50 \mu\text{M}$) и у CTG тесту ($> 10 \mu\text{M}$). Важно је истаћи да се предности полазног бензонитрилног инхибитора **(37)** које се тичу физичко-хемијских и фармакокинетичких особина нису одразиле на одговарајуће PROTAC молекуле. Њихове измерене растворљивости биле су ниске (0,41-0,98 μM за помалидомидну серију; 0,57 μM за аналог фенил-глутаримида), а $P_{app} A-B$ вредности кретале су се само од 0,15 до 1,73 nm/s, што није боље од одговарајућих PROTAC молекула изведених из бензамида. И заиста, бензамидни аналози **(53)** и **(56)** показали су и више $P_{app} A-B$ вредности (2,89 и 3,19 nm/s), као и јасно супериорнију биолошку активност.

Табела 20. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства PROTAC молекула (40), (43), (46), (49) и (50) усмерених на HSP90 и изведених из бензонитрила

Једињење	(40)	(43)	(46)
Структура лиганда за HSP90			
Структура линкера			
Структура лиганда за E3 лигазу			
$IC_{50} \pm SD$ [μ M]	> 50	> 50	> 50
$EC_{50} \pm SD$ [μ M]	> 10	> 10	> 10
$S \pm SD$ [μ g/mL]	0,61 \pm 0,15	0,53 \pm 0,17	0,28 \pm 0,06
$S \pm SD$ [μ M]	0,98 \pm 0,32	0,83 \pm 0,27	0,41 \pm 0,09
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	1,73 \pm 0,35	1,52 \pm 0,31	0,21 \pm 0,10
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	0,85 \pm 0,11	0,81 \pm 0,09	0,49 \pm 0,26
ER	0,49	0,53	2,33
M [g/mol]	621,69	635,71	677,79
$TPSA$ [\AA^2]	166,29	166,29	166,29
$NRotB$	9	10	13
Једињење	(49)	(50)	
Структура лиганда за HSP90			
Структура линкера			
Структура лиганда за E3 лигазу			
$IC_{50} \pm SD$ [μ M]	> 50	> 50	
$EC_{50} \pm SD$ [μ M]	> 10	> 10	
$S \pm SD$ [μ g/mL]	0,35 \pm 0,08	0,38 \pm 0,09	
$S \pm SD$ [μ M]	0,51 \pm 0,11	0,57 \pm 0,12	
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	0,18 \pm 0,09	0,15 \pm 0,10	
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	0,51 \pm 0,27	0,48 \pm 0,23	
ER	2,83	3,20	
M [g/mol]	681,74	670,75	
$TPSA$ [\AA^2]	184,75	173,67	
$NRotB$	13	16	

Свеукупно, добијени резултати подржавају само део размишљања о дизајну. Бензонитрилни инхибитор је заиста показао повољнија својства у односу на бензамидни. Ипак, то се није превело у серију активних PROTAC молекула усмерених на HSP90. Закључак јесте да су бензонитрилни PROTAC молекули били разумно испитивани узевши у обзир њихову синтетску доступност, као и постојање мерљивог везивања једињења (37) за HSP90. Међутим, расположиви подаци не подржавају коришћење деривата бензонитрила као конкурентну замену за бензамидни лиганд.

4.1.4. Трендови физичко-хемијских особина кроз три фамилије скелета

При сагледавању целокупног скупа PROTAC молекула, одмах је уочљиво неколико општих обележја. Прво, сва бифункционална једињења су се у односу на полазне инхибиторе HSP90 јасно померила у bRo5 простор. Моларне масе крећу се од 621,69 до 953,80 g/mol, вредности *TPSA* су у распону од 166,29 до 298,65 Å², а број ротирајућих веза протеже се од 9 до 24. У складу са овим померањем, за сваки PROTAC молекул је софтвер *SwissADME* предвидео ниску гастроинтестиналну апсорпцију и указао да је свако од ових једињења нарушавало по два Липинскијева правила. Друго, упркос овим ограничењима, више једињења је задржало субмикромоларно везивање за HSP90, што показује да увођење линкера и лиганда за E3 лигазу није ометало препознавање циљног протеина. Треће, очувано везивање за HSP90 није се уједначено преводило у активност у ћелијама, што указује на то да бинарни афинитет сам по себи није био једини фактор који одређује понашање једињења у ћелијама.

Експериментални подаци откривају јасну хијерархију између три различита скелета. Серија пиролопиримидина била је најуспешнија, при чему су оба једињења задржала веома снажно везивање за HSP90 (*IC*₅₀ вредности 0,023 и 0,016 μM за једињења **(3)** и **(7)**) и истовремено показала најјаче одговоре у CTG тесту у ћелијама MV4-11 (0,013 и 0,0295 μM). Серија тиенопиримидина показала је већу разноликост у резултатима. Неколико чланова задржало је субмикромоларно везивање за HSP90 упоредиво са одговарајућим инхибитором NVP-ВЕР800, али се само део оваквих резултата превео у субмикромоларну или ниску микроларну активност у ћелијама. Резултати који се тичу серије тетра hidroиндазола били су изразито раздвојени. Бензамидни аналози задржали су мерљиво везивање за HSP90 и умерену активност у ћелијама када су коришћени кратки или средње дуги алкилни линкери, док су бензонитрилни аналози уједначено показали слабе резултате.

Други тренд представља изражено неподударање између својстава која повољно утичу на пермеабилност и коначног биолошког исхода. Најједноставније очекивање било би да нижа моларна маса, мања поларна површина и већа Сасо-2 пермеабилност треба да се преведу у бољу ћелијску активност. Међутим, добијени подаци ово не подржавају. На пример, једињење **(32)** има једну од најбољих *IC*₅₀ вредности у целом скупу, веома слабу растворљивост и веома ниску *P*_{app} A-B вредност, а ипак у CTG тесту надмашује већину осталих аналога из серије тиенопиримидина. Насупрот томе, бензонитрилни инхибитор, једињење **(37)**, показује најповољнији физичко-хемијски профил у групи тетра hidroиндазола, али ни сам инхибитор ни из њега изведени PROTAC молекули не испољавају одговарајућу биолошку активност. Дакле, перформансе PROTAC молекула усмерених на HSP90 одређене су склопом више фактора, укључујући компатибилност лиганда за HSP90 са цепом овог протеина, положај места припајања линкера, положај лиганда за E3 лигазу који зависи од линкера, а тек затим конвенционалне дескрипторе повезане са апсорпцијом.

4.1.5. Односи између структуре, својстава и активности кроз комплетан скуп података за PROTAC молекуле усмерене на HSP90

Из целокупног скупа података могу се издвојити неки општи односи структура-својство-активност. Први се тиче особина леколикости које зависе од одређених правила у медицинској хемији. Липинскијево правило петице налаже да је већа вероватноћа да ће једињења показати повољну оралну апсорпцију када имају молекулску масу ≤ 500 Da, израчунати log*P* ≤ 5, не више од 5 донаора водоничних веза и не више од 10 акцептора водоничних веза [220]. Осим тога, Веберови критеријуми налажу да је већа вероватноћа да ће једињења показати повољну оралну биорасположивост када имају 10 или мање ротирајућих веза и тополошку поларну површину од 140 Å² или мању, алтернативно, 12 или мање укупних донаора и акцептора водоничних веза [424]. PROTAC молекули често крше ова правила зато што су сами по себи бифункционални и самим тим много већи и поларнији од конвенционалних инхибитора. У том смислу, PROTAC молекули усмерени на HSP90 понашају се управо онако како се очекује за једињења у bRo5 простору – за све чланове предвиђена је ниска гастроинтестинална

апсорпција, сви су нарушили по два Липинскијева правила, а сви су показали најмање једно одступање од Веберових критеријума. Међутим, добијени подаци такође показују зашто дескриптори засновани на поменутих правилима нису довољни за рангирање PROTAC молекула. Када би ти дескриптори били најважнији, једињење (36) морало би бити међу најнеповољнијим молекулима у овом скупу, а ипак је било једно од активнијих тиенопиримидинских деривата посматрајући његову EC_{50} вредност. Насупрот томе, релативно компактни бензонитрилни инхибитор (37) требало је да представља значајну прилику, али је подбацио као лиганд за HSP90. Стога је за проучавану серију PROTAC молекула ове дескрипторе најбоље користити као контекстуалне, а не као детерминистичке варијабле. Другим речима, они указују на изазове приликом развоја PROTAC молекула, не и који ће појединачни молекул бити успешан.

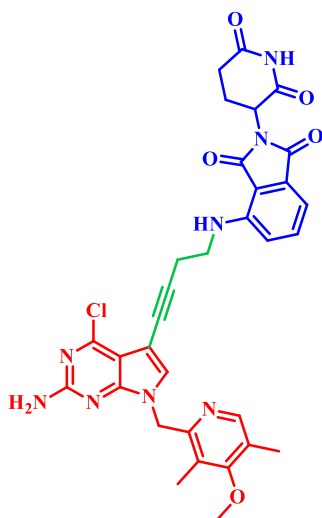
Други однос тиче се на утицаја дужине линкера. У више локалних поређења, претерано дуги алкилни линкери или линкери богати ПЕГ јединицама били су неповољни. Најјаснији пример представља бензамидна подсерија тетрахидроиндазола, где се продужење са C3/C5 (једињења (53)/(56)) на C8 линкер (једињење (58)) поклопило са потпуним губитком везивања за HSP90 и ћелијске активности. Рад у ком су описани PROTAC молекули усмерени на HSP90 указао је на сродни закључак – деградациона активност је била максимална код молекула који имају интермедијарну дужину линкера, а не код оних који имају најдуже линкере [339].

Трећи однос тиче се раздвајања између бинарног везивања за HSP90 и активности у ћелијама. Скуп података јасно указује на једињења са снажним IC_{50} вредностима, али само умереном активношћу у CTG тесту, нарочито у оквиру групе тиенопиримидина. То значи да је снажно препознавање HSP90 неопходно, али не и довољно. За бифункционални молекул није релевантан само бинарни комплекс HSP90-лиганд, већ и целокупно унутарћелијско понашање молекула, укључујући транспорт, могући ефлукс, положај лиганда за E3 лигазу у простору и, коначно, формирање ТК-а компетентних за убиквитинацију.

На крају, експериментални подаци о пермеабилности показују да су PROTAC молекули показали изражено погоршање у погледу транспорта у односу на полазне инхибиторе. Инхибитори EC144, NVP-VEP800 и SNX-2112 показали су $P_{app} A-B$ вредности од 236,66, 98,15 и 64,69 nm/s, док је већина PROTAC молекула била груписана око знатно нижих вредности, често око 5 nm/s или мање. Стога, лоша пермеабилност несумњиво јесте део проблема. Ипак, она не може бити једини фактор, јер су једињења (3) и (7) остала високо потентна упркос скромним $P_{app} A-B$ вредностима и повишеним коефицијентима ефлукса.

4.1.6. Образложење одсуства Western blot анализе у овом истраживању

У оквиру планирања ове дисертације, Western blot анализа била је резервисана за једињења која би показала велику вероватноћу изазивања биолошки значајне деградације HSP90, а не да само репродукују ефекте који се очекују од инхибиције HSP90. Добијени резултати нису пружили снажну основу за такво приоритизовање. Многи PROTAC молекули били су значајно слабији од одговарајућих полазних инхибитора у CTG тесту, а чак ни перспективнија једињења у том тренутку нису испољавала фенотипски образац који би јасно захтевао објашњење усмерено на деградацију. У тим околностима, било је разумно посумњати да уочена цитотоксичност претежно одражава инхибицију HSP90 и последичну дестабилизацију протеина-клијената. Овакав поступак је заснован на ширем искуству из области циљане деградације протеина, где су у више модела деградери показали знатно израженији ефекат на ћелијску вијабилност од одговарајућих инхибитора. Међутим, рад који су објавили Liu и сар. показује да мерљива деградација HSP90 може настати чак и онда када укупни биолошки добитак у односу на полазни инхибитор није изразит. У тој студији, BP3 PROTAC молекул (Слика 56) показао је DC_{50} од 0,99 μ M и D_{max} од 83,43% након 6 сати у ћелијама MCF-7 и показано је да више аналога изведених из ВПВ021 снижава нивое HSP90 у Western blot анализи [339].



Слика 56. Хемијска структура једињења ВРЗ

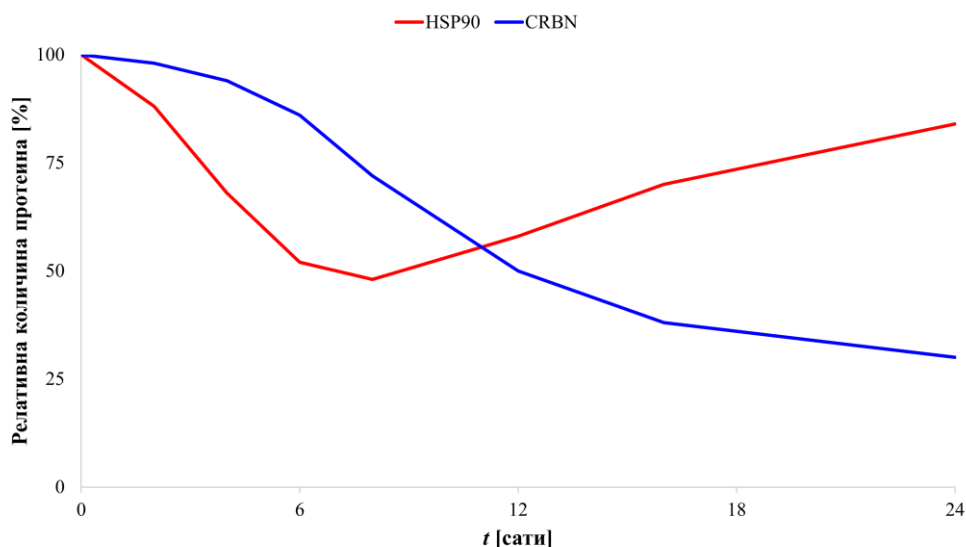
Стога, одсуство података из *Western blot* анализе у овој дисертацији не треба тумачити као доказ да деградација HSP90 није постојала. То само значи да расположиви скуп података у том тренутку није сматран довољно уверљивим да оправда извођење тог експеримента. Ова напомена је нарочито значајна, зато што једињење (3) у потпуности одговара PROTAC молекулу 16g усмереном на HSP90 који је описан у претходно поменутом раду. Дакле, постоји експлицитан литературни доказ да PROTAC молекули изведени из пиролопиримидина могу да деградирају HSP90, чак и ако сама потентност у ћелијама не би предвидела пун обим таквог понашања. Посматрано ретроспективно, ово представља важно ограничење – сам фенотипски скрининг може потценити механистички значај деградације за бифункционалне молекуле усмерене на HSP90.

4.1.7. Хипотеза о деградацији и деплецији CRBN-а инспирисана литературом о деградерима који користе интерактом HSP90

Механистичко тумачење PROTAC молекула усмерених на HSP90 и заснованих на CRBN-у може се свести на три међусобно неискључива исхода након формирања ТК-а између лиганда за CRBN, линкера и лиганда за HSP90 (Слика 59).

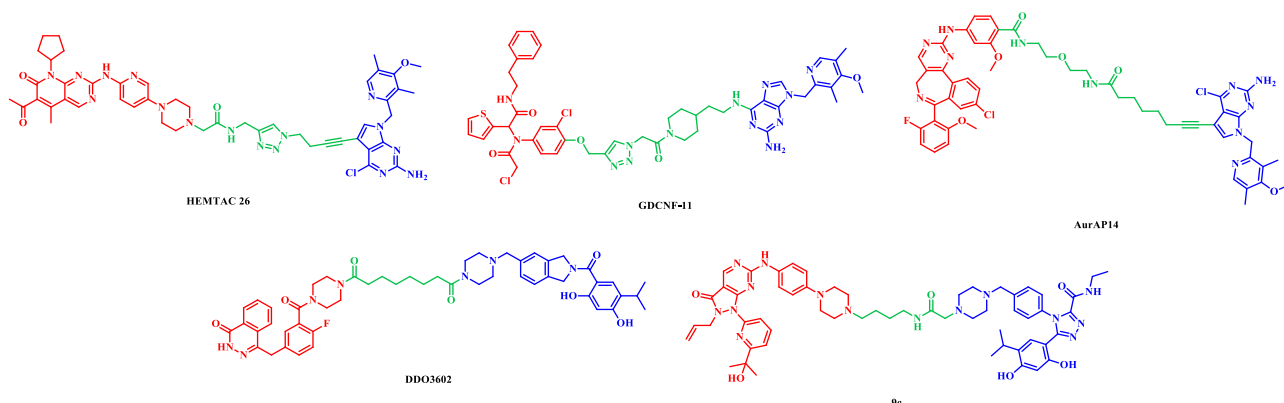
У првом, фармаколошки пожељном исходу, једињења делују као типични PROTAC молекули: лиганд за HSP90 везује циљни протеин, лиганд за E3 лигазу регрутује CRBN, а CRL4^{CRBN} комплекс полиубиквитинише HSP90 и усмерава га ка протеазомалној деградацији. У овом моделу, CRBN остаје функционално доступан за наредне циклусе деградације, што би требало да доведе до изражене деградације HSP90, ниских DC_{50} вредности и високих D_{max} вредности.

Други претпостављени исход је кључан. Пошто HSP90 функционише у оквиру широке мреже шаперона, кошаперона и E3 убиквитин лигаза, а показано је да се око 30% хуманих E3 лигаза везује за HSP90 [425,426], комплекс везан за PROTAC молекул могао би да постане улазна тачка ка ширем окружењу E3 лигаза. У том случају, поред ране деградације HSP90, могао би се развити одложени секундарни процес у којем сам CRBN постаје ненамерно убиквитинисан, деградиран и деплетован. Последица би била самоограничавајућа кинетика – почетни пад нивоа HSP90, затим губитак CRBN-а, слабљење даље деградације HSP90 и могућ делимичан повратак HSP90 услед његове ресинтезе (Слика 57). Овај модел би могао да помогне у тумачењу зашто су до сада описани деградери HSP90 засновани на CRBN-у показали само умерену деградациону ефикасност, са најбољим DC_{50} вредностима у субмикромоларном опсегу, од 0,295 до 0,99 μM , и непотпуним D_{max} вредностима, од 41% до 83,43% [339–341].



Слика 57. Илустративни временски ток другог исхода који показује рани губитак HSP90, одложену деплецију CRBN-а, накнадну стагнацију деградације HSP90 и делимичну ресинтезу HSP90

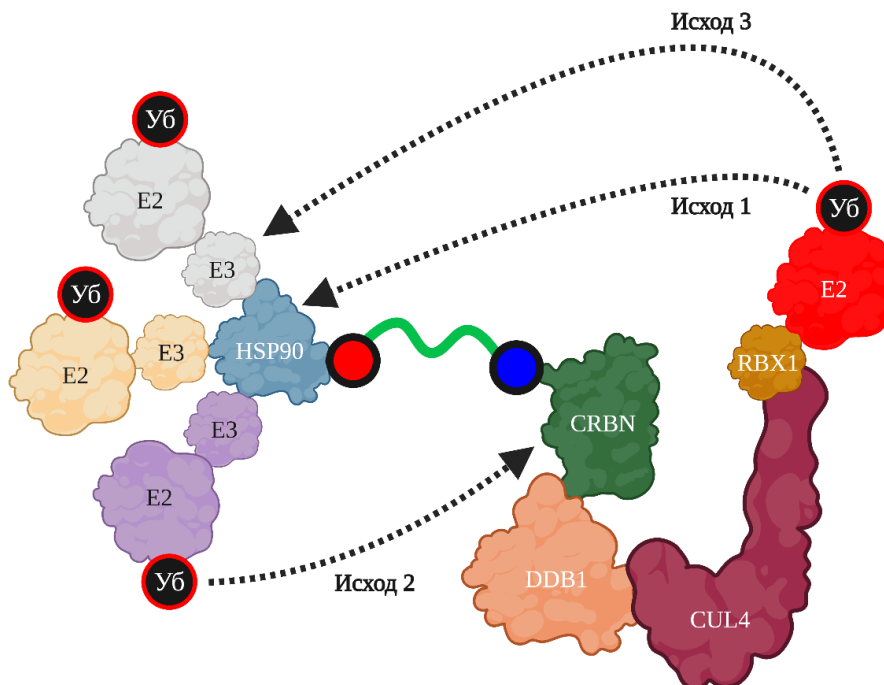
Подршка овом моделу долази из две групе података из литературе. Прво, показано је да хемијски индукована деплеција CRBN-а смањује активност PROTAC молекула који регрутују CRBN. У студији *Powell* и сар., претходни третман селективним деградерима CRBN-а изазвао је готово потпуну деградацију CRBN-а и делимично спречио деградацију CDK9 посредовану деградером који регрутује ову E3 лигазу [427]. Друго, литература о деградерима који користе интерактом HSP90 показује да лиганди за овај шаперон могу усмеравати циљне протеине у путеве деградације који укључују више E3 лигаза. На пример, HEMTAC једињење **26** деградира CDK4/CDK6 [428], HIM-PROTAC молекули GDCNF-2 и GDCNF-11 деградирају GPX4 [429], AurAP14 деградира протеин *Aurora A* [430], DDO3602 деградира PARP1 [431], док су једињења **8b** и **9c** описана као деградери WEE1 [432] (Слика 58).



Слика 58. Хемијске структуре деградера који користе интерактом HSP90 (лиганди за HSP90 овде су обојени плаво јер посредно регрутују E3 лигазе)

Трећи исход односи се на колатералну убиквитинацију E3 лигаза повезаних са HSP90. У овом сценарију, CRBN доведен у близину HSP90 не би преваходно убиквитинисао HSP90 или био сам деградиран, већ би могао да усмери убиквитинацију једне или више E3 лигаза из

интерактома HSP90. То би смањило продуктивну убиквитинацију HSP90 и увело секундарне фенотипове зависне од конкретне лигазе. На основу студија губитка функције [433–436] система убиквитин лигаза које интерагују са HSP90, као што су CHIP, HECTD3, *Hakai* и комплекси који садрже кулин-5 [437–440], последице колатералне деградације E3 лигаза делују зависно од врсте лигазе и контекста, а не као униформно акутно цитотоксичне.



Слика 59. Три предложена механистичка исхода за PROTAC молекуле усмерене на HSP90 и засноване на CRBN-у

Ове исходе не треба посматрати као алтернативе од којих само једна мора бити тачна. Вероватнији модел је њихова временска коегзистенција, што значи да у раној фази може доминирати директна деградација HSP90, док се касније могу јавити деплеција CRBN-а и/или колатерална деградација E3 лигаза повезаних са HSP90. Због тога, умерене DC_{50} и непотпуне D_{max} вредности могу указивати на пролазну или самоограничавајућу деградацију ПОИ. Доступни подаци о CRBN-у додатно указују да његов акутни губитак пре свега умањује активност имуномодулаторних лекова (IMiDs) и модулятора E3 лигазе цереблona (енг. *Cereblon E3 Ligase Modulatory Drugs*, CELMoDs), без непосредног губитка ћелијске вијабилности [441], док је дуготрајна деплеција CRBN-а повезана са нарушавањем митохондријалне хомеостазе и смањеном вијабилношћу [442]. Према томе, у контексту деградера HSP90 који регрутују CRBN, ненамерна деградација CRBN-а или E3 лигаза повезаних са HSP90 треба пре свега да се разматра као механизам који ограничава ефикасност деградације и компликује фенотипско тумачење, а не као доказ непосредне акутне цитотоксичности.

4.1.8. Општи закључци о PROTAC молекулама усмереним на HSP90

Узето заједно, резултати за PROTAC молекуле усмерене на HSP90 подржавају следеће закључке:

- 1) Пиролопиримидински скелет се показао најбољим, јер је очувано веома снажно везивање молекула за HSP90 и добијени су најбољи одговори у ћелијама упркос израженом bRo5 карактеру молекула.

2) Тиенопиримидински скелет је пружио многе закључке, јер је показао да препознавање HSP90 може да се очува кроз више стратегија увођења линкера, али је истовремено показао и да очувани бинарни афинитет не гарантује снажну активност у ћелијама.

3) У оквиру групе тетра hidroиндазола, бензамидни лиганд био је недвосмислено супериорнији у односу на бензонитрилну алтернативу. Иако је бензонитрилни инхибитор (37) показао повољнија физичко-хемијска и фармакокинетичка својства, та предност је била поништена изразитим губитком везивања за HSP90 и није се превела у активне PROTAC молекуле.

4) Ниједан појединачни дескриптор – ни моларна маса, ни тополошка поларна површина, ни пермеабилност, ни коефицијент ефлукаса, ни бинарни афинитет према HSP90 – сам за себе није био довољан да објасни коначни биолошки профил ове серије.

Овај скуп података такође одређује границе тумачења резултата. Пошто директна мерења деградације нису обављена, не може се тврдити која једињења заиста деградирају HSP90 у примењеном ћелијском систему. Оно што се може учинити јесте да се идентификују структурне карактеристике које су у највећој мери довеле до очувања везивања за HSP90 и које су класе једињења највероватнији кандидати за будућа механистичка испитивања. На тој основи, пиролопиримидински PROTAC молекули и најбољи представници бензамидне тетра hidroиндазолске, као и тиенопиримидинске серије, издвајају се као најубедљивији кандидати за даљи развој, док бензонитрилну серију изведену из тетра hidroиндазола треба сматрати негативним исходом дизајна. На крају, литература о интерактому HSP90 пружа користан оквир за будући рад, сугеришући да скромне биолошке перформансе многих до сада описаних деградера HSP90 можда не одражавају само класична ограничења дизајна PROTAC молекула, већ и шире и сложеније окружење убиквитинације него што се у почетку претпостављало.

4.2. НуТ молекули усмерени на HSP90

У делу рада усмереном на HSP90, хидрофобно обележавање је разматрано као комплементарна стратегија деградера заснована на скелету 4,5,6,7-тетра hidro-1*H*-индазола, али са другачијим механистичким полазиштем у односу на директно регрутовање Е3 лигазе. Основна идеја била је да се очува препознавање HSP90 посредством већ успостављеног тетра hidroиндазолног лиганда, док би се елемент одговоран за деградацију заменио хидрофобним обележјем. Овај дизајн био је утемељен на кристалографски утврђеном начину везивања једињења SNX-2112, који је показао да се супституент у 2'-положају бензамида оријентише ка области доступној растварачу и да овај положај није неопходан за кључне контакте између протеина и лиганда у оквиру *N*-терминалног домена HSP90 α (Слика 52). Сходно томе, тај положај је третиран као рационално место припајања линкера у дизајну НуТ молекула.

Једињење SNX-2112 је одабрано као бензамидни референтни молекул, зато што је представљало најпотентнији лиганд за HSP90 заснован на скелету тетра hidroиндазола и што је, са структурног становишта, пружало веома јасну основу за место припајања линкера. Паралелно са тим, једињење (37), одговарајући бензонитрилни аналог, укључено је као алтернативно решење зато што је бензонитрилна група једињења представљала разумну хипотезу медицинске хемије – у односу на бензамиде, смањена поларност и одсуство амидног донора водоничне везе могли су потенцијално да побољшају укупна својства резултујућих молекула, а нарочито она која се тичу транспорта. Стога, серијом НуТ молекула су се у оквиру исте породице скелета испитале две супротстављене идеје: а) Да ли ће бензамидни лиганд високог афинитета најбоље поднети конверзију у НуТ молекул?, б) Да ли би бензонитрилни аналог, повољнији у погледу физичко-хемијских и фармакокинетичких својстава, али суштински мање потентан, могао постати употребљив у формату хидрофобног обележавања?

Ова је важно за тумачење резултата, јер НуТ молекули не захтевају регрутовање ЕЗ лигазе, али њихова активност и даље зависи од везивања за циљни протеин. Према томе, ако афинитет лиганда за HSP90 није очуван, само присуство хидрофобног обележја не може гарантовати дејство на HSP90.

Укупно је шест НуТ молекула синтетисано полазећи од два матична лиганда применом синтетичке стратегије тесно усклађене са хемијом која је раније развијена за исти скелет тетрахидроиндазола. Укратко, најпре је дериват бензонитрила функционализован линкерима у 2'-положају, а затим су ови интермедијери оксидовани до деривата бензамида или директно депротектовани. Добијени амини су употребљени за увођење хидрофобног обележја, при чему је амидација 2-((3*r*,5*r*,7*r*)-адаммантан-1-ил)сирћетном киселином служила као општи завршни синтетски корак за добијање бензонитрилних (Шеме 19-22) и бензамидних (Шеме 23-24) НуТ молекула. У оквиру синтетисаних НуТ молекула задржана је заједничка архитектура у виду тетрахидроиндазолног елемента за везивање за HSP90 повезаног са адаммантанским обележјем, док су дужина и састав линкера варирани на начин погодан за поређења, укључујући кратке алкилне, продужене алкилне и линкере сличне ПЕГ-у у бензонитрилној групи једињења, као и линкере који садрже пентилени, односно октиленски сегмент у бензамидној групи једињења. Стога, овај одељак треба тумачити као испитивање три повезана питања: а) Који је тетрахидроиндазолни лиганд најтолерантнији при конверзији у НуТ молекуле?, б) Како је положај адаммантанске групе у простору, условљен линкером, утицао на везивање НуТ молекула за HSP90?, в) Да ли је мањи формат НуТ молекула обезбедио практично користан компромис између препознавања циљног протеина, ћелијске активности и понашања које се тиче транспорта?

4.2.1. Полазни инхибитори и њихово превођење у НуТ молекуле усмерене на HSP90

Иницијална тачка за тумачење резултата који се тичу НуТ молекула односи се на полазне инхибиторе (Табела 18). SNX-2112 је служио као референтни бензамидни лиганд и остао је најпотентније једињење у читавој серији тетрахидроиндазола, са IC_{50} од 0,0112 μM и EC_{50} од 0,0001 μM . У поређењу са њим, једињење (37), аналог бензонитрила, било је знатно повољније у погледу физичко-хемијских и фармакокинетичких својстава, са мањом моларном масом, нижом тополошком поларном површином, мањим бројем ротирајућих веза, већом растворљивошћу, већом P_{app} А-В вредношћу и нижим коефицијентом ефлукса. Међутим, те привидне предности у погледу својстава биле су праћене израженим губитком везивања за HSP90, пошто је једињење (37) показало само слабо мерљиво везивање у TR-FRET тесту ($IC_{50} = 43,8917 \mu\text{M}$) и није показало мерљиву активност у STG тесту у испитиваном опсегу концентрација. Дакле, и пре увођења хидрофобног обележја, поређење бензамидног и бензонитрилног аналога већ је поставило централно питање: Да ли би бензонитрилни лиганд, повољнији у погледу физичко-хемијских и фармакокинетичких својстава, могао постати употребљив у формату НуТ молекула упркос знатно слабијем везивању за HSP90? Превођење ових полазних лиганада у НуТ молекуле довело је до различитих исхода у зависности од лиганда за HSP90. Једињења изведена из бензамида задржала су везивање за HSP90, док једињења изведена из бензонитрила углавном нису. Ова разлика је од кључног значаја, јер концепт НуТ молекула и даље зависи од иницијалног везивања за циљни протеин, иако се не ослања на регрутовање ЕЗ лигазе.

Бензонитрилни НуТ молекули засновани на скелету тетрахидроиндазола

НуТ молекуле изведене из бензонитрила чине једињења (59), (60), (63) и (64) (Табела 21). У овој подгрупи, једињење (59) представља уочљив пример, јер је било једини члан који је задржао мерљиво везивање за HSP90 у испитиваном опсегу концентрација, са $IC_{50} = 18,6179 \mu\text{M}$. Ова вредност је и даље слаба у апсолутном смислу, али је значајна у поређењу са полазним бензонитрилним инхибитором (37). Према томе, конверзија бензонитрилног инхибитора у формат НуТ молекула није у свим случајевима довела до потпуног губитка препознавања HSP90. Напротив, код једињења (59) увођење линкера и хидрофобног обележја било је праћено

приближно 2,4 пута бољим афинитетом за HSP90 у односу на једињење (37). Овај резултат указује да је одговарајућа просторна организација линкера и хидрофобног обележја могла повољно утицати препознавање HSP90. Ипак, побољшање забележено код једињења (59) није било довољно да бензонитрилне НуТ молекуле претвори у потентну серију једињења усмерених на HSP90. Иако је једињење (59) било боље од полазног бензонитрилног инхибитора (37), његов IC_{50} је остао у микромоларном опсегу и био је знатно слабији од бензамидних аналога, који ће бити дискутовани касније. Његова активност у СТГ тесту ($EC_{50} = 6,0570 \mu\text{M}$) стога се може сматрати умереним ћелијским одговором који је у складу са постојањем слабог, мерљивог везивања за HSP90, али сам по себи не доказује деградацију овог протеина. Преостали бензонитрилни НуТ молекули, једињења (60), (63) и (64), нису показали мерљиво везивање за HSP90 у TR-FRET тесту у испитиваном опсегу концентрација ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$). Због тога се њихови резултати у СТГ тесту не могу директно приписати механизму дејства НуТ молекула зависног од везивања за HSP90. Ово је посебно важно за једињење (63) које је показало релативно изражен ефекат у ћелијама ($EC_{50} = 2,3216 \mu\text{M}$) упркос одсуству мерљивог везивања за HSP90. Слично томе, једињење (60) је имало мерљив, али слабији одговор у СТГ тесту ($EC_{50} = 7,287 \mu\text{M}$), док је једињење (64) било неактивно у испитиваном опсегу концентрација ($EC_{50} > 10 \mu\text{M}$).

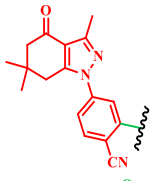
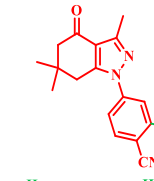

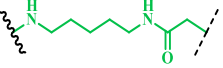


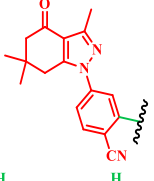
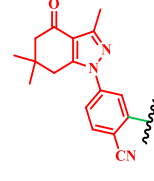
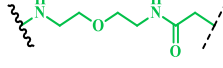
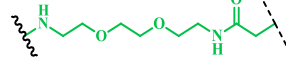


Пошто је серија НуТ молекула мала, ефекти линкера могу се тумачити опрезно и само у оквиру локалних поређења. Најјасније поређење међу бензонитрилним дериватима са алкилним линкерима представљају једињења (59) и (60). Ова два молекула разликују се само по једној додатној метиленској јединици. То наизглед умерено продужење линкера било је неповољно. Мерљиво везивање за HSP90 је изгубљено, при чему је вредност прешла са $18,6179 \mu\text{M}$ за једињење (59) на $> 50 \mu\text{M}$ за једињење (60), док се и активност у СТГ тесту благо померила у неповољном смеру, са $6,057$ на $7,287 \mu\text{M}$. Измерене вредности растворљивости и пермеабилности, као и ефлукс, остали су суштински непромењени и на ниском нивоу.

Поређење између бензонитрилних НуТ молекула са алкилним линкерима, (59) и (60), и бензонитрилних НуТ молекула са линкерима сличним ПЕГ-у, (63) и (64), сложеније је зато што се истовремено мењају и састав линкера и његова дужина. У односу на једињења са алкилним линкерима, аналоги са линкерима сличним ПЕГ-у донекле смањују липофилност и повећавају поларност, што се огледа у нижим $\log P$ вредностима израчунатим помоћу софтвера *SwissADME* за једињења (63) и (64) ($4,89$ и $4,98$) него за једињења (59) и (60) ($5,47$ и $5,75$), као и у већим вредностима тополошке поларне површине. У оквиру те подсерије, прелазак са краћег линкера сличног ПЕГ-у присутног у једињењу (63) на дужи присутан у једињењу (64) није побољшао ниједан кључни параметар активности. Везивање за HSP90 остало је недетектабилно у оба случаја, док се активност у СТГ тесту погоршала са $2,3216 \mu\text{M}$ за једињење (63) до неактивности за једињење (64). Важно је истаћи да се нешто виша растворљивост једињења (64) у односу на (63) није превела у бољу активност у ћелијама.

Уочена дисоцијација између резултата TR-FRET и СТГ теста показује да активност бензонитрилних НуТ молекула у ћелијама не мора нужно да одражава дејство директно зависно од HSP90. Наиме, СТГ тест представља фенотипски тест вијабилности ћелија и не разликује биолошку активност зависну од HSP90 од других механизма који могу утицати на ћелијски метаболизам или преживљавање. Дакле, могуће је да линкер и/или хидрофобно обележје допринесу ефекту у ћелијама механизмима који нису директно последица планираног механизма дејства НуТ молекула зависног од деградације HSP90, укључујући споредне ефекте независне од HSP90 или неспецифичне цитотоксичне ефекте. На основу добијених резултата, међутим, ови механизми остају само могућа објашњења, а не доказани механизми деловања. Главни пример неподударања између биохемијског везивања и ефекта у ћелијама било је једињење (63). Упркос одсуству мерљивог везивања за HSP90 у испитаном опсегу концентрација у TR-FRET тесту, оно је показало бољу активност у СТГ тесту од осталих НуТ молекула изведених из бензонитрила, као и знатно бољу активност од полазног бензонитрилног инхибитора. Овакво неподударање мора се тумачити опрезно. Добијени

резултати не омогућавају да се утврди да ли резултат СТГ теста за једињење **(63)** одражава слабу интеракцију са HSP90 која није детектована коришћеним биохемијским опсегом, унутарћелијско понашање које није повезано са механизмом хидрофобног обележавања усмереним на HSP90, или неки други фактор. Оно што се поуздано може рећи јесте само да тренутни подаци не дозвољавају да се побољшан резултат у СТГ тесту за једињење **(63)** тумачи као доказ успешног дејства НуТ молекула усмереног на HSP90. Сходно томе, једињење **(63)** вероватно испољава своје дејство преко неког алтернативног механизма дејства.

Табела 21. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства НуТ молекула **(59)**, **(60)**, **(63)** и **(64)** усмерених на HSP90 и изведених из бензонитрила

Једињење	(59)	(60)
Структура лиганда за HSP90		
Структура линкера		
Структура хидрофобног обележја		
<i>IC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	18,6179 ± 1,7420	> 50
<i>EC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	6,0570 ± 0,3126	7,2870 ± 0,5020
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μg/mL]	0,35 ± 0,23	0,28 ± 0,19
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μM]	0,65 ± 0,32	0,51 ± 0,34
<i>P</i> _{app} <i>A-B</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	2,19 ± 0,09	2,32 ± 0,12
<i>P</i> _{app} <i>B-A</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	0,98 ± 0,11	0,93 ± 0,13
<i>ER</i>	0,45	0,40
<i>M</i> [g/mol]	541,73	555,75
<i>TPSA</i> [Å ²]	99,81	99,81
<i>NRotB</i>	10	11
Једињење	(63)	(64)
Структура лиганда за HSP90		
Структура линкера		
Структура хидрофобног обележја		
<i>IC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	> 50	> 50
<i>EC</i> ₅₀ ± <i>SD</i> [μM]	2,3216 ± 0,5517	> 10
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μg/mL]	0,42 ± 0,21	0,58 ± 0,23
<i>S</i> ± <i>SD</i> [μM]	0,75 ± 0,31	0,96 ± 0,41
<i>P</i> _{app} <i>A-B</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	1,91 ± 0,05	1,78 ± 0,04
<i>P</i> _{app} <i>B-A</i> ± <i>SD</i> [nm/s]	1,02 ± 0,08	1,12 ± 0,11
<i>ER</i>	0,53	0,63
<i>M</i> [g/mol]	557,73	601,78
<i>TPSA</i> [Å ²]	109,04	118,27
<i>NRotB</i>	11	14

Свеукупно, закључак није да су бензонитрилни НуТ молекули били уједначено инертни. Једињење **(59)** показује да бензонитрилни лиганд, након превођења у формат НуТ молекула, може чак показати боље везивање за HSP90 у односу на полазни инхибитор **(37)**. Међутим, то

побољшање је било ограничено и није довело до потентне серије НуТ молекула усмерених на HSP90. Са друге стране, мерљиви одговори у СТГ тесту за једињења (60) и (63), у одсуству мерљивог везивања у TR-FRET тесту, треба тумачити као механистички неразјашњене ефекте у ћелијама, а не као доказ деградације HSP90. У практичном смислу, бензонитрилни скелет је омогућио само слабо везивање једињења (59) за HSP90, док код осталих аналога није очувано биохемијски мерљиво препознавање овог протеина. Добијени резултати зато не подржавају деривате бензонитрила као повољне лиганде за HSP90 у оквиру дизајна НуТ молекула, иако указују да линкер и хидрофобно обележје могу значајно утицати и на биохемијски афинитет и на ћелијски фенотип.

Бензамидни НуТ молекули засновани на скелету тетрахидроиндазола

НуТ молекули изведени из бензамида, једињења (65) и (66) (Табела 22), показали су знатно боље резултате. Једињење (65) било је најпотентнији НуТ молекул у целом скупу, имајући субмикромоларно везивање за HSP90 ($IC_{50} = 0,1075 \mu\text{M}$) и субмикромоларну активност у ћелијама ($EC_{50} = 0,2114 \mu\text{M}$). Једињење (66) такође је задржало мерљиво везивање за HSP90, али су се резултати у оба теста померили у неповољном правцу у односу на (65), са IC_{50} од $0,6472 \mu\text{M}$ и EC_{50} од $0,857 \mu\text{M}$. Иако су оба једињења била јасно слабија од полазног инхибитора SNX-2112, она ипак показују да тетрахидроиндазолски бензамидни лиганд може да толерише увођење хидрофобне групе на бази адамантана, а да притом остане елемент компетентан за везивање за HSP90.

Непосредно поређење једињења (65) и (66) даје информације и о утицају дужине линкера. Оба једињења имају исти бензамидни лиганд и адамантанско хидрофобно обележје, док је линкер продужен са пентиленског у једињењу (65) на знатно дужи октиленски у једињењу (66). Дужи линкер је нешто повећао вредност $P_{app} A-B$ и додатно снизио већ низак коефицијент ефлукса, али су ове промене повезане са транспортом биле праћене јасним губитком и у везивању за HSP90 и у активности у ћелијама. У односу на (65), једињење (66) било је приближно шест пута мање активно у TR-FRET тесту и око четири пута мање активно у СТГ тесту. Његова растворљивост је такође опала, док су моларна маса, број ротирајућих веза и липофилност порасли. Узето заједно, овај пар једињења подржава становиште да је прекомерна дужина линкера неповољна чак и у успешнијој бензамидној групи једињења. Дакле, када се уведе прекомерно дуг линкер, свако умерено побољшање транспорта бива надвладано погоршањем укупног профила активности.

У целом скупу НуТ једињења, јаче везивање за HSP90 углавном је корелирало са бољом активношћу у СТГ тесту, али тај однос није био апсолутан. Једињење (65) било је најјаснији пример такве подударности, јер је било и најпотентније у TR-FRET тесту и најактивније у ћелијама MV4-11. Једињење (66) пратило је исти општи образац, са слабијим везивањем и слабијом биолошком активношћу него (65). На супротном крају, у оквиру бензонитрилних деривата, једињење (64) није показало ни мерљиво везивање за HSP90 ни мерљиву активност у ћелијама. Једињење (59) заузимало је средишњу, али и даље неповољну позицију, јер је било једини НуТ молекул изведен из бензонитрила са мерљивим везивањем, али само слабо активан у СТГ тесту. Као што је већ наведено, главни изузетак од овог односа било је једињење (63), чији се ефекат у СТГ тесту, у одсуству мерљивог везивања у TR-FRET тесту, не може користити као доказ успешног деловања НуТ молекула усмереног на HSP90.

Табела 22. Структурне карактеристике, експериментални резултати и одабрана израчуната својства НуТ молекула (65) и (66) усмерених на HSP90 и изведених из бензамида

Једињење	(65)	(66)
Структура лиганда за HSP90		
Структура линкера		
Структура хидрофобног обележја		
$IC_{50} \pm SD$ [μ M]	$0,1075 \pm 0,0187$	$0,6472 \pm 0,0787$
$EC_{50} \pm SD$ [μ M]	$0,2114 \pm 0,0154$	$0,8570 \pm 0,0329$
$S \pm SD$ [μ g/mL]	$0,79 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,03$
$S \pm SD$ [μ M]	$1,37 \pm 0,07$	$1,09 \pm 0,04$
$P_{app} A-B \pm SD$ [nm/s]	$6,47 \pm 0,52$	$7,12 \pm 0,58$
$P_{app} B-A \pm SD$ [nm/s]	$2,24 \pm 0,35$	$2,12 \pm 0,32$
ER	0,35	0,30
M [g/mol]	573,77	615,85
$TPSA$ [\AA^2]	119,11	119,11
$NRotB$	12	15

Поређење полазних инхибитора и НуТ молекула стога носи јасну поруку из домена медицинске хемије. Посматрајући SNX-2112, конверзија у НуТ молекуле је ослабила укупну активност, али је није потпуно угрозила. Што се тиче инхибитора (37), његова конверзија у НуТ молекуле није анулирала основни недостатак бензонитрилног лиганда. У том смислу, тетраhydroиндазолски лиганди изведени из бензамида нису били само нешто бољи од оних изведених из бензонитрила, већ су у контексту НуТ молекула били боље полазне тачке за дизајн молекула усмерених ка HSP90. Укупно, свака предност бензонитрилног скелета заснована на физичко-хемијским и фармакокинетичким својствима била је надјачана недовољним очувањем афинитета за циљни протеин, док је бензамидни скелет дао НуТ молекуле са истовремено значајним везивањем за HSP90 и активношћу у ћелијама.

4.2.2. Односи између структуре, својстава и активности кроз комплетан скуп података за НуТ молекуле усмерене на HSP90

Посматрано из угла физичко-хемијских својстава, НуТ молекули заузимали су међупростор између полазних инхибитора и знатно већих PROTAC молекула усмерених на HSP90 разматраних у Одељку 4.1. Сви НуТ молекули имали су моларне масе од 541,73 до 615,85 g/mol, тополошке поларне површине од 99,81 до 119,11 \AA^2 и број ротирајућих веза од 10 до 15. Ово очигледно указује да су НуТ молекули мањи и мање поларни у односу на већ разматрене PROTAC молекуле усмерене на HSP90, где су се моларне масе кретале од 621,69 до 953,80 g/mol, а $TPSA$ вредности од 166,29 до 298,65 \AA^2 . Ипак, НуТ молекули се налазе изван физичко-хемијског простора који заузимају сами полазни инхибитори. Експериментални подаци показују практичну последицу тог померања. У односу на SNX-2112 и једињење (37), сви НуТ молекули показали су драстичан пад растворљивости и изражен губитак S_{aco-2} пермеабилности. Измерене растворљивости пале су на 0,51-1,37 μ M за НуТ молекуле, у поређењу са 79,73 μ M за SNX-2112 и 119,19 μ M за једињење (37). Исто тако, $P_{app} A-B$ вредност је код НуТ молекула опала на 1,78-7,12 nm/s, док су полазни инхибитори показали 64,69, односно 120,02 nm/s.

Према софтверу *SwissADME*, сви НуТ молекули имали су по једно одступање од Липинскијевих правила. Само је једињење (59) остало у потпуности у складу са Веберовим

критеријумима, а преосталих пет НуТ молекула имало је по једно одступање. За све НуТ молекуле предвиђено је да не пролазе крвно-мождану баријеру и да су супстрати Р-гликопротеина (Р-гр). Предвиђено је да гастроинтестинална апсорпција буде ниска за пет једињења, а висока само за једињење (63). Ипак, ови дескриптори нису се могли јасно довести у везу са биолошким резултатима. Једињење (59), једини НуТ молекул у складу са Веберовим критеријумима, било је слабо активно. За најбољи НуТ молекул у целом скупу, једињење (65), предвиђена је ниска гастроинтестинална апсорпција и једно одступање од Веберових критеријума. Према томе, ова серија додатно потврђује исти принцип који је већ уочен код PROTAC молекула, а то је да се конвенционалним правилима која дефинишу сличност леку не могу идентификовати најпогоднији молекули.

Експериментално добијени подаци о пермеабилности дају важне детаље. Иако је за све НуТ молекуле предвиђено да су супстрати Р-гр-а, добијени коефицијенти ефлукса били су ниски и кретали су се само од 0,30 до 0,63. У практичном смислу, то значи да изражен нето ефлукс није био доминантан транспортни проблем у условима теста на Сасо-2 ћелијама. Веће ограничење је једноставно био низак укупни флукс. Ово је нарочито јасно у бензонитрилној групи једињења, где су се $P_{app} A-B$ вредности груписале око 1,78-2,32 nm/s. Једињења изведена из бензамида имала су повећану вредност $P_{app} A-B$ у опсегу 6-7 nm/s, и то је заиста било праћено најбољим вредностима у СТГ тесту у серији НуТ молекула, али ни овде побољшање повезано са пермеабилношћу само по себи није било довољно. Једињење (66) је незнатно надмашило једињење (65) по вредности $P_{app} A-B$, али је упркос томе било знатно слабије и у TR-FRET и у СТГ тесту.

Треба размотрити и односе између липофилности и растворљивости. НуТ молекули изведени из бензонитрила заиста су показали нешто ниже $\log P$ вредности када су уведени линкери слични ПЕГ-у, нарочито код једињења (63), а дужи аналог који садржи ПЕГ, једињење (64), показао је највећу измерену растворљивост унутар те подгрупе. Међутим, ове промене нису омогућиле везивање за HSP90 нити донеле корист на ћелијском нивоу. У бензамидној серији, за липофилније и веће једињење (66) је измерена мања растворљивост и оно је заиста показало слабије перформансе од једињења (65), али се боља активност једињења (65) ипак не треба објашњавати само једним дескриптором физичко-хемијских особина.

4.2.3. Образложење изостанка Western blot анализе

У оквиру ове дисертације, Western blot анализа била је намењена једињењима која би показала велику вероватноћу да пруже биолошки значајну предност услед деградације циљног протеина у односу на референтне полазне инхибиторе. Резултати добијени за НуТ молекуле нису пружили тај ниво приоритизације. Што је најважније, ниједан НуТ молекул није се приближио потентности SNX-2112 у ћелијама, нити је иједан испољио фенотип који би јасно указивао на механистичку предност, тј. деградацију циљног протеина, у односу на класичну инхибицију HSP90. Чак је и најбољи НуТ молекул, једињење (65), остао далеко слабији од полазног бензамидног инхибитора у СТГ тесту. НуТ молекули изведени из бензонитрила били су још мање уверљиви, пошто су њихови ефекти у ћелијама углавном били слаби, а везивање за HSP90 у биохемијском тесту слабо или одсутно. У таквим околностима било је разумно закључити да расположиви експериментални подаци не оправдавају даље механистичко испитивање користећи Western blot анализу. Ипак, одсуство резултата добијених овом методом не доказује да је деградација HSP90 изостала. То само значи да, на основу резултата СТГ теста, серија НуТ молекула се није показала довољно уверљивом за такво даље испитивање.

4.2.4. Укупни закључци о НуТ молекулима усмереним на HSP90

Узето заједно, резултати за НуТ молекуле усмерене на HSP90 подржавају следеће закључке:

- 1) У контексту НуТ молекула заснованих на тетрахидроиндазолу, бензамидни лиганд био је јасно супериоран у односу на бензонитрилну алтернативу.

2) НуТ молекули нису превазишли слабо везивање за HSP90 лиганда изведеног из бензонитрила. У најбољем случају, показали су само слабо мерљиво везивање, као код једињења (59), док су остали чланови ове групе остали биохемијски неактивни у испитиваном опсегу концентрација.

3) Ефекти линкера били су очигледни. Умерено продужење линкера од једињења (59) до (60) било је неповољно, продужење у оквиру бензонитрилне групе једињења која садрже линкере сличне ПЕГ-у није побољшало активност, а прекомерно продужење линкера од једињења (65) до (66) јасно је ослабило најуспешнији бензамидни НуТ молекул.

4) Укупни однос између резултата који се тичу везивања за HSP90 и резултата који се тичу ефеката у ћелијама био је доследан по смеру, али не и апсолутан, при чему је једињење (63) остало изузетак.

У практичном смислу, једињење (65) издвојило се као молекул који најубедљивије потврђује основни концепт у серији, јер је задржало субмикромоларно везивање за HSP90 и пружио најјачи одговор у СТГ тесту међу НуТ молекулима. Упркос томе, серија као целина није произвела довољно снажан одговор у ћелијама да би оправдала тврдњу о успешној деградацији HSP90. Овај скуп података за НуТ молекуле показује да дизајн молекула за хидрофобно обележавање усмерених на HSP90 није некомпатибилан са скелетом тетрахидроиндазола, али такође показује да активност у великој мери зависи од очувања потентног лиганда за HSP90 заснованог на бензамиду и пажљивог дизајна линкера.

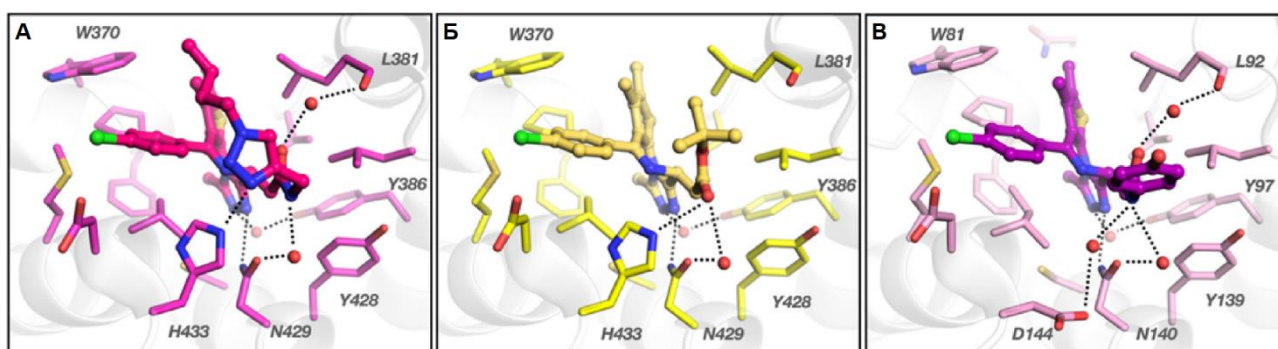
4.3. Једињења усмерена на ВЕТ протеине

У овом одељку приказани су резултати испитивања једињења усмерених на ВЕТ протеине, са нагласком на структурно објашњење повећаног афинитета у региону лиганда који препознаје бромодомене ВЕТ протеина. Кристалографска анализа PROTAC молекула (71) (Слика 53) усмереног на ВЕТ протеине открила је да су највећа повећања афинитета резултат додатних интеракција у близини амида, а не у самом дисталном сегменту деградера [158]. Ово запажање представља полазиште за тумачење резултата добијених за амидне деривате (+)-JQ1, јер усмерава анализу ка амидном делу молекула као месту чија модификација може да допринесе препознавању бромодомена. У наставку су разматрани амиди синтетисани из (+)-JQ1-CO₂H и структурно разноврсних амина, што је омогућило директно поређење са полазним инхибитором (+)-JQ1 и референтним амидом бирабресибом. Експериментални резултати омогућавају да се почетно кристалографско запажање повеже са целокупним профилем серије, од афинитета према бромодоменима, до избора једињења које најповољније обједињује потентност и фармакокинетичка својства.

4.3.1. Оптимизација амида изведених из (+)-JQ1 помоћу кристалографских података

Као што је наведено у Одељку 3.6., полазна концептуална тачка овог дела истраживања била је развој PROTAC молекула усмерених на ВЕТ протеине заснованих на (+)-JQ1. Међутим, кристалографска анализа (Слика 60А) репрезентативног деградера, једињења (71), показала је да се његово побољшано везивање за бромодомене може конкретно приписати амид-триазолском сегменту региона који се везује за ВЕТ протеине, а не дисталном делу молекула који регрутује Е3 лигазу. У комплексу са BRD2(BD2), једињење (71) задржало је општи начин везивања карактеристичан за (+)-JQ1 (Слика 60Б), али је имало додатне контакте који нису били присутни код полазног инхибитора, пре свега мрежу водоничних веза премошћену молекулима воде, која укључује амидну -NH- групу и Asn429, амидни карбонил и Leu381, као и додатну водоничну везу између амидног региона који садржи триазол и His433. За поређење, (+)-JQ1 је задржао одговарајући основни образац интеракција, али му је недостајала интеракција са Leu381, што указује на то да је повећање афинитета код једињења (71) било повезано са новоформираном мрежом контаката у близини амида, а не са другачијим укупним

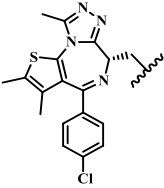

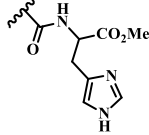
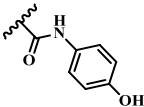
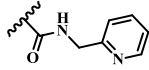
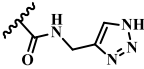
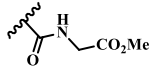
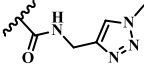
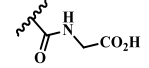
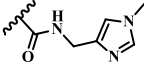
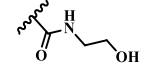
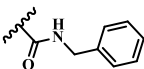
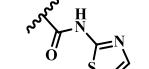
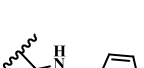
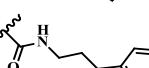

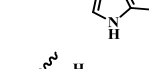
положајем у месту везивања. Бирабресиб је такође заузимао аналогну позицију везивања за бромодомене усредсређену на амидну функционалну групу, али се његов образац интеракција разликовао од оног код једињења (71), при чему га је карактерисала сложенија мрежа водоничних веза посредованих водом која укључује Leu92, Asn140 и Asp144 у BRD4(BD1), док је његова фенолна група била усмерена ка растварачу (Слика 60В). Узето заједно, ове структуре указале су да је одлучујућа карактеристика једињења (71), која је повећавала афинитет, био редизајнирани амид-триазолски регион који заузима подцеп суседан језгру (+)-JQ1, док је деградерски сегмент који садржи талидомид показивао слабу електронску густину и није му се могао приписати јасан допринос везивању. Овај резултат померио је фокус експеримената са даље разраде деградера ка оптимизацији моновалентних амида изведених из (+)-JQ1 на основу структурних података.



Слика 60. Поређење начина везивања лиганата за BET протеине за бромодомене. Кристална структура BRD2(BD2) у комплексу са **A**) једињењем (71) (PDB код: 6WWB [158]) и **Б**) (+)-JQ1 (PDB код: 3ONI [362]), као и кристална структура BRD4(BD1) у комплексу са **В**) бирабресибом (PDB код: 5WMD [401]). Водоничне везе приказане су испрекиданим линијама, а молекули воде црвеним сферама.

Серија амида изведених из (+)-JQ1, једињења (72)-(85) (Табела 23), синтетисана је из (+)-JQ1-CO₂H и одабраних амина тако да је језгро (+)-JQ1 остало очувано, док је вариран амидни супституент. Избор супституената обухватио је алифатичне и ароматичне фрагменте како би се испитало у којој мери природа групе везане за амид утиче на препознавање бромодомена BET протеина и на активност у ћелијама. Оваквом варијацијом било је могуће раздвојити допринос самог скелета (+)-JQ1 од доприноса амидног региона и проценити да ли промена величине, облика и поларности амидног супституента може да доведе до повољнијег свеукупног профила резултујућих једињења у односу на полазни инхибитор (+)-JQ1 и референтни амид бирабресиб.

Табела 23. Естарски и амидни супституенти скупа испитиваних једињења усмерених на ВЕТ протеине

			
Једињење	Супституент	Једињење	Супституент
(+)-JQ1		(78)	
Бирабресиб		(79)	
(72)		(80)	
(73)		(81)	
(74)		(82)	
(75)		(83)	
(76)		(84)	
(77)		(85)	

4.3.2. Трендови везивања за бромодомене амида изведених из (+)-JQ1

Скуп података добијених TR-FRET тестом за BRD2(BD1), BRD2(BD2), BRD4(BD1) и BRD4(BD2) представљао је биохемијски панел за процену афинитета амида изведених из (+)-JQ1 према бромодоменима ВЕТ протеина (Табела 24). Изабрани су BRD2 и BRD4, јер представљају два добро валидирана члана ВЕТ породице у контексту патолошки релевантне транскрипционе регулације и фармаколошке модулације ВЕТ протеина. BRD4 је посебно значајан као централни ВЕТ протеин у регулацији онкогене транскрипције, укључујући програме у хематолошким малигнитетима зависне од *MYC* онкогена [363], док је BRD2 повезан са контролом пролиферације [443] и транскрипционих одговора повезаних са инфламацијом [444]. Поред селективности између појединачних ВЕТ протеина, селективност према BD1 или BD2 има посебан значај, јер ова два бромодомена не доприносе истоветно регулацији транскрипције. На пример, показано је да је BD1 превасходно важан за одржавање стабилних програма експресије гена, док брзо повећање експресије гена изазвано инфламаторним стимулусима захтева функционални допринос и BD1 и BD2 [445]. Осим тога, фармаколошко разликовање BD1 и BD2 може довести до различитих биолошких и терапијских профила инхибитора ВЕТ протеина, јер селективно циљање једног од ова два домена може променити однос између ефикасности, ефекта на транскрипцију и безбедности у поређењу са инхибиторима који подједнако делују на оба бромодомена [446]. Због тога је истовремено испитивање оба бромодомена BRD2 и BRD4 протеина омогућило да се активност нових деривата процени не само на два биолошки и фармаколошки релевантна ВЕТ протеина, већ и

у односу на њихову преференцију према BD1 и BD2. Експериментални резултати одмах откривају две опште карактеристике ове серије. Прво, једињења су показала генерално већи афинитет за BD2 него за BD1, при чему су многа једињења достигала субнаномоларну активност према једном или оба BD2. Друго, амиди који садрже хетероциклус јасно су надмашили хемијски простор полазних инхибитора. Нарочито је неколико једињења надмашило и (+)-JQ1 и бирабресиб, показујући да амидни регион скелета (+)-JQ1 није само место које толерише модификацију, већ да се може искористити и за побољшање афинитета ка бромодоменима.

Табела 24. Афинитети за бромодомене ВЕТ протеина амида изведених из (+)-JQ1 и референтних инхибитора одређени TR-FRET тестом

Једињење	$IC_{50} \pm SD$ [nM]			
	BRD2(BD1)	BRD2(BD2)	BRD4(BD1)	BRD4(BD2)
(+)-JQ1	0,0285 ± 0,0064	0,0095 ± 0,0008	0,0482 ± 0,0079	0,0132 ± 0,0039
Бирабресиб	0,0587 ± 0,0282	0,0032 ± 0,0019	0,1810 ± 0,0353	0,0098 ± 0,0042
(72)	0,0086 ± 0,0018	0,0018 ± 0,0008	0,0790 ± 0,0079	0,0013 ± 0,0003
(73)	0,6396 ± 0,3168	0,1616 ± 0,0315	1,4127 ± 0,1232	0,0261 ± 0,0043
(74)	0,0176 ± 0,0074	0,0030 ± 0,0010	0,0823 ± 0,0053	0,0006 ± 0,0006
(75)	0,0218 ± 0,0276	0,0002 ± 0,0002	0,7251 ± 0,0701	0,0003 ± 0,0001
(76)	0,0031 ± 0,0019	0,0001 ± 0	0,0057 ± 0,0008	0,0002 ± 0,0001
(77)	0,0092 ± 0,0044	0,0001 ± 0,0001	0,0104 ± 0,0012	0,0003 ± 0,0001
(78)	0,0321 ± 0,0123	0,0096 ± 0,0036	0,0346 ± 0,0022	0,0066 ± 0,0028
(79)	0,0164 ± 0,0021	0,0003 ± 0,0003	0,0405 ± 0,0024	0,0007 ± 0,0003
(80)	0,0034 ± 0,0014	< 0,0001	0,0028 ± 0,0004	< 0,0001
(81)	0,1468 ± 0,0381	0,0003 ± 0,0002	0,1058 ± 0,0047	0,0004 ± 0,0001
(82)	0,0222 ± 0,0085	0,0025 ± 0,0010	0,0212 ± 0,0018	0,0033 ± 0,0004
(83)	0,0109 ± 0,0041	0,0026 ± 0,0008	0,5138 ± 0,0513	0,0016 ± 0,0004
(84)	0,2529 ± 0,0542	0,0505 ± 0,0193	0,7401 ± 0,1958	0,0600 ± 0,0125
(85)	0,0016 ± 0,0010	0,0001 ± 0,0001	0,0065 ± 0,0017	0,0002 ± 0,0001

У оквиру целокупног скупа, једињење (85) издвојило се као најпотентнији и унутар серије најконзистентнији лиганд за BRD2 и BRD4. Његова IC_{50} вредност за BRD2(BD1) од 0,0016 μ M била је приближно 17,7 пута нижа од оне за (+)-JQ1 и приближно 36,4 пута нижа од оне за бирабресиб, док је његова IC_{50} вредност за BRD4(BD1) од 0,0065 μ M представљала приближно 7,4 пута, односно 27,7 пута побољшање у односу на исте контроле. Иако су и једињења (76) и (80) такође показала изванредну биохемијску активност, посебно према BD2, једињење (85) се издвојило тиме што је задржало уједначено високу потентност у сва четири теста.

Анализа резултата приказаних у Табели 24 омогућава увид у односе структуре и активности. Једињење (72), које носи несупституисану триазол-4-илметил групу, задржало је снажну активност, док је *N*-метилација присутна у једињењу (73) довела до израженог губитка потентности у сва четири теста. Међутим, поређење једињења (73) и (74) показује да овај ефекат не треба тумачити искључиво као последицу присуства *N*-метил групе. Оба једињења садрже *N*-метиловани петочлани прстен повезан преко метиленске групе, али је *N*-метилимидазолски аналог (74) био знатно потентнији од *N*-метилтриазолског аналога (73). Тако је једињење (74) имало ниже IC_{50} вредности у сва четири теста. Ово указује да пад активности код једињења (73) није био условљен само *N*-метилацијом, већ и специфичном природом и распоредом атома азота у *N*-метил-1,2,3-триазолском прстену.

Додатно, поређење између пиридилних и бензилних деривата показује да је увођење хетероатома, а не само увођење прстена као таквог, било повољно. Једињење (79) било је само умерено потентније од бензилног аналога (75) у тесту са BRD2(BD1), али је било изразито потентније у тесту са BRD4(BD1), што указује да присуство хетероатома може преобликовати образац интеракција и тако утицати на афинитете ка појединим бромодоменима.

Амиди који садрже петочлане хетероцикле показали су се посебно повољним. Једињења (76) и (77) су показала снажно везивање за BRD2 и BRD4, са нарочитим афинитетом према BD2, док је једињење (83) потврдило да и хетероциклус директно везан за амид може веома повољно утицати. Поређење једињења (77) и (83) додатно прецизира овај закључак. Једињење (77) садржи оксазол-2-илметил групу, док је код једињења (83) тиазолски прстен директно везан за амид. Због тога се ова два једињења не разликују само по врсти хетероцикла, већ и по начину његовог повезивања са амидом. Иако је једињење (83) задржало снажан афинитет у појединим тестовима, једињење (77) је било повољније у ширем биохемијском профилу, нарочито у тестовима са BRD2(BD2) и BRD4(BD1). Ово показује да директно везивање хетероцикла за амид може бити корисно, али да метилени мост присутан у једињењу (77), заједно са распоредом хетероатома у оксазолу, обезбеђује повољнији образац активности у односу на тиазолски аналог (83). Међутим, поређење између једињења (83) и (85) дало је нарочит увид. Замена тиазола 1,3,4-тиадиазолом претворила је веома добар лиганд у најуравнотеженије једињење у читавом скупу, што указује да су додатни атом азота и/или измењена оријентација низа хетероатома обезбедили повољнију геометрију интеракција.

Деривати изведени из аминокиселина, једињења (78), (80) и (81), показали су да овај тип супституената може дати различите резултате TR-FRET тесту у зависности од особина бочног ланца. Једињење (78), дериват хистидин-метил-естра, задржало је снажан афинитет ка бромодоменима у сва четири теста, али није достигло потентност једноставнијег аналога глицин-метил-естра (80). Пошто оба једињења садрже метил-естар, ова разлика указује да увођење имидазолметил бочног ланца код једињења (78) није било повољно у TR-FRET тесту у односу на мањи глицински супституент. Најповољнији профил у овој подгрупи имало је једињење (80), које је задржало веома ниске IC_{50} вредности у тестовима са оба BD1, а нарочито према оба BD2. Поређење једињења (80) и (81) додатно наглашава значај естарске функционалне групе. Замена метил-естра слободном карбоксилном киселином довела је до израженог слабљења активности у тестовима са BRD2(BD1) и BRD4(BD1), док је афинитет према BRD2(BD2) и BRD4(BD2) остао снажан. Ово показује да слободна карбоксилна киселина није у потпуности неповољна, али да нарушава профил селективности ка BD1 и BD2 који је постигнут код метил-естра (80).

4.3.3. Антипролиферативна активност амида изведених из (+)-JQ1

Након процене афинитета амида изведених из (+)-JQ1 према изолованим бромодоменима ВЕТ протеина, следећи корак био је да се испита у којој мери се биохемијска потентност ових једињења преводи у антипролиферативни ефекат (Табела 25). Панел ћелијских линија за СТГ тест изабран је тако да обухвати моделе леукемије (NALM-16, MV4-11, MOLM-13) и медулобластома (HD-MB03 и D283), односно два малигна контекста релевантна за испитивање антипролиферативне активности инхибитора ВЕТ протеина. Линије леукемије [447,448] и медулобластома [449,450] су одабране због познате улоге ВЕТ протеина у одржавању програма транскрипције у овим малигнитетима. Линије медулобластома су укључене и како би се активност једињења проценила у моделима педијатријских солидних тумора, чиме је панел проширен изван хематолошких малигнитета. Оваквим избором ћелијских линија омогућено је да се антипролиферативни ефекат амида изведених из (+)-JQ1 испита у више ћелијских линија осетљивих на инхибицију ВЕТ протеина, уз поређење осетљивости између различитих типова малигних ћелија.

Табела 25. Антипролиферативна активност амида изведених из (+)-JQ1 и референтних инхибитора у педијатријским ћелијским линијама леукемије и медулобластома одређена CTG тестом

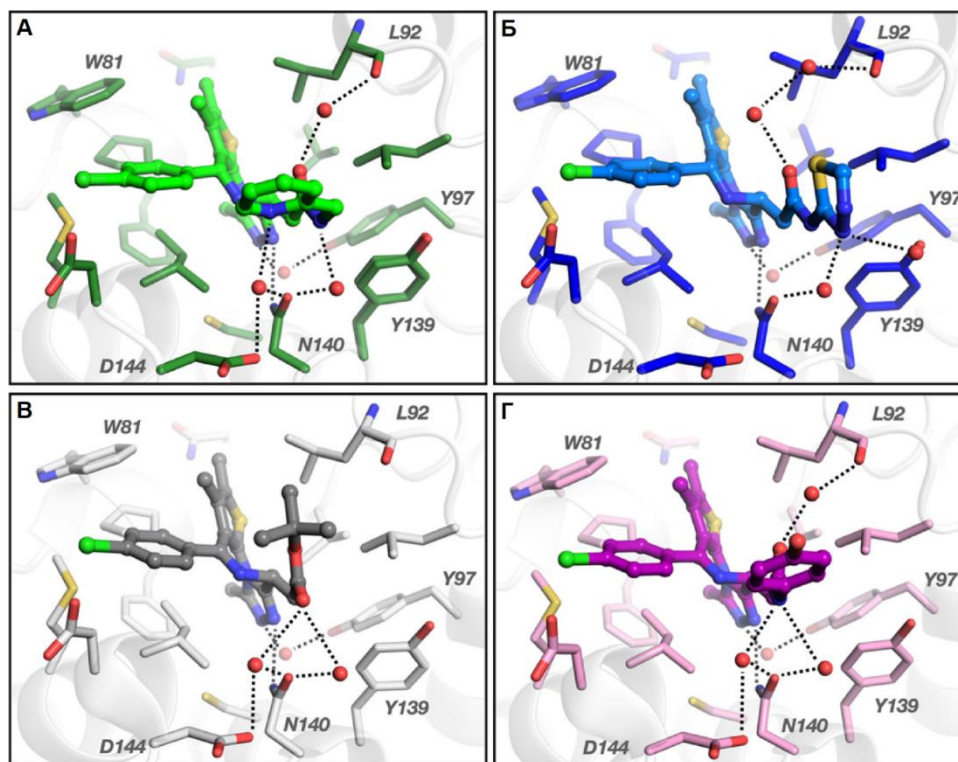
Једињење	<i>EC₅₀ ± SD [nM]</i>				
	HD-MB03	NALM-16	MV4-11	D283	MOLM-13
(+)-JQ1	0,0903 ± 0,0122	0,0189 ± 0,0097	0,0989 ± 0,0431	0,0609 ± 0,0284	0,0247 ± 0,0017
Бирабресиб	0,1343 ± 0,1121	0,0140 ± 0,0059	0,0219 ± 0,1127	0,0669 ± 0,0136	0,0112 ± 0,0018
(72)	0,0038 ± 0,0001	0,0073 ± 0,0024	0,2530 ± 0,2271	0,9645 ± 0,4576	0,0035 ± 0,0005
(73)	0,0407 ± 0,0566	0,0145 ± 0,0098	0,0592 ± 0,0208	0,2275 ± 0,0277	0,0110 ± 0,0011
(74)	0,3589 ± 0,2602	0,0938 ± 0,0443	0,1432 ± 0,1465	0,7892 ± 0,2057	0,0526 ± 0,0045
(75)	0,6190 ± 0,0046	0,4524 ± 0,2343	0,7292 ± 0,3435	0,5763 ± 0,0329	0,3857 ± 0,0183
(76)	0,0173 ± 0,0056	0,0121 ± 0,0008	0,0319 ± 0,0140	0,0252 ± 0,0004	0,0147 ± 0,0021
(77)	0,0010 ± 0,0004	0,0008 ± 0,0001	0,0176 ± 0,1412	0,0187 ± 0,0091	0,0022 ± 0,0004
(78)	1,2443 ± 1,0880	0,7914 ± 0,2303	1,1379 ± 0,5454	2,9340 ± 1,1331	0,2002 ± 0,0275
(79)	0,2630 ± 0,0815	0,0148 ± 0,0092	0,4442 ± 0,3734	0,2280 ± 0,1966	0,0089 ± 0,0030
(80)	0,3592 ± 0,4696	0,0164 ± 0,0143	0,2972 ± 0,2325	0,3374 ± 0,1923	0,0099 ± 0,0022
(81)	9,3408 ± 2,2057	> 8,8486	3,0552 ± 1,0056	> 8,8486	2,4027 ± 0,1292
(82)	0,0427 ± 0,0435	0,0071 ± 0,0057	0,0333 ± 0,1549	0,4132 ± 0,1229	0,0088 ± 0,0013
(83)	0,0046 ± 0,0040	0,0064 ± 0,0007	0,0398 ± 0,1605	0,1493 ± 0,0347	0,0220 ± 0,0077
(84)	0,2546 ± 0,1908	0,1723 ± 0,1179	0,1816 ± 0,0795	0,7492 ± 0,0581	0,3189 ± 0,0721
(85)	0,0066 ± 0,0006	0,0036 ± 0,0008	0,0200 ± 0,0439	0,0562 ± 0,0473	0,0102 ± 0,0011

Линија медулобластома HD-MB03 и линија акутне леукемије NALM-16 показале су се као најосетљивије у овом панелу. У оба случаја једињење (77) било је појединачно најпотентнији аналог, са EC_{50} вредностима од 0,001 μM у HD-MB03 и 0,0008 μM у NALM-16. У односу на бирабресиб, то одговара приближно 134 пута јачој активности у HD-MB03 и приближно 17,5 пута јачој активности у NALM-16. Једињење (85) је такође било високо активно у обе линије, са EC_{50} вредностима од 0,0066 и 0,0036 μM , док су једињења (72) и (83) додатно потврдила да стратегија хетероцикличног амида може да значајно побољша активност у ћелијама у односу на референтна једињења у одабраним биолошким контекстима. Овакав тренд није био подједнако изражен у свакој ћелијској линији. У MV4-11 је показан много ужи распон активности међу водећим једињењима. У том моделу, једињења (77) и (85) и даље су била најактивнији амиди, али су њихове EC_{50} вредности биле блиске вредности за бирабресиб и само умерено боље од вредности за (+)-JQ1. Ћелијска линија D283 је, такође, пружила одговарајуће закључке. Овде су једињења (77) и (76) била најпотентнија једињења, док је једињење (85) било само умерено боље од референтних инхибитора. Ови резултати говоре против претерано поједностављеног тумачења према којем би најпотентнији лиганд за бромодомене нужно доминирао у сваком ћелијском контексту. Уместо тога, скуп података указује на равнотежу између везивања за циљне протеине и понашања једињења у погледу биолошке активности зависну од биолошког контекста. Неколико појединачних поређења додатно наглашава тај закључак. Једињење (72) илуструје профил у коме су одличне перформансе у HD-MB03, NALM-16 и MOLM-13 коегзистирале са веома слабом активношћу у D283 и само умереном активношћу у MV4-11. Једињење (82) је упадљиво из супротног разлога, јер иако је биохемијски било мање потентно од једињења (76), (77) или (85), остало је снажно активно у неколико ћелијских линија, што указује да су перформансе у ћелијама могле бити очуване чак и без заузимања апсолутно највишег нивоа резултата у TR-FRET тесту. Најјасније неподударање између биохемијских и ћелијских података уочено је у огранку деривата изведених из аминокиселина. Једињење (80), а у мањој мери и једињења (78) и (81), веома добро су се везивала за бромодомене ВЕТ протеина, али су прилично изгубила потентност у ћелијама. То води закључку да подложност хидролитичкој трансформацији и изразита поларност једињења услед присуства карбоксилне киселине могу допринети овом неподударању.

Свеукупно, јаче биохемијско везивање преводило се у бољу ћелијску активност, али тај однос није био апсолутан. Биохемијски најуспешнији лиганди углавном су били груписани међу активнијим једињењима у СТГ тесту, а неколико амида јасно је надмашило један или оба референтна инхибитора у више педијатријских ћелијских линија канцера. Истовремено, скуп података такође показује да афинитет према бромодоменима сам по себи није гарантовао најповољнији профил у ћелијама, што ову серију чини посебно корисном за разликовање чисте оптимизације везивања за бромодомене од понашања које заиста одговара водећем једињењу. Узето заједно, подаци из испитивања активности у ћелијама издвајају два једињења као посебно важна, али из различитих разлога. Једињење (77) било је најпотентније у најосетљивијим ћелијским моделима и стога дефинише горњу границу биолошке ефикасности постигнуте у овој серији. Једињење (85), међутим, објединило је скоро најбољу ћелијску активност са најјачим укупним афинитетом за бромодомене. Ова разлика објашњава зашто је једињење (77) било најупечатљивији пример потентности, док је једињење (85) постало водеће једињење за даље профилисање.

4.3.4. Кристалографска анализа референтних и одабраних инхибитора ВЕТ протеина

Кристалографска студија (Слика 61) била је усмерена на једињења (79) и (85) која су одабрана као репрезентативни чланови амида изведених из (+)-JQ1 за структурну анализу високе резолуције у комплексу са BRD4(BD1). Оваква анализа пружила је основу за тумачење односа структуре и активности.



Слика 61. Ко-кристалне структуре високе резолуције одабраних амида изведених из (+)-JQ1 и референтних лиганата за ВЕТ протеине везаних за бромодомене. Кристална структура BRD4(BD1) у комплексу са **А**) једињењем (79) (PDB код: 7RN2 [400]), **Б**) једињењем (85) (PDB код: 7RMD [400]), **В**) (+)-JQ1 (PDB код: 3MXF [362]) и **Г**) бирабресибом (PDB код: 5WMD [401]). Панели илуструју уобичајено постављање диазепинског језгра које се везује за ВЕТ протеине и истичу разлике у региону интеракција у непосредној близини амида, нарочито контакте посредоване водом који укључују Asn140, Leu92, Asp144 и Tyr139. Водоничне везе приказане су испрекиданом линијама, а молекули воде црвеним сферама.

Може се видети да су синтетисани амиди задржали уобичајени начин везивања диазепинског језгра за бромодомене и заузимали суштински исти регион места за везивање као (+)-JQ1 и бирабресиб, што указује на то да побољшана активност ове серије није проистекла из новог позиционирања лиганата. Уместо тога, структурне разлике биле су локализоване у региону амидног супституента који се простире ка ZA и BC петљама на ободу цепа бромодомена и успоставља додатне контакте изван оних који су доступни (+)-JQ1. Дакле, оптимизацијом није замењен постојећи начин на који (+)-JQ1 препознаје бромодомене, већ је ово очувано уз истовремено побољшање начина на који амидни супституент интерагује са спољашњом, растварачу изложеном ивицом жлеба за везивање лиганата. Конкретније, и једињење (79) и једињење (85) одржавају директну водоничну везу између амидне -NH- групе и Asn140 у BC петљи, као што је уочено и код (+)-JQ1 и бирабресиба. Стога је очувана интеракција усмерена ка Asn140 присутна код сва четири лиганда. Кључно структурно разликање почиње изван ове заједничке интеракције, јер су амидни супституенти једињења (79) и једињења (85) различито оријентисани и на различите начине укључени у локалну мрежу водоничних веза посредованих водом.

Код једињења (79), амидни супституент који садржи пиридин постављен је тако да иначе присутан молекул воде повезан са карбонилном групом Asn140 интерагује са секундарним амидом, док азот пиридина учествује преко другог молекула воде у додатној мрежи која укључује карбонилну групу Asn140 и Asp144. У истој структури, амидна карбонилна група је даље повезана, преко интеракције посредоване водом, са кисеоником главног ланца остатка Leu92 у ZA петљи. Сходно томе, једињење (79) задржава уобичајени образац везивања за бромодомене, али га проширује додатном мрежом поларних контаката у региону петљи.

Код једињења (85), образац интеракција је реорганизован. Овде иначе присутан молекул воде повезан са карбонилном групом Asn140 више не интерагује са секундарним амидом на исти начин као код једињења (79), већ уместо тога ступа у интеракцију са азотом тиадиазола. Насупрот једињењу (79), једињење (85) не задржава другу интеракцију посредовану водом која укључује Asp144. Међутим, овај губитак је компензован појавом карактеристичне интеракције посредоване водом са Tyr139 у BC петљи, што представља јединствено обележје комплекса са једињењем (85). Поред тога, контакт између амидне карбонилне групе лиганда и Leu92 и даље је присутан, али је код једињења (85) за ову везу потребна мрежа од два молекула воде, док се код једињења (79) она остварује преко једног воденог моста. Дакле, иако оба лиганда користе исту ивицу цепа, они то чине посредством различитих геометрија водене мреже и различитог распореда хетероатома.

Ове структуре такође разјашњавају по чему се ова два амида разликују од референтних лиганата. У односу на (+)-JQ1, и једињење (79) и једињење (85) задржавају исту оријентацију језгра у бромодоменима, али уносе већу сложеност интеракција у региону у непосредној близини амида. Код (+)-JQ1 изостаје интеракција са Leu92 која се уочава код једињења (79), као и код једињења (85) преко два молекула воде. Поред тога, иако (+)-JQ1 интерагује са Asn140 преко молекула воде, ово једињење не испољава проширене обрасце интеракција које посредују пиридилни или тиадиазолилни амидни супституенти у једињењима (79) и (85). У односу на бирабресиб, поређење је другачије. Бирабресиб заузима аналогну укупну позицију и има компликованији образац водоничних веза посредованих водом него (+)-JQ1, укључујући контакте који обухватају Leu92, Asn140 и Asp144. У том контексту, једињење (79) више подсећа на бирабресиб, задржавајући мрежу повезану са Asp144 и мост ка Leu92, док се једињење (85) издваја јединственом интеракцијом са Tyr139. Стога, овај контакт са Tyr139 представља карактеристичну нову интеракцију уочену код једињења (85), не само у односу на једињење (79), већ и у односу на оба референтна лиганда. Узето заједно, ко-кристалне структуре показују да је побољшање потентности у овој серији произашло из очувања успостављене архитектуре везивања (+)-JQ1 и селективно додавање нових поларних контаката на ободу цепа, а не из промене фундаменталног начина препознавања бромодомена.

Ове структуре такође помажу да се објасни зашто је SAR био одређен распоредом хетероатома, а не простим присуством хетероцикала. Скоро еквивалентно понашање једињења **(75)** и **(79)** према BRD2(BD1), заједно са јасном супериорношћу једињења **(85)** у односу на **(83)**, показује да одлучујући фактор није било присуство азота у прстену, већ то да ли је супституент оријентисао образац донора и акцептора на начин који је могао смислено да учествује у локалној мрежи молекула воде и контактима са петљама. У том смислу, структурна биологија тесно се поклапа са емпиријским SAR-ом. Најбоља једињења била су она која су очувала уобичајени начин везивања (+)-JQ1, уз увођење пажљиво позиционираних поларних интеракција на ивици жлеба за везивање лигананда изложеној растварачу. Из перспективе медицинске хемије, овакве структурне информације су посебно интересантне зато што се поменути додатни контакти налазе на спољашњем ободу цепа бромодомена. То значи да интеракције које повећавају потентност и супституенти који модулишу својства не морају бити међусобно искључиви. Стога, амидни супституент није само детерминанта афинитета, већ и погодно место преко кога се може вршити даље унапређење ове класе једињења без нарушавања суштинског скелета за препознавање бромодомена заснованог на диазепину.

4.3.5. Односи између структуре, својстава и активности и тумачење физичко-хемијских и *in vitro* фармакокинетичких својстава

Значајно унапређена активност амида изведених из (+)-JQ1 отворила је потребу за широм карактеризацијом ових једињења, па су у следећем кораку проучаване њихове физичко-хемијске и *in vitro* фармакокинетичке особине. Први важан закључак јесте да је стратегија хетероцикличних амида често побољшавала растворљивост у односу на референтна једињења (Табела 26). Док су (+)-JQ1 и бирабресиб показали растворљивости од 37,45, односно 23,43 μM , неколико амида је те вредности значајно премашило, укључујући једињења **(73)** (80,83 μM), **(82)** (76,09 μM), **(79)** (72,50 μM), **(78)** (68,40 μM), **(81)** (66,38 μM), **(74)** (65,71 μM), **(80)** (63,31 μM) и **(77)** (61,95 μM). То подржава централни концепт дизајна да се амидни супституент може искористити за побољшање физичко-хемијског профила скелета (+)-JQ1, а не само његовог афинитета. Међутим, та тенденција није била универзална, а изузеци су подједнако корисни. Једињење **(85)**, упркос томе што је водеће, имало је измерену растворљивост од свега 12,01 μM , веома блиску тиазолском аналогу **(83)** и јасно нижу од оне код многих других хетероцикличних амида. Једињење **(84)** било је још мање растворљиво, са 1,94 μM . Дакле, скуп података показује да су побољшање растворљивости и побољшање потентности били делимично раздвојиве променљиве у оквиру ове серије.

Подаци о пермеабилности (Табела 26) пружају додатне увиде. У РАМРА тесту, најлипофилнија једињења показала су највећу пасивну пермеабилност, при чему су (+)-JQ1, као и аналоги који садрже бензилну групу и триптамин, били на врху скале. Међутим, та једињења нису била најефикаснији инхибитори у ћелијама. Што се тиче поларнијих хетероцикличних амида, понашање у Сасо-2 систему било је корисније. Овде су једињења **(76)** (150,34 nm/s), **(79)** (98,37 nm/s), **(80)** (63,76 nm/s) и нарочито **(85)** (66,46 nm/s) задржала значајан апикално-базолатерални транспорт, док су деривати богати поларним -NH- и -ОН групама, као што су једињења **(72)**, **(73)**, **(78)**, **(81)** и **(82)**, показали знатно слабији проток. Подаци о коефицијенту ефлукса су подједнако важни. Неколико иначе повољних аналога, укључујући једињења **(72)**, **(73)**, **(74)**, **(76)**, **(77)**, **(79)** и **(82)**, показало је значајан ефлукс, док је једињење **(85)** испољило знатно умеренију вредност од 2,71. Ова разлика је веома релевантна за тумачење зашто је једињење **(85)**, а не **(77)** или **(76)**, одабрано као водеће.

Табела 26. Растворљивост и пермеабилност амида изведених из (+)-JQ1 и референтних инхибитора

Једињење	$S \pm SD$ [$\mu\text{g/mL}$]	$S \pm SD$ [μM]	$P_{\text{PAMPA}} \pm SD$ [10^{-6} cm/s]	$R_{\text{PAMPA}} \pm SD$ [%]	$P_{\text{app A-B}} \pm SD$ [nm/s]	$P_{\text{app B-A}} \pm SD$ [nm/s]	ER
(+)-JQ1	17,11 \pm 0,34	37,45 \pm 0,74	> 1800	59,52 \pm 16,79	63,97 \pm 11,63	46,67 \pm 12,91	0,73
Бирабресиб	11,53 \pm 0,27	23,43 \pm 0,55	315,13 \pm 23,20	95,20 \pm 1,42	221,60 \pm 67,35	485,39 \pm 142,68	2,19
(72)	29,59 \pm 0,61	57,36 \pm 1,27	2,09 \pm 0,68	23,68 \pm 1,17	2,50 \pm 0,41	28,03 \pm 8,54	11,20
(73)	40,01 \pm 1,00	80,83 \pm 2,03	14,04 \pm 3,37	32,25 \pm 2,47	6,17 \pm 3,15	246,45 \pm 133,88	39,93
(74)	32,46 \pm 0,41	65,71 \pm 0,83	0	44,20 \pm 6,33	9,16 \pm 0,39	311,21 \pm 92,63	33,96
(75)	16,72 \pm 0,61	34,11 \pm 1,24	1797,07 \pm 277,74	71,66 \pm 11,23	42,20 \pm 14,58	44,51 \pm 13,17	1,05
(76)	27,38 \pm 0,78	56,93 \pm 1,61	274,52 \pm 41,45	65,06 \pm 1,82	150,34 \pm 40,42	777,89 \pm 185,65	5,17
(77)	29,80 \pm 2,38	61,95 \pm 4,95	97,17 \pm 7,28	61,69 \pm 1,68	30,39 \pm 7,46	297,37 \pm 55,89	9,79
(78)	37,76 \pm 2,60	68,40 \pm 4,72	0	33,64 \pm 0,78	7,74 \pm 10,38	14,18 \pm 5,75	1,83
(79)	35,60 \pm 0,17	72,50 \pm 0,35	177,45 \pm 20,63	74,32 \pm 3,59	98,37 \pm 9,55	568,43 \pm 106,65	5,78
(80)	29,88 \pm 0,31	63,31 \pm 0,66	231,31 \pm 53,54	47,45 \pm 5,58	63,76 \pm 8,53	307,31 \pm 35,59	4,82
(81)	30,40 \pm 0,54	66,38 \pm 1,18	0,54 \pm 0,93	8,52 \pm 0,26	4,51 \pm 0,95	7,81 \pm 5,20	1,73
(82)	33,78 \pm 0,95	76,09 \pm 2,14	20,80 \pm 1,19	31,11 \pm 1,22	6,98 \pm 0,95	83,32 \pm 15,08	11,94
(83)	5,99 \pm 3,05	12,41 \pm 6,32	544,83 \pm 34,50	80,49 \pm 1,47	19,10 \pm 12,38	41,09 \pm 8,55	2,15
(84)	1,06 \pm 0,03	1,94 \pm 0	> 1800	90,51 \pm 3,82	5,69 \pm 1,43	13,79 \pm 7,81	2,42
(85)	5,81 \pm 0,32	12,01 \pm 0,67	533,96 \pm 237,40	91,83 \pm 4,43	66,46 \pm 26,53	180,11 \pm 54,68	2,71

P_{PAMPA} – пермеабилност одређена PAMPA тестом; R_{PAMPA} – вредност *recovery* одређена PAMPA тестом

Везивање за протеине плазме (Табела 27) било је високо у читавом скупу и стога није значајно разликовало једињења. Насупрот томе, стабилност у плазми и PBS-у (Табела 27) била је генерално одлична и није открила значајну слабост серије у овом смислу, при чему је већина једињења, укључујући и (85), остала стабилна током временских оквира тестирања.

Табела 27. Везивање за протеине плазме, стабилност у плазми и стабилност у PBS-у амида изведених из (+)-JQ1 и референтних инхибитора

Једињење	$M\text{-PPB} \pm SD$ [%]	$H\text{-PPB} \pm SD$ [%]	$M\text{-PS} (t_{1/2}) \pm SD$ [сати]	$H\text{-PS} (t_{1/2}) \pm SD$ [сати]	$PBSS (t_{1/2}) \pm SD$ [сати]
(+)-JQ1	98,00 \pm 0,29	99,15 \pm 0,03	74,88 \pm 5,31	> 100	> 103
Бирабресиб	96,39 \pm 0,53	97,27 \pm 0,15	> 100	> 100	> 104
(72)	87,61 \pm 0,82	94,77 \pm 0,32	83,55 \pm 6,31	> 100	> 106
(73)	93,15 \pm 0,65	97,54 \pm 0,04	> 100	> 100	> 108
(74)	94,90 \pm 0,76	98,53 \pm 0,40	> 100	> 100	> 105
(75)	96,74 \pm 0,58	98,68 \pm 0,14	> 100	> 100	> 107
(76)	87,15 \pm 2,22	93,45 \pm 0,45	> 100	> 100	> 109
(77)	86,33 \pm 1,42	94,08 \pm 0,57	> 100	> 100	> 113
(78)	/*	92,68 \pm 0,71	0,36 \pm 0,01	24,70 \pm 0,72	> 115
(79)	90,60 \pm 0,54	97,21 \pm 0,24	> 100	> 100	> 110
(80)	/*	91,03 \pm 1,46	0,11 \pm 0	15,75 \pm 0,11	> 112
(81)	79,94 \pm 3,65	85,57 \pm 2,50	> 100	> 100	> 116
(82)	76,62 \pm 1,62	86,90 \pm 0,67	> 100	> 100	> 111
(83)	97,94 \pm 0,29	98,24 \pm 0,14	99,54 \pm 10,64	> 100	> 114
(84)	99,22 \pm 0,12	99,59 \pm 0,03	> 100	> 100	> 117
(85)	96,58 \pm 0,45	97,22 \pm 0,37	> 100	> 100	> 118

$M\text{-PPB}$ – везивање за протеине мишје плазме; $H\text{-PPB}$ – везивање за протеине хумане плазме; $M\text{-PS} (t_{1/2})$ – стабилност у мишјој плазми изражена као полуживот; $H\text{-PS} (t_{1/2})$ – стабилност у хуманој плазми изражена као полуживот; $PBSS (t_{1/2})$ – стабилност у PBS-у изражена као полуживот

*Једињења нису детектована у узорцима због слабе стабилности у мишјој плазми.

Метаболичка стабилност (Табела 28) била је знатно дискриминативнија. Полуживот једињења (85) у хуманим микрозомима износио је 3,19 сати, што је било недвосмислено супериорније у односу на (+)-JQ1 (0,41 сат) и бирабресиб (1,69 сати), а такође и знатно боље у односу на брзо метаболисане бензилне и пиридилне аналоге (75) (0,06 сати) и (79) (0,09 сати). Једињење (77) јесте показало бољу метаболичку стабилност у хуманим микрозомима од једињења (85), али

су му знатно виши коефицијент ефлукса и нижа пермеабилност ослабили укупни потенцијал. У том светлу, избор једињења **(85)** као водећег добро је поткрепљен. Оно није нужно било најбоље појединачно једињење по сваком изолованом показатељу, али је имало врхунску потентност према циљним протеинима са прихватљивом растворљивошћу, добрим проласком кроз мембрану, релативно ниским ефлуksom, одличном стабилношћу у плазми и побољшаном метаболичком стабилношћу у односу на оба референтна инхибитора.

Табела 28. Метаболичка стабилност амида изведених из (+)-JQ1 и референтних инхибитора

Једињење	<i>M-MS</i> ($t_{1/2}$) ± <i>SD</i> [сати]	<i>M-MS</i> (CL_{int}) [mL min ⁻¹ kg ⁻¹]	<i>H-MS</i> ($t_{1/2}$) ± <i>SD</i> [сати]	<i>H-MS</i> (CL_{int}) [mL min ⁻¹ kg ⁻¹]
(+)-JQ1	0,23 ± 0,01	244,76	0,41 ± 0,01	51,21
Бирабресиб	2,17 ± 0,13	26,36	1,69 ± 0,08	12,33
(72)	0,75 ± 0,03	76,70	0,58 ± 0,02	35,87
(73)	0,27 ± 0,02	214,48	0,54 ± 0,02	38,79
(74)	0,22 ± 0,01	256,30	0,49 ± 0,03	42,52
(75)	0,06 ± 0	975,91	0,06 ± 0	329,76
(76)	0,36 ± 0,01	157,63	0,35 ± 0,01	60,09
(77)	0,80 ± 0,04	71,21	5,78 ± 0,47	3,60
(78)	3,03 ± 0,16	18,88	4,72 ± 0,59	4,40
(79)	0,07 ± 0,01	776,05	0,09 ± 0,01	229,14
(80)	0,62 ± 0,02	92,93	1,08 ± 0,03	19,23
(81)	> 24	/*	11,29 ± 2,41	1,84
(82)	3,17 ± 0,36	18,03	3,19 ± 0,13	6,52
(83)	1,27 ± 0,08	45,11	1,10 ± 0,11	18,86
(84)	0,33 ± 0,02	172,53	0,26 ± 0,03	79,26
(85)	2,55 ± 0,22	22,44	3,19 ± 0,13	6,52

M-MS ($t_{1/2}$) – метаболичка стабилност у мишијим микрозомима изражена као полуживот; *M-MS* (CL_{int}) – метаболичка стабилност у мишијим микрозомима изражена као интринзички клиренс; *H-MS* ($t_{1/2}$) – метаболичка стабилност у хуманим микрозомима изражена као полуживот; *H-MS* (CL_{int}) – метаболичка стабилност у хуманим микрозомима изражена као интринзички клиренс

*Вредност *M-MS* (CL_{int}) није одређена пошто је вредност *M-MS* ($t_{1/2}$) премашила 24 сата.

4.3.6. Процена селективности једињења **(85)** према члановима породице ВЕТ протеина

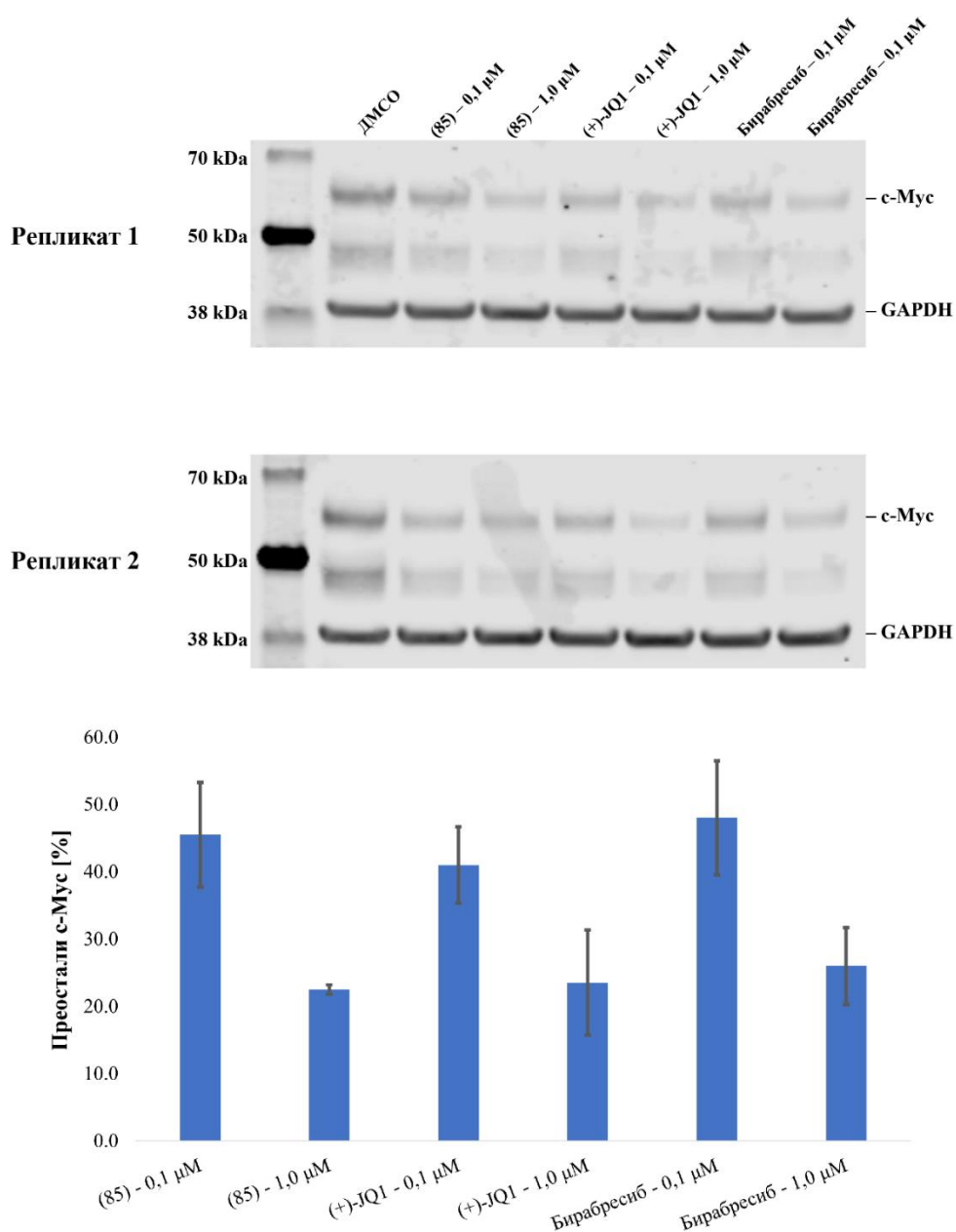
На основу укупног профила, једињење **(85)** одабрано је за додатно испитивање селективности. Експериментални подаци показују да је добијен пан-инхибитор ВЕТ протеина високог афинитета. У панелу за процену селективности, једињење **(85)** везивало се за свих осам испитиваних бромодомена у ниском наномоларном до субнаномоларном опсегу, при чему је најјачи афинитет уочен за BRD4(BD1) ($K_D = 0,4$ nM). Преостали BD2 домени BRD2, BRD3, BRD4 и BRDT били су груписани између 2,3 и 3,2 nM, док су одговарајући BD1 домени BRD2 и BRD3 остали у једноцифреном наномоларном опсегу. Само је афинитет за BRDT(BD1) био осетно слабији, са вредношћу од 17,5 nM (Табела 29). Стога, једињење **(85)** треба тумачити као потентан инхибитор ВЕТ протеина са извесном релативном преференцијом за BRD4(BD1), а не као лиганд селективан за одређени домен.

Табела 29. Резултати процене селективности водећег једињења **(85)**

Члан породице ВЕТ протеина	K_D ± <i>SD</i> [nM]
BRD2(BD1)	7,4 ± 5,2
BRD2(BD2)	3,2 ± 0,1
BRD3(BD1)	9,7 ± 0,1
BRD3(BD2)	3,1 ± 0,5
BRD4(BD1)	0,4 ± 0
BRD4(BD2)	2,3 ± 0,3
BRDT(BD1)	17,5 ± 2,1
BRDT(BD2)	2,5 ± 0,8

4.3.7. Процена модулације с-Мус посредством једињења (85)

Подаци анализе утицаја једињења (85) на с-Мус омогућавају посматрање овог инхибитора ВЕТ протеина у контексту ћелијске сигнализације. Наиме, с-Мус представља релевантан низводни маркер транскрипционе активности зависне од ВЕТ протеина у моделима акутне леукемије. Показано је да супресија BRD4 помоћу (+)-JQ1 у моделима АМЛ-а доводи до анти-леукемијских ефеката који су последица улоге BRD4 у одржавању експресије с-Мус [451]. Такође, фармаколошка инхибиција ВЕТ протеина описана је као приступ којим се брзо и изражено смањује транскрипција *MYC* онкогена [363,452]. Стога, квантитативна *Western blot* анализа с-Мус протеина је коришћена као фармакодинамички показатељ да једињење (85) изазива очекивану супресију онкогене транскрипционе активности зависне од ВЕТ протеина у ћелијском систему. Након 6 сати третмана у MV4-11 ћелијама, једињење (85) смањило је заступљеност с-Мус на 45,5% при 0,1 μM и на 22,5% при 1 μM . Ове вредности биле су веома блиске вредностима добијеним за (+)-JQ1 и бирабресиб под истим условима (Слика 62, Табела 30), па је показано да једињење (85) остварује очекивани ефекат на експресију с-Мус.



Слика 62. Резултати анализе утицаја једињења (85) на с-Мус у MV4-11 ћелијској линији

Табела 30. Подаци модулације с-Мус за водеће једињење (85)

Једињење	C [μM]	Преостали с-Мус ± SD [%]
(85)	0,1	45,5 ± 7,8
	1,0	22,5 ± 0,7
(+)–JQ1	0,1	41,0 ± 5,7
	1,0	23,5 ± 7,8
Бирабресиб	0,1	48,0 ± 8,5
	1,0	26,0 ± 5,7

4.3.8. *In vivo* фармакокинетичка карактеризација једињења (85)

На основу укупног профила једињења (85) добијеног током претходних *in vitro* испитивања, ово једињење је издвојено као најперспективнији представник серије амида изведених из (+)–JQ1 и усмерено ка даљој *in vivo* фармакокинетичкој карактеризацији на мишевима. Испитивање је обухватило интравенску (IV) примену у дози од 1 mg/kg и оралну (PO) примену у дозама од 3 и 10 mg/kg, што је омогућило процену одређених фармакокинетичких параметара (Табела 31).

Табела 31. Резултати *in vivo* фармакокинетичких испитивања једињења (85)

Пут примене	D [mg/kg]	C ₀ или C _{max} [ng/mL]	t _{max} [сати]	AUC _{last} [h ng mL ⁻¹]	t _{1/2el} [сати]	CL [mL min ⁻¹ kg ⁻¹]	V _{ss} [L/kg]	F [%]
IV	1	1931,3	/	1567,1	1,5	10,6	0,8	/
PO	3	1555,3	1,0	3275,4	3,9	15,2	5,2	70
PO	10	3155,6	0,5	9473,0	3,9	17,5	6,0	60

C₀ – концентрација у плазми у нултом тренутку

Након IV примене, почетна концентрација у плазми износила је 1931,3 ng/mL, док је AUC_{last} вредност износила 1567,1 h ng mL⁻¹. Плазматски клиренс од 10,6 mL min⁻¹ kg⁻¹ био је низак, што указује на одговарајуће задржавање једињења у системској циркулацији након IV примене. Волумен дистрибуције од 0,8 L/kg указује на ограничену, али присутну дистрибуцију изван плазматског простора, док полувреме елиминације од 1,5 сати показује да је фаза елиминације након IV примене била релативно кратка. У целини, профил једињења (85) након IV примене карактерисали су ниска вредност клиренса и умерена дистрибуција.

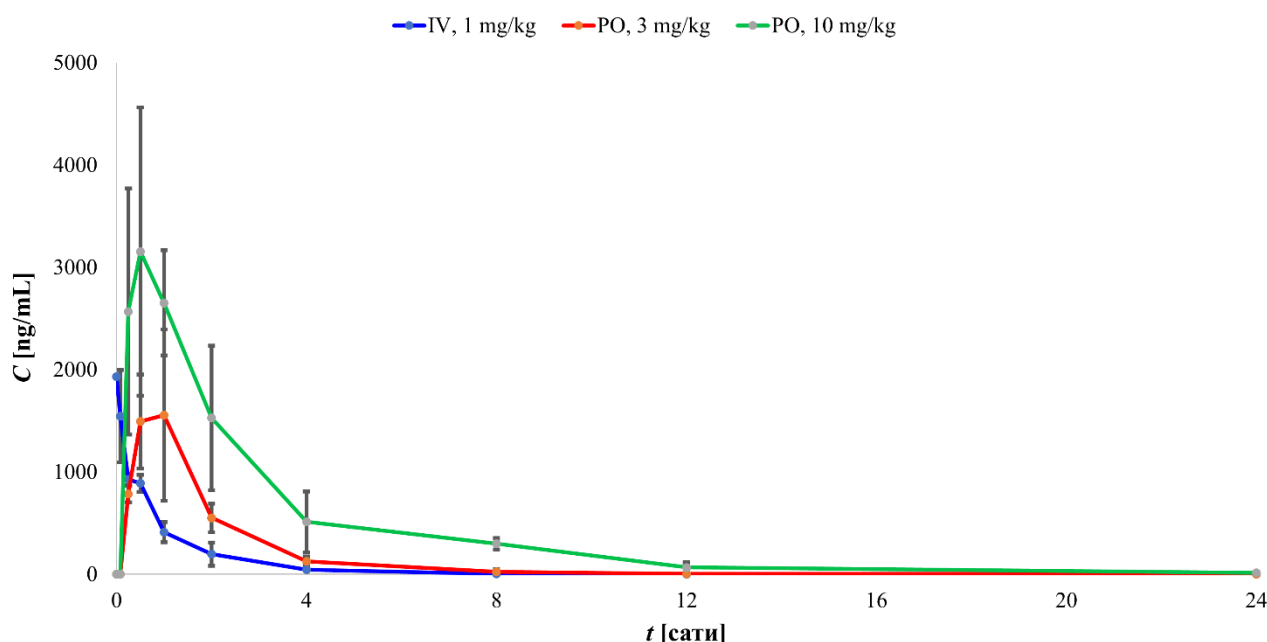
Након PO примене у дози од 3 mg/kg, једињење (85) је достигло C_{max} од 1555,3 ng/mL при t_{max} од 1 сата, што указује на брзу апсорпцију. Вредност AUC_{last} од 3275,4 h ng mL⁻¹ била је виша од вредности добијене након IV примене, али је то очекивано у контексту три пута веће примењене дозе. Добијена биорасположивост од 70% представља веома повољан резултат за PO примењено једињење. Полувреме елиминације износило је 3,9 сати, што је дуже него након IV примене. Истовремено, вредности CL и V_{ss} износиле су 15,2 mL min⁻¹ kg⁻¹ и 5,2 L/kg, односно биле су више него након IV примене.

При повећању оралне дозе са 3 на 10 mg/kg, вредност t_{max} се померила са 1 на 0,5 сати, што указује на раније достизање максималне концентрације у плазми при већој дози. Вредност C_{max} повећала се са 1555,3 на 3155,6 ng/mL, док је вредност AUC_{last} порасла са 3275,4 на 9473 h ng mL⁻¹. Иако су и максимална концентрација и укупна изложеност порасле са повећањем дозе, тај пораст није био потпуно пропорционалан овом повећању – доза је повећана приближно 3,3 пута, док је C_{max} порастао приближно 2 пута, а AUC_{last} приближно 2,9 пута. Полувреме елиминације остало је непромењено у односу на оралну дозу од 3 mg/kg и износило је 3,9 сати, што указује да се елиминација једињења (85) није битно разликовала између ова два режима PO примене. Вредности CL и V_{ss} биле су нешто више при дози од 10 mg/kg него при дози од 3

mg/kg и износиле су $17,5 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ и 6 L/kg . Орална биорасположивост се смањила са 70% на 60%, али је и при већој дози остала висока.

Поређење сва три режима примене показује да је IV примена једињења (85) дала фармакокинетички профил са најнижом вредношћу CL и најмањом вредношћу V_{ss} , док су обе PO примене довеле до брзе апсорпције, дужих $t_{1/2el}$ и већих V_{ss} . Оралном применом у дози од 3 mg/kg добијена је највиша биорасположивост, док је доза од 10 mg/kg обезбедила највеће вредности C_{max} и AUC_{last} . Међутим, недовољни пораст вредности AUC_{last} и пад биорасположивости са 70% на 60% указују да повећање орално примењене дозе није довело до потпуно пропорционалног повећања системске изложености. У целини, добијени *in vivo* фармакокинетички резултати показују да једињење (85) има низак клиренс након IV примене, брзу апсорпцију, високу вредност параметра изложености и високу биорасположивост након PO примене, што потврђује оправданост његовог избора за даљу карактеризацију.

Профили концентрације једињења (85) у плазми у функцији времена након IV примене у дози од 1 mg/kg и PO примене у дозама од 3 mg/kg и 10 mg/kg код женки CD-1 мишева приказани су на Слици 63.



Слика 63. Профили концентрације једињења (85) у плазми у функцији времена

4.3.9. Компаративна *in silico/in vitro* анализа фармакокинетичких профила амида изведених из (+)-JQ1

Да би се употпунила експериментално одређена својства разматрана у Одељку 4.3.5. и да би се проучила ефикасност *in silico* метода у предвиђању особина инхибитора ВЕТ протеина, целокупан скуп једињења испитан је и кроз компаративну *in silico/in vitro* фармакокинетичку анализу [453]. У овом делу дисертације, *ADMETlab 2.0* је коришћен за предвиђање параметара повезаних са апсорпцијом, дистрибуцијом, метаболизмом и екскрецијом, а добијени резултати су затим упоређени са експериментално одређеним подацима о пермеабилности, везивању за протеине плазме и стабилности у хуманим микрозомима јетре. Ово поређење није имало за циљ да замени експерименталне податке, већ да утврди која су својства могла бити довољно поуздано предвиђена рачунарским моделом. Стога, централно питање није било само који

аналози показују најповољнији укупни фармакокинетички баланс, већ и који предвиђени фармакокинетички параметри довољно добро прате експериментално уочено понашање да би заиста били корисни током приоритизације аналога.

Да би се обезбедиле јасноћа и доследност у целокупној дискусији која следи, уведена су посебна обележја. Резултати добијени рачунарским предвиђањима, означени као *in silico*, обележени су суперскриптом „IS”. Слично томе, експериментално добијени резултати, означени као *in vitro*, обележени су суперскриптом „IV”. Ова обележја се доследно примењују у целом тексту како би се обезбедила јасна и непосредна разлика између ова два типа скупова података. Међутим, у табелама у којима су подаци већ експлицитно класификовани у групе „*in silico*” и „*in vitro*”, суперскрипти „IS” и „IV” изостављени су ради очувања визуалне једноставности.

Апсорпција

Анализа апсорпције испитиваних једињења обухватила је процену седам главних дескриптора: вероватноћу да је хумана интестинална апсорпција мања од 30% (*HIA prob.*^{IS}), параметре повезане са оралном биорасположивошћу (*F(20%)*^{IS} и *F(30%)*^{IS}), пермеабилност у *Caco-2* и MDCK моделима (*Caco-2 perm.*^{IS} и *MDCK perm.*^{IS}), као и вероватноћу да једињења буду супстрати или инхибитори P-гликопротеина (*P-gp sub.*^{IS} и *P-gp inh.*^{IS}). Добијени резултати приказани су у Табели 32.

Табела 32. *In silico* резултати који се тичу апсорпције

Једињење	<i>HIA prob.</i> ^a	<i>F(20%)</i> ^b	<i>F(30%)</i> ^b	<i>Caco-2 perm.</i> ^c	<i>Caco-2 perm. calc.</i> [nm/s]	<i>MDCK perm.</i> ^a [nm/s]	<i>P-gp sub.</i> ^b	<i>P-gp inh.</i> ^c
(+)-JQ1	0,047	0,002	0,022	-4,475	334,97	215,99	0,006	0,001
Бирабресиб	0,004	0,001	0,001	-4,787	163,31	187,98	0,714	0,001
(72)	0,007	0,001	0,002	-4,826	149,28	171,63	0,992	0
(73)	0,018	0,002	0,009	-4,590	257,04	263,26	0,860	0
(74)	0,007	0,001	0,218	-4,656	220,80	268,83	0,812	0
(75)	0,005	0,001	0,001	-4,703	198,15	182,99	0,033	0,002
(76)	0,007	0,001	0,001	-4,616	242,10	195,39	0,243	0
(77)	0,006	0,001	0,001	-4,615	242,66	259,52	0,129	0
(78)	0,006	0,001	0,003	-4,718	191,43	171,08	0,989	0
(79)	0,005	0,001	0,001	-4,672	212,81	235,96	0,043	0,001
(80)	0,014	0,002	0,004	-4,587	258,82	255,60	0,606	0,001
(81)	0,008	0,001	0,001	-4,793	161,06	246,16	0,685	0,001
(82)	0,005	0,002	0,002	-4,512	307,61	276,85	0,730	0
(83)	0,004	0,001	0,002	-4,696	201,37	253,39	0,285	0
(84)	0,006	0,001	0,009	-5,026	94,19	164,93	0,430	0,034
(85)	0,005	0,001	0,002	-4,712	194,09	277,64	0,936	0

Ћелије означене зеленом, жутом или црвеном бојом означавају одличне, средње или лоше резултате [454].

^aДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да једињење има хуману интестиналну апсорпцију < 30%. ^bДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да једињење има биорасположивост < 20%. ^cДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да једињење има биорасположивост < 30%. ^dОптimalно је > -5,15. ^eНиска пермеабилност: < 20 nm/s; средња пермеабилност: 20-200 nm/s; висока пермеабилност: > 200 nm/s. ^fДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да је једињење супстрат за P-гр. ^gДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да је једињење инхибитор P-гр.

Анализа апсорпције *in silico* моделом одмах је указала да би амиди изведени из (+)-JQ1 требало да имају генерално добру оралну апсорпцију судећи по добијеним вредностима вероватноће. Параметар *HIA prob.*^{IS}, који изражава вероватноћу да је хумана интестинална апсорпција мања

од 30%, кретао се од 0,004 до 0,047 у оквиру серије. Тринаест од шеснаест једињења имало је вредности $HIA\ prob.^{IS}$ ниже од 0,01, што указује да је за већину амида предвиђено да немају изражена ограничења интестиналне апсорпције. Најбоље вредности добијене су за бирабресиб и једињење **(83)** (0,004), док је за (+)-JQ1 добијена најмање повољна вредност (0,047). Вредности сродног параметра $F(20\%)^{IS}$ биле су уско груписане између 0,001 и 0,002 и стога су мало допринеле разликовању унутар серије. Насупрот томе, вредности $F(30\%)^{IS}$ биле су дискриминативније и издвојено је једињење **(74)** као аналог са убедљиво највећом вероватноћом оралне биорасположивости испод 30% (0,218), док су сва преостала једињења остала у много ужем опсегу ниске вероватноће.

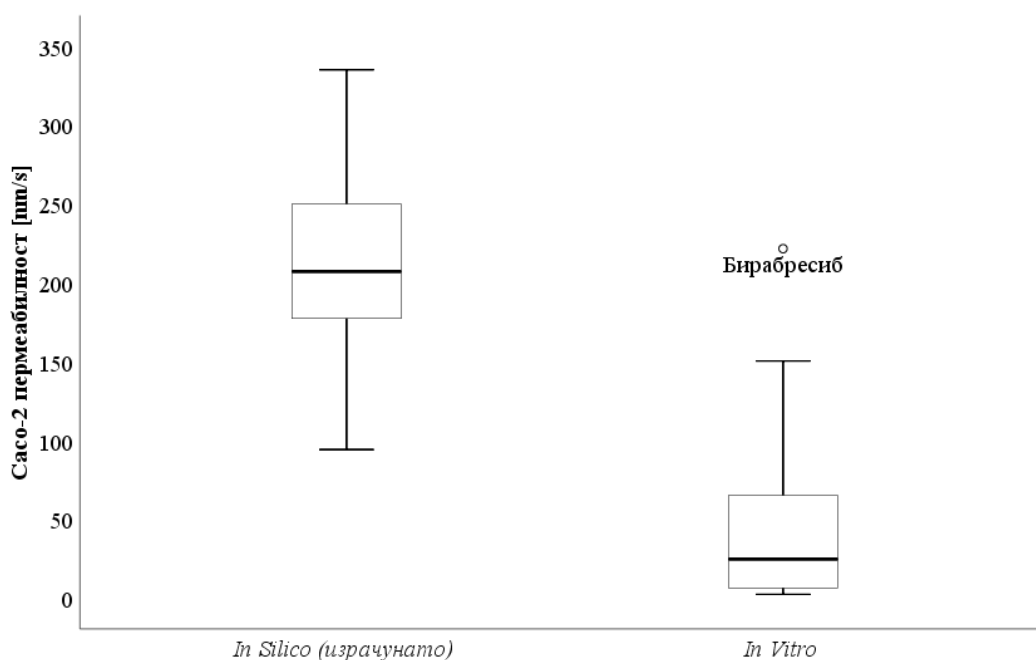
Слично повољни резултати проистекли су из предвиђених резултата који се тичу пермеабилности. Сви аналози су испунили критеријум софтвера *ADMETlab 2.0* за прихватљиву *Caco-2* пермеабилност, пошто су све *Caco-2 perm.*^{IS} вредности биле веће од -5,15. Само на основу тога, серија би деловала као да има уједначену пермеабилност, при чему је за (+)-JQ1 предвиђена највиша *Caco-2* пермеабилност, а за једињења **(84)**, **(72)** и **(81)** најнижа. Предвиђене MDCK пермеабилности такође су биле генерално повољне, при чему је десет једињења класификовано као високо пермеабилно, а преосталих шест као средње пермеабилно. Предвиђања која се тичу *P-gp* дала су већу диференцијацију. Вредности *P-gp sub.*^{IS} обухватиле су готово цео интервал 0-1, од 0,006 за (+)-JQ1 до 0,992 за једињење **(72)**, што указује да склоност ка ефлуксу није била равномерно распоређена унутар серије. Насупрот томе, *P-gp inh.*^{IS} вредности биле су у целини веома ниске, при чему је једињење **(84)** показало највећу предвиђену вероватноћу инхибиције (0,034), док је девет аналога имало вредност нула.

Експерименти за процену пермеабилности пружили су комплексније резултате (Табела 26). У РАМРА тесту, пасивна пермеабилност кретала се од потпуног губитка мерљивог транспорта за једињења **(74)** и **(78)** до изузетно високих вредности за (+)-JQ1 и једињење **(84)**, при чему су обе вредности биле веће од 1800×10^{-6} cm/s. Веома високе РАМРА пермеабилности такође су уочене за једињење **(75)** ($1797,07 \times 10^{-6}$ cm/s), једињење **(83)** ($544,83 \times 10^{-6}$ cm/s) и једињење **(85)** ($533,96 \times 10^{-6}$ cm/s), док је бирабресиб имао и даље повољну вредност од $315,13 \times 10^{-6}$ cm/s.

Caco-2 тест је додатно изоштрио разлику између једињења која су била само довољно липофилна да прођу кроз вештачку мембрану и оних која су задржала прихватљиво трансцелуларно понашање у моделу епитела. Највиша вредност $P_{app\ A-B}$ уочена је за бирабресиб (221,60 nm/s), а затим за једињење **(76)** (150,34 nm/s), док је једињење **(85)** остало у средњем опсегу са 66,46 nm/s. Насупрот томе, једињења **(72)**, **(73)**, **(74)**, **(78)**, **(81)**, **(82)** и **(84)** показала су веома ниске вредности $P_{app\ A-B}$. Подједнако је важно да су многи аналози показали изражену асиметрију која се тиче смера кретања. Једињење **(73)** достигло је коефицијент ефлукса од 39,93, једињење **(74)** 33,96, једињење **(82)** 11,94 и једињење **(72)** 11,20, што снажно указује да се пермеабилност у овој серији не може тумачити независно од транспорта посредованог транспортерима. Под овим условима, експериментално одређен профил апсорпције био је јасно хетерогенији него што су *in silico* резултати предвиђали.

Ова неусклађеност квантитативно је приказана у компаративној статистици (Табела 36). Параметар $HIA\ prob.^{IS}$ показао је умерену негативну корелацију са РАМРА пермеабилношћу ($\rho = -0,581$, $p = 0,042$), што указује да су једињења за која је предвиђена слабија апсорпција заиста имала тенденцију ка слабијим резултатима у тесту пасивне пермеабилности. Ово је значајан резултат, јер параметар $HIA\ prob.^{IS}$ и РАМРА тест испитују преклапајуће аспекте истог феномена, односно способност молекула да прође кроз липофилну баријеру. Међутим, ни $F(20\%)^{IS}$ ни $F(30\%)^{IS}$ нису значајно корелисали са резултатима РАМРА теста. Највероватније објашњење је да предвиђања биорасположивости укључују пресистемске процесе осим проласка кроз мембрану, док РАМРА тест изоловано приказује само пасивну пермеабилност. Стога, одсуство корелације не поништава модел. Уместо тога, оно показује да ови резултати не одсликавају исти фармакокинетички ниво.

Поређење између предвиђене и измерене *Caco-2* пермеабилности било је приметно мање успешно. Иако је за сва једињења предвиђено прихватљиво понашање у *Caco-2* тесту, медијана предвиђене *Caco-2* пермеабилности од 207,09 nm/s ($IQR = 170,34-253,44$ nm/s) била је много виша од експерименталне медијане апикално-базолатералне пермеабилности од 24,74 nm/s ($IQR = 6,37-65,84$ nm/s), а Вилкоксон тест означених рангова показао је статистички значајну разлику између ова два скупа података (Слика 64).



Слика 64. Резултати Вилкоксонског теста означених рангова којим су упоређене *Caco-2* пермеабилности добијене *in silico* (*Caco-2 perm. calc.*) и *in vitro* (P_{app} A-B)

Није уочена статистички значајна корелација између *Caco-2 perm.*^{IS} или *Caco-2 perm. calc.*^{IS} и измереног апикално-базолатералног флуksа (Табела 36). Узето заједно, ови резултати указују да рачунарски модел није предвидео ни апсолутну величину ни рангирање пермеабилности кроз епител са довољном тачношћу да замени експеримент. Ово је разумљиво, јер *Caco-2* тест интегрише пасивну дифузију, ефекте транспортера и задржавање једињења у ћелијама [455].

Резултати који се тичу P-гр били су корисни, али поново само у одређеним границама (Табела 36). Параметар $P\text{-gp sub.}^{IS}$ негативно је корелисао са PAMPA пермеабилношћу ($\rho = -0,550$, $p = 0,042$), што је у складу са чињеницом да молекули који имају израженија својства супстрата P-гр често показују и поларност и способност грађења водоничних веза које смањују пасивну дифузију [456]. Додатно, параметар $P\text{-gp inh.}^{IS}$ негативно је корелисао са коефицијентом ефлуksа ($\rho = -0,558$, $p = 0,025$), што указује да су једињења са већим предвиђеним карактером инхибитора P-гр имала тенденцију да показују мању асиметрију која се тиче смера кретања у *Caco-2* ћелијама. Ипак, сама вероватноћа да је једињење супстрат за P-гр није у потпуности објаснила експериментално понашање. Бирабресиб је, на пример, имао релативно високу $P\text{-gp sub.}^{IS}$ вредност (0,714), а ипак је остао једно од најуспешнијих једињења према резултатима експеримената, док су једињења (74), (72), (73) и (82) имала високе $P\text{-gp sub.}^{IS}$ вредности са израженим двоцифреним коефицијентима ефлуksа. Практичан закључак је да је апсорпција у овој серији била обликована више него једном променљивом. Липофилност, стање јонизације,

пасивни пролазак кроз мембрану и ефлукс су сви доприносили, а ниједан појединачни предвиђени параметар није био довољан да сумира целокупан експериментални исход.

Из угла медицинске хемије, подаци о апсорпцији најкориснији су када се тумаче хијерархијски, а не као изоловани резултати. Изразито липофилна, углавном нејонизована једињења као што су (+)-JQ1, бирабресиб и једињења (75), (83), (84) и (85) генерално су показала добре резултате у РАМРА тесту, што је у складу са њиховим повољним $\log D$ вредностима (3,64, 4,03, 3,93, 3,57, 4,28 и 2,23). На супротном крају, једињење (81), за које је предвиђено да је 99,92% јонизовано при рН вредности 7,4 и које има $\log D$ вредност од -1,94, показало је један од најслабијих профила апсорпције и у РАМРА и у Сасо-2 тесту. Ипак, резултати Сасо-2 теста су остали одлучујући. Једињење (84), на пример, показало је изузетно високу РАМРА пермеабилност, али слаб апикално-базолатерални транспорт у Сасо-2 ћелијама, док је једињење (85) имало високу пасивну пермеабилност са знатно прихватљивијим епителним профилем и много нижим коефицијентом ефлукса него неколико иначе повољних аналога. Ова разлика је кључна, зато што за избор водећег једињења које је орално биорасположиво најпогоднија једињења нису била једноставно најлипофилнија, већ она која су очувала пермеабилност без појаве превисоке склоности ка ефлуксу.

Дистрибуција

Док су подаци о апсорпцији открили велико неслагање између предвиђене и измерене пермеабилности, анализа дистрибуције показала је другачији образац у којем је *in silico* модел био знатно кориснији за рангирање него за апсолутну квантификацију. Разматрана су три главна дескриптора: способност проласка кроз крвно-мождану баријеру (BBB_{pen}^{IS}), везивање за протеине плазме (PPB^{IS} у односу на PPB^{IV}) и волумен дистрибуције (V_d^{IS}), при чему је невезана фракција (F_u^{IS}) служила као комплементарни показатељ количине једињења која би остала слободна у циркулацији. Добијени резултати приказани су у Табели 33.

Табела 33. *In silico* резултати који се тичу дистрибуције

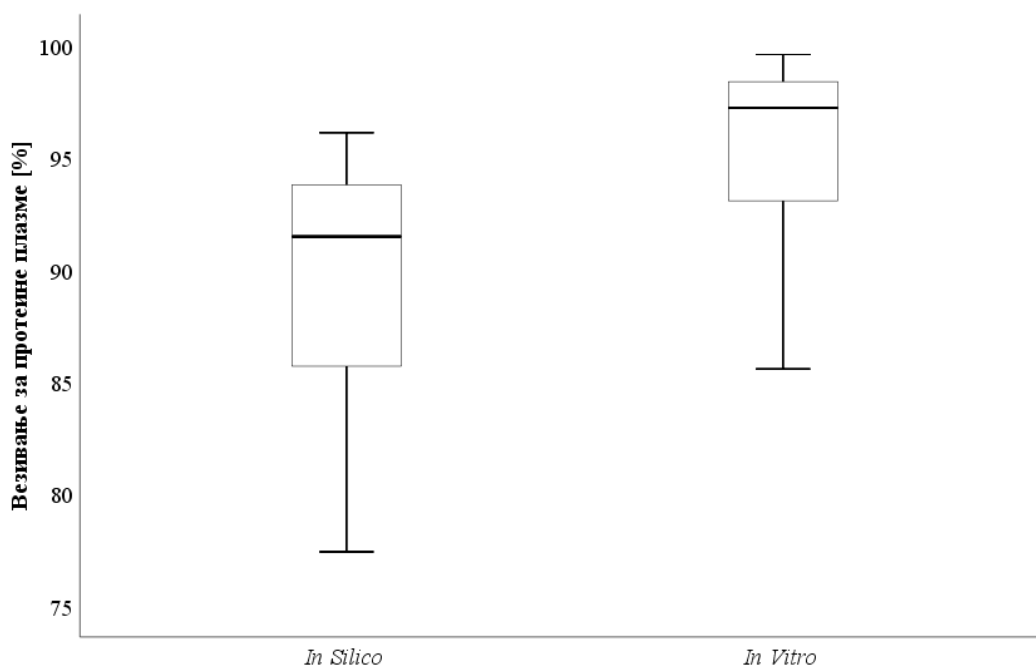
Једињење	BBB_{pen}^a	PPB^b [%]	V_d^c [L/kg]	F_u^d [%]
(+)-JQ1	0,987	93,97	1,419	9,76
Бирабресиб	0,923	96,10	1,170	5,97
(72)	0,940	91,87	1,683	13,73
(73)	0,931	91,08	1,686	20,18
(74)	0,904	82,36	1,674	26,74
(75)	0,991	94,89	0,933	11,07
(76)	0,971	93,59	1,239	11,02
(77)	0,981	86,44	1,030	23,21
(78)	0,937	77,41	1,105	28,23
(79)	0,984	90,26	1,238	17,14
(80)	0,992	86,02	1,478	22,58
(81)	0,808	85,37	0,876	15,73
(82)	0,985	79,77	1,607	24,88
(83)	0,985	91,96	1,136	11,16
(84)	0,983	95,93	1,210	6,92
(85)	0,983	93,57	1,248	7,87

Телије означене зеленом или црвеном бојом означавају одличне или лоше резултате [454]. ^aДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да једињење може да прође кроз крвно-мождану баријеру. ^bОптимално је $\leq 90\%$. ^cОптимално је од 0,04 L/kg до 20 L/kg. ^dНиско је $< 5\%$, средње је 5-20%, а високо је $> 20\%$.

Вредности BBB_{pen}^{IS} биле су уједначено високе и кретале су се од 0,808 до 0,992. Према софтверу *ADMETlab 2.0* ово је означено као неповољно, али за инхибиторе ВЕТ протеина такво

понашање није нужно ограничење, пошто једињења из ове класе могу бити релевантна и у контексту болести централног нервног система [457]. Најнижа *BBB pen.^{IS}* вредност додељена је једињењу **(81)** (0,808), што је хемијски разумљиво с обзиром на његову слободну карбоксилну киселину, доминантно јонизовано стање при физиолошкој рН вредности и изразито низак *logD*. Ипак, његова предвиђена способност проласка кроз крвно-мождану баријеру остала је значајна, уместо да буде у потпуности изгубљена. Једно могуће објашњење је да пасивна дифузија није једини пут који би могао да допринесе приступу овог аналога централном нервном систему. Бочни ланац који садржи глицин оставља отворену могућност да транспорт посредован LAT-1 транспортером може делимично да надокнади његов неповољан профил јонизације [458]. Ово тумачење треба сматрати хипотетичким, али је значајно то што рачунарски модел није искључио пролазак кроз крвно-мождану баријеру чак ни за најхидрофилнији члан серије.

Везивање за протеине плазме показало је најјаснију тачку подударности између *in silico* и *in vitro* скупова података. Предвиђене *PPB^{IS}* вредности кретале су се од 77,41% за једињење **(78)** до 96,10% за бирабресиб, док су се измерене *PPB^{IV}* вредности (Табела 27) кретале од 85,57% за једињење **(81)** до 99,59% за једињење **(84)**. Експериментално посматрано, сва једињења серије су показала значајно везивање за протеине плазме, а у четрнаест од шеснаест случајева измерено везивање било је веће од предвиђене вредности. Ипак, ова два скупа података била су повезана на статистички значајан начин (Табела 36). Параметар *PPB^{IS}* је позитивно корелисао са *PPB^{IV}* ($\rho = 0,656$, $p = 0,006$), што указује да је рачунарски модел релативни редослед једињења приказао прилично добро, иако је потценио апсолутни степен везивања. Вилкоксново поређење потврдило је да су се централне тенденције статистички значајно разликовале, са медијаном *PPB^{IS}* од 91,47% (*IQR* = 85,69-93,78%) у односу на медијану *PPB^{IV}* од 97,21% (*IQR* = 92,87-98,46%) (Слика 65). У практичном смислу, ово је управо онај тип резултата који је користан за скрининг – модел није био довољно тачан да замени експерименте, али је био довољно користан да идентификује снажно везан и релативно мање снажно везан део серије.



Слика 65. Резултати Вилкоксновог теста означених рангова којим је упоређено везивање за протеине плазме добијено *in silico* и *in vitro*

Подаци о везивању за протеине плазме такође су разјаснили ширу физичко-хемијску слику серије (Табела 36). Параметар PPB^{IS} је снажно корелисао са РАМРА пермеабилношћу ($\rho = 0,790, p < 0,001$), док је F_u^{IS} негативно корелисао са истим параметром ($\rho = -0,739, p = 0,003$). Ови односи су хемијски кохерентни. Једињења која су лакше пролазила кроз липидне мембране углавном су била иста она једињења за која је предвиђено израженије везивање за протеине плазме и мања невезана фракција. Другим речима, ова серија се понашала као класичан фармакокинетички скуп липофилних једињења – побољшана пасивна расподела била је праћена повећаним везивањем за протеине плазме и смањеном слободном фракцијом.

Предвиђени волумен дистрибуције употпунио је укупну слику дистрибуције. Вредности V_d^{IS} налазиле су се у релативно уском интервалу од 0,876 до 1,686 L/kg, при чему је једињење **(81)** било на доњем крају, а једињење **(73)** на горњем крају. Чак је и најнижа предвиђена вредност премашивала укупну запремину телесне течности (0,5-0,6 L/kg), што указује да се није очекивало да било које од једињења остане углавном ограничено на плазму. Ово је у складу са значајним ткивним афинитетом целе серије. За разлику од пермеабилности или стабилности у микрозомима, у оквиру дистрибуције једињења се нису нарочито разликовала. Уместо тога, аналози су заузимали простор умерене ткивне дистрибуције, са малим разликама. Умерена позитивна корелација између параметра V_d^{IS} и коефицијента ефлукса ($\rho = 0,685, p = 0,003$) (Табела 36) указује да су једињења која су показивала израженију асиметрију која се тиче смера кретања у Сасо-2 ћелијама такође имала тенденцију ка обимнијој предвиђеној дистрибуцији. У контексту овог скупа података, тај однос највероватније одражава чињеницу да иста структурна својства која подстичу расподелу могу, такође, утицати на препознавање од стране транспортера и преузимање у ткива.

Два појединачна једињења посебно су интересантна у овој анализи дистрибуције. Једињење **(81)** имало је најнижи V_d^{IS} , најнижи BBB_{pen}^{IS} , најниже експерименталне вредности пермеабилности и најекстремнији профил јонизације. Сва ова својства указују у истом правцу и указују на слободну карбоксилну киселину као главну детерминанту специфичног фармакокинетичког понашања овог једињења. Насупрот томе, једињење **(73)** достигло је највиши V_d^{IS} упркос релативно умереној $\log D$ вредности од 1,72, што показује да се предвиђања ткивне дистрибуције унутар ове серије нису могла свести само на липофилност. Ово је важан подсетник да је дистрибуција сложено својство које обликује више променљивих, укључујући тродимензионалну структуру, образац грађења водоничних веза и равнотежу између неутралних и јонизованих облика.

У целини, анализа дистрибуције подржава два закључка. Прво, рачунарски модел је овде био суштински успешнији него у анализи пермеабилности, нарочито у рангирању везивања за протеине плазме унутар серије. Друго, дистрибуциони простор амида изведених из (+)-JQ1 био је у великој мери компатибилан са даљим развојем, пошто ни за један аналог није предвиђено да буде ограничен дистрибуцијом.

Метаболизам и екскреција

Ако је анализа апсорпције открила једно главно ограничење предиктивног модела, анализа метаболизма и екскреције открила је главно ограничење саме серије једињења у погледу подобности за даљи развој. Предвиђања која се тичу понашања једињења као супстрата и инхибитора СYP450 указала су на метаболички сложен профил у којем може учествовати више изоензима, али са СYP3A4 као доминантним заједничким именитељем. За сва једињења предвиђено је да су снажни супстрати СYP3A4, са вероватноћама између 0,949 и 0,963. За већину аналога такође је предвиђено да су добри супстрати СYP1A2, као и СYP2C19. Најјасније одступање представљало је једињење **(81)**, које се разликовало од осталих амида тиме што је показало нижу вероватноћу понашања као супстрата СYP1A2 (0,377) и изразито већу вероватноћу да буде супстрат СYP2C9 (0,762). Ови резултати би се могли довести у везу

са ширим запажањем да је аналог који садржи слободни карбоксилат заузимао другачији физичко-хемијски простор у односу на остатак једињења.

Предвиђања инхибиције додала су још један ниво фармакокинетичких информација. Са изузетком једињења **(81)**, за целу серију је генерално предвиђено да инхибира CYP3A4, а исти општи тренд проширио се и на CYP2C9 и CYP2C19. Иако су то само процене вероватноће, а не директне константе инхибиције, важне су у контексту оптимизације водећег једињења, јер указују да се најбољи аналози могу суочити не само са интензивним метаболизмом, већ и са ризиком од лек-лек интеракција. Ово питање је посебно релевантно за инхибиторе ВЕТ протеина узевши у обзир да су ови молекули намењени онколошким стањима у којима је полифармација честа. У таквом контексту, екстензивно учешће CYP450 постаје и важан критеријум за приоритизацију једињења.

Вероватноће да су једињења супстрати и инхибитори CYP450 приказане су у Табели 34.

Табела 34. Предвиђене вероватноће да су испитивани инхибитори ВЕТ протеина супстрати и инхибитори CYP450

Једињење	CYP1A2 ^a		CYP2C9 ^a		CYP2C19 ^a		CYP2D6 ^a		CYP3A4 ^a	
	Суп.	Инх.	Суп.	Инх.	Суп.	Инх.	Суп.	Инх.	Суп.	Инх.
(+)-JQ1	0,943	0,098	0,115	0,837	0,909	0,635	0,019	0,040	0,959	0,458
Бирабресиб	0,952	0,173	0,728	0,890	0,744	0,495	0,078	0,399	0,960	0,665
(72)	0,889	0,186	0,085	0,430	0,708	0,209	0,032	0,010	0,952	0,662
(73)	0,916	0,136	0,066	0,327	0,912	0,228	0,060	0,007	0,956	0,646
(74)	0,933	0,170	0,057	0,371	0,748	0,251	0,055	0,008	0,956	0,863
(75)	0,864	0,143	0,177	0,900	0,856	0,643	0,077	0,069	0,958	0,861
(76)	0,668	0,144	0,096	0,791	0,858	0,391	0,068	0,014	0,956	0,862
(77)	0,671	0,126	0,067	0,746	0,852	0,382	0,071	0,011	0,957	0,768
(78)	0,893	0,094	0,072	0,669	0,637	0,252	0,014	0,177	0,960	0,932
(79)	0,626	0,144	0,121	0,639	0,873	0,311	0,070	0,010	0,956	0,863
(80)	0,644	0,129	0,084	0,448	0,876	0,262	0,071	0,008	0,959	0,750
(81)	0,377	0,113	0,762	0,095	0,829	0,114	0,073	0,013	0,949	0,079
(82)	0,778	0,164	0,115	0,232	0,856	0,156	0,057	0,007	0,957	0,450
(83)	0,979	0,378	0,648	0,821	0,844	0,590	0,043	0,104	0,961	0,799
(84)	0,961	0,197	0,740	0,942	0,773	0,847	0,076	0,649	0,960	0,956
(85)	0,979	0,581	0,442	0,686	0,690	0,459	0,021	0,125	0,963	0,833

^aДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да је једињење супстрат и/или инхибитор CYP450.

Резултати који се тичу елиминације добијени помоћу *ADMETlab 2.0* били су релативно уског опсега и, посматрани сами за себе, могли су да укажу на релативно повољан профил диспозиције (Табела 35). Вредности CL^{IS} кретале су се од 0,851 mL/min/kg за једињење **(81)** до 3,344 mL/min/kg за једињење **(78)**, док је за бирабресиб предвиђена вредност од 1,365 mL/min/kg, а за (+)-JQ1 3,291 mL/min/kg. Све ове вредности припадају подручју ниског клиренса.

Као што је описано у Одељку 3.17., софтвер *ADMETlab 2.0* не предвиђа полувремена елиминације, већ процењује вероватноћу да једињење има полувреме елиминације дуже од 3 сата. Да би се добиле прецизније информације о очекиваним полувременима елиминације, она су израчуната применом следеће једначине:

$$t_{1/2 \text{ calc. } IS} = \frac{0,693 \times V_d}{CL}$$

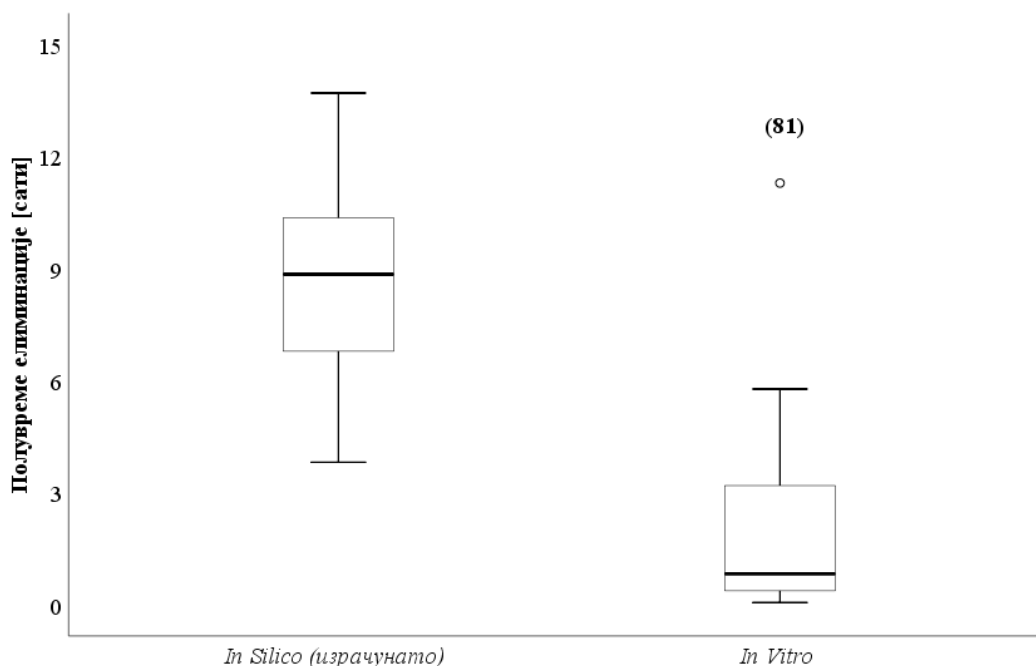
Приближна полувремена елиминације изведена из *in silico* резултата такође су била релативно дуга и кретала су се од 3,82 сата за једињење (78) до 11,89 сати за једињење (81), са бирабресибом од 9,9 сати и једињењем (85) од 11,57 сати. Ако би се ове вредности тумачиле изоловано, лако би се могло закључити да би већина једињења требало да буду метаболички прихватљива. Међутим, *in vitro* резултати (Табела 28) показују зашто би такав закључак био погрешан. Вредности CL_{int}^{IV} варирале су у много већој мери него предвиђене вредности клиренса и стога су знатно ефикасније диференцирале једињења унутар серије. Бирабресиб, једињење (82) и једињење (85) формирали су најповољнији кластер, при чему је сваки од њих имао умерени интринзички клиренс са релативно дугим микрозомалним полувременом елиминације. За једињење (85), CL_{int}^{IV} је износио 6,52 mL/min/kg, а $t_{1/2}^{IV}$ 3,19 сати, што је идентично вредностима измереним за једињење (82) и јасно повољније у односу на (+)-JQ1 (51,21 mL/min/kg; 0,41 сат). На супротном крају, једињење (75) имало је CL_{int}^{IV} од 329,76 mL/min/kg и полувреме елиминације од само 0,06 сати, док је и једињење (79) брзо метаболисано (229,14 mL/min/kg; 0,09 сати). Ова једињења су, према томе, била ограничена не маргиналном пермеабилношћу или прекомерним везивањем за протеине плазме, већ веома екстензивним микрозомалним метаболизмом. Исти закључак се, у мањој мери, односи и на неколико аналога са интермедијарним, али и даље високим вредностима клиренса, као што су једињења (74), (72), (73) и (84).

Табела 35. *In silico* резултати који се тичу елиминације

Једињење	CL^a [mL/min/kg]	$t_{1/2} prob.^b$	$t_{1/2} calc.$ [сати]
(+)-JQ1	3,291	0,117	4,98
Бирабресиб	1,365	0,172	9,90
(72)	1,419	0,359	13,70
(73)	2,708	0,199	7,20
(74)	2,352	0,442	8,22
(75)	1,687	0,105	6,39
(76)	1,406	0,184	10,18
(77)	1,589	0,219	7,49
(78)	3,344	0,434	3,82
(79)	1,538	0,191	9,30
(80)	1,620	0,307	10,54
(81)	0,851	0,465	11,89
(82)	1,851	0,300	10,03
(83)	1,562	0,120	8,40
(84)	2,644	0,108	5,29
(85)	1,246	0,103	11,57

Телије означене зеленом, жутом или црвеном бојом означавају одличне, средње или лоше резултате [454]. ^aВисоко је > 15 mL/min/kg, умерено је 5-15 mL/min/kg, а ниско је < 5 mL/min/kg. ^bДобијене вредности, у опсегу од 0 до 1, представљају вероватноћу да једињење има полувреме > 3 сата.

Неусклађеност између предвиђених и измерених фармакокинетичких параметара била је систематска, а не спорадична. Израчуната полувремена елиминације била су генерално дужа од полувремена елиминације експериментално одређених у микрозомима, а Вилкоксонев тест означених рангова показао је статистички значајну разлику између ова два скупа података. Медијана $t_{1/2} calc.^{IS}$ износила је 8,85 сати ($IQR = 6,59-10,45$ сати), док је медијана $t_{1/2}^{IV}$ износила само 0,83 сата ($IQR = 0,36-3,19$ сати) (Слика 66).



Слика 66. Резултати Вилкоксоновог теста означених рангова којим су упоређена израчуната и *in vitro* добијена полувремена елиминације

Није нађена смислена укупна корелација између CL^{IS} и CL_{int}^{IV} , нити између израчунатих полувремена елиминације и измерених микрозомалних полувремена елиминације (Табела 36). Ово је важан резултат, јер дефинише границу онога што рачунарска анализа може и не може да учини за ову серију једињења. Модел елиминације није репродуковао експериментално рангирање са довољном тачношћу како би самостално усмеравао кораке. Ипак, поређење није било без вредности. Одређена локална подударња била су јасно видљива. Једињење **(81)** показало је најбоље слагање између предвиђеног и измереног полувремена елиминације (11,89 сати у односу на 11,29 сати), док су једињења **(77)** и **(78)** такође показала релативно добро слагање између *in silico* и *in vitro* процена полувремена елиминације. Ови примери указују да модел повремено може добро да приближи појединачна једињења. Статистички значајне корелације које су се појавиле биле су индиректне. Параметар $t_{1/2} prob.^{IS}$ снажно и негативно је корелисао са РАМРА пермеабилношћу ($\rho = -0,915$, $p < 0,001$), као и са PPB^{IV} ($\rho = -0,638$, $p = 0,008$). Параметар $t_{1/2} calc.^{IS}$ такође је негативно корелисао са PPB^{IV} ($\rho = -0,571$, $p = 0,021$). Ове повезаности указују да унутар серије једињења структурна својства која погодују пасивној пермеабилности и већем везивању за протеине плазме нису била иста својства која је модел повезивао са дужим полувременом елиминације.

Из перспективе оптимизације водећег једињења, централна фармакокинетичка порука је да је метаболизам представљао главну препреку за напредовање великог дела серије. Неколико аналога имало је разумну предвиђену оралну апсорпцију и веома брз микрозомални промет за који би се очекивало да компромитује системску изложеност. Због тога једињења **(75)** и **(79)**, упркос погодним својствима у другим аспектима, нису била убедљиви кандидати за даљи рад. Насупрот томе, једињења **(77)**, **(78)** и **(81)** имала су дуга микрозомална полувремена елиминације, али је ове предности требало одмерити у односу на њихова ограничења, пре свега изражен ефлукс у случају једињења **(77)** и веома слабу пермеабилност са израженом јонизацијом у случају једињења **(81)**. Једињења која су остала најпогоднија стога нису била она са појединачно најбољом вредношћу у било ком појединачном тесту, већ она која су постигла функционалан компромис између апсорпције, везивања за протеине плазме и метаболичке стабилности. Овај закључак је у потпуности у складу са запажањем да су, међу

свим испитаним фармакокинетичким доменима, метаболизам и екскреција били најнеповољнији. Предвиђања су била корисна јер су указала на метаболизам усмерен ка СУРЗА4 и могуће ризике од интеракција, али је експеримент са микрозомима био одлучујући за посматрање једињења. Управо је овај тест, више него било који појединачни *in silico* резултат, раздвојио фармакокинетички обећавајуће амиде од оних чије иначе повољне особине вероватно не би довеле до одговарајуће системске изложености.

Осврт на анализирание *in silico* и *in vitro* фармакокинетичке параметре и њихов значај за избор водећег једињења

Када се целокупно поређење сагледа заједно, јасно се издваја хијерархија у погледу практичне вредности рачунарски добијених резултата. Везивање за протеине плазме било је најбоље репродуковано подручје. Модел је потценио апсолутни степен везивања за протеине плазме, али је довољно добро задржао релативни редослед једињења да буде користан за њихово рангирање. Параметар *HIA prob.*¹⁵ је такође обухватио део експерименталног тренда пермеабилности и стога је био користан као рани показатељ слабе пасивне апсорпције. Насупрот томе, предвиђена *Caco-2* пермеабилност и предвиђени параметри елиминације нису били довољно тачни да замене експерименте. У испитиваној серији, ове параметре стога треба посматрати као контекстуалне дескрипторе, а не као показатеље за доношење одлука. Ова разлика је важна јер дефинише начин на који рачунарски фармакокинетички алат заиста треба да буде интегрисан у медицинску хемију – не као замена за експерименте, већ као рани водич чији се резултати морају експериментално потврдити, посебно када је вероватно да ће биологија транспортера и метаболичка разградња доминирати понашањем једињења.

Рангирање једињења изведено из овог интегрисаног приступа такође је боље од било ког рангирања заснованог на једном својству. Бирабресиб је задржао очекивану улогу доброг референтног једињења јер је имао веома повољну пермеабилност и умерену микрозомалну стабилност. Међу новим амидима, међутим, издвојила су се два једињења: једињење (82) и (85). Њихова главна заједничка предност била је метаболичка стабилност. Оба су показала умерене вредности CL_{int}^{IV} од 6,52 mL/min/kg и микрозомална полувремена елиминације од 3,19 сати, што их је јасно поставило испред (+)-JQ1 и далеко испред брзо метаболираних амида. Разлика између њих постаје видљива када се на те податке надовежу подаци о апсорпцији. Једињење (82) имало је користи од прихватљиве пасивне пермеабилности, али је његов апикално-базолатерални флуks остао низак (6,98 nm/s), а коефицијент ефлуksа висок (11,94), што указује да је његов иначе повољан профил стабилности био умањен проблематичним особинама које се тичу транспорта кроз епител. Једињење (85), насупрот томе, имало је високу РАМРА пермеабилност, знатно бољу апикално-базолатералну пермеабилност (66,46 nm/s) и много прихватљивији коефицијент ефлуksа (2,71). У оквиру овог скупа података, то је једињење (85) свеукупно учинило убедљивијим водећим једињењем. Ово тумачење је у блиској сагласности са ширим експерименталним током. Као што је разматрано у одељцима 4.3.5.-4.3.8., једињење (85) се већ издвојило као најбољи аналог када су заједно разматрани биохемијска потентност, ћелијска активност, растворљивост, пермеабилност, стабилност у плазми и микрозомална стабилност. Ова компаративна анализа додатно оснажује тај закључак из другог угла. Она показује да једињење (85) није било само потентан лиганд за бромодомене са прихватљивим експерименталним фармакокинетичким својствима, већ и један од аналога код којих рачунарска анализа није противречила повољној експерименталној слици, сврставајући ово једињење у релативно повољан део фармакокинетичког простора. Важно је да је ово тумачење потом потврђено и на *in vivo* нивоу. Једињење (85) је доспело до фармакокинетичких испитивања на мишевима и показало низак клиренс након IV примене уз високу оралну биорасположивост (60-70%), чиме је потврђено да је интегрисана стратегија скрининга успешно идентификовала водеће једињење које има перспективу за даљи развој.

Једињења која нису даље напредовала подједнако су корисна за дискусију. Једињења (75) и (79) показала су да јака пасивна пермеабилност или иначе повољна физичко-хемијска својства не

могу да надокнаде изражену микрозомалну нестабилност. Једињење (77) показало је да само дуго микрозомално полувреме елиминације није довољно када га прати изражен ефлукс, док је једињење (81) илустровало цену претераног померања ка јонизованом, изразито хидрофилном стању – добитак у стабилности плаћен је веома слабом пермеабилношћу, као и најнижим BBB_{pen}^{IS} и V_d^{IS} вредностима у читавој серији. Дакле, оптимизација скелета (+)-JQ1 била је успешна када је више ограничења истовремено умањено без губитка високог афинитета према бромодоменима ВЕТ протеина.

Узето заједно, компаративна *in silico/in vitro* анализа дала је прагматичан ток за будући дизајн аналога заснованих на скелету (+)-JQ1. Софтвер *ADMETlab 2.0* је био користан за брзо предвиђање вероватноће проласка кроз крвно-мождану баријеру, релативног везивања за протеине плазме, могућих проблема у погледу апсорпције и могућих ограничења посредованих CYP450 ензимима, нарочито у вези са CYP3A4. Међутим, модел није добро предвидео експериментално одређена својства серије. Параметар Cl_{int} пермеабилности је био прецењен, клиренс није био довољно прецизан, а процене полувремена елиминације биле су систематски дуже од оних измерених у хуманим микрозомима јетре. Сходно томе, највећа вредност рачунарских предикција није била њихова нумеричка тачност у сваком домену, већ способност да одреде која својства треба накнадно да буду проучена експериментално. Овако се на кохерентан начин затвара анализа амида изведених из (+)-JQ1 из угла медицинске хемије: рачунарска анализа помогла је у дефинисању очекивања која треба имати од једињења, *in vitro* тестови су указали на стварна ограничења, а касније *in vivo* испитивање једињења (85) показало је која својства заиста вреди даље унапређивати.

Обједињени преглед статистичких корелација између фармакокинетичких параметара предвиђених *in silico* и одређених *in vitro* дат је у Табели 36. На овај начин је омогућен укупни преглед у ком степену су рачунарски добијени резултати репродуковали експериментално одређена својства једињења у оквиру фармакокинетичких процеса апсорпције, дистрибуције, метаболизма и екскреције.

Табела 36. Статистичке корелације између фармакокинетичких параметара испитиваних инхибитора ВЕТ протеина добијених *in silico* и *in vitro*

		Резултати добијени <i>in vitro</i>							
		АПСОРПЦИЈА			ДИСТРИБУЦИЈА		МЕТАБОЛИЗАМ/ЕКСКРЕЦИЈА		
		R_{wmpa}	$R_{app\ A-B}$	$R_{app\ B-A}$	ER	PPB	CL_{int}	$t_{1/2}$	
РЕЗУЛТАТИ ДОБИЈЕНИ <i>in silico</i>	АПСОРПЦИЈА	$HLA\ prob.$	$\rho = -0,581$ $p = 0,042$	$\rho = -0,304$ $p = 0,252$	$\rho = -0,067$ $p = 0,805$	$\rho = 0,122$ $p = 0,652$	$\rho = -0,094$ $p = 0,729$	$\rho = 0,076$ $p = 0,779$	$\rho = -0,076$ $p = 0,779$
		$F(20\%)$	$\rho = -0,108$ $p = 0,713$	$\rho = -0,063$ $p = 0,818$	$\rho = 0,094$ $p = 0,729$	$\rho = 0,188$ $p = 0,486$	$\rho = -0,094$ $p = 0,729$	$\rho = 0,031$ $p = 0,908$	$\rho = -0,031$ $p = 0,908$
		$F(30\%)$	$\rho = -0,436$ $p = 0,119$	$\rho = -0,338$ $p = 0,200$	$\rho = -0,190$ $p = 0,480$	$\rho = 0,169$ $p = 0,531$	$\rho = 0,398$ $p = 0,127$	$\rho = 0,155$ $p = 0,566$	$\rho = -0,155$ $p = 0,566$
		$C_{aco-2}\ pert.$	$\rho = 0,053$ $p = 0,658$	$\rho = 0,303$ $p = 0,254$	$\rho = 0,491$ $p = 0,053$	$\rho = 0,279$ $p = 0,295$	$\rho = -0,091$ $p = 0,737$	$\rho = 0,091$ $p = 0,737$	$\rho = -0,091$ $p = 0,737$
		$C_{aco-2}\ pert.\ calc.$	$\rho = 0,053$ $p = 0,658$	$\rho = 0,303$ $p = 0,254$	$\rho = 0,491$ $p = 0,053$	$\rho = 0,279$ $p = 0,295$	$\rho = -0,091$ $p = 0,737$	$\rho = 0,091$ $p = 0,737$	$\rho = -0,091$ $p = 0,737$
	ДИСТРИБУЦИЈА	$MDCk\ pert.$	$\rho = 0,004$ $p = 0,988$	$\rho = 0,082$ $p = 0,762$	$\rho = 0,359$ $p = 0,172$	$\rho = 0,491$ $p = 0,053$	$\rho = -0,215$ $p = 0,425$	$\rho = -0,350$ $p = 0,184$	$\rho = 0,350$ $p = 0,184$
		$P\text{-}gr\ sub.$	$\rho = -0,550$ $p = 0,042$	$\rho = -0,462$ $p = 0,072$	$\rho = -0,206$ $p = 0,444$	$\rho = 0,412$ $p = 0,113$	$\rho = -0,308$ $p = 0,249$	$\rho = -0,468$ $p = 0,068$	$\rho = 0,468$ $p = 0,068$
		$P\text{-}gr\ inh.$	$\rho = 0,338$ $p = 0,237$	$\rho = 0,139$ $p = 0,609$	$\rho = -0,168$ $p = 0,533$	$\rho = -0,558$ $p = 0,025$	$\rho = 0,327$ $p = 0,217$	$\rho = 0,436$ $p = 0,092$	$\rho = -0,436$ $p = 0,092$
		$BBV\ rep.$	$\rho = 0,632$ $p = 0,015$	$\rho = 0,293$ $p = 0,271$	$\rho = 0,012$ $p = 0,965$	$\rho = -0,259$ $p = 0,332$	$\rho = 0,172$ $p = 0,523$	$\rho = 0,362$ $p = 0,168$	$\rho = -0,362$ $p = 0,168$
		PPB	$\rho = 0,790$ $p < 0,001$	$\rho = 0,403$ $p = 0,122$	$\rho = 0,068$ $p = 0,803$	$\rho = -0,376$ $p = 0,151$	$\rho = 0,656$ $p = 0,006$	$\rho = 0,494$ $p = 0,052$	$\rho = -0,494$ $p = 0,052$
МЕТАБОЛИЗАМ/ЕКСКРЕЦИЈА	V_d	$\rho = -0,257$ $p = 0,374$	$\rho = -0,126$ $p = 0,641$	$\rho = 0,312$ $p = 0,240$	$\rho = 0,685$ $p = 0,003$	$\rho = 0,082$ $p = 0,762$	$\rho = 0,244$ $p = 0,362$	$\rho = -0,244$ $p = 0,362$	
	F_u	$\rho = -0,739$ $p = 0,003$	$\rho = -0,371$ $p = 0,158$	$\rho = 0,032$ $p = 0,905$	$\rho = 0,456$ $p = 0,076$	$\rho = -0,491$ $p = 0,053$	$\rho = -0,312$ $p = 0,240$	$\rho = 0,312$ $p = 0,240$	
	CL	$\rho = -0,359$ $p = 0,208$	$\rho = -0,276$ $p = 0,300$	$\rho = -0,197$ $p = 0,464$	$\rho = 0,035$ $p = 0,897$	$\rho = 0,365$ $p = 0,165$	$\rho = 0,271$ $p = 0,311$	$\rho = -0,271$ $p = 0,311$	
	$t_{1/2}\ prob.$	$\rho = -0,915$ $p < 0,001$	$\rho = -0,488$ $p = 0,055$	$\rho = -0,068$ $p = 0,803$	$\rho = 0,365$ $p = 0,165$	$\rho = -0,638$ $p = 0,008$	$\rho = -0,432$ $p = 0,094$	$\rho = 0,432$ $p = 0,094$	
	$t_{1/2}\ calc.$	$\rho = 0,029$ $p = 0,923$	$\rho = 0,006$ $p = 0,983$	$\rho = 0,159$ $p = 0,557$	$\rho = 0,268$ $p = 0,316$	$\rho = -0,571$ $p = 0,021$	$\rho = -0,303$ $p = 0,254$	$\rho = 0,303$ $p = 0,254$	

Ћелије означене зеленом, жутом и црвеном бојом означавају јаку ($\rho \geq 0,700$ и $\rho \leq -0,700$), умерену ($0,400 \leq \rho < 0,700$ и $-0,400 \geq \rho > -0,700$) или слабу корелацију ($-0,400 < \rho < 0,400$) за $p < 0,050$.

4.3.10. Општи закључци о једињењима усмереним на ВЕТ протеине

Узето заједно, резултати за једињења усмерена на ВЕТ протеине подржавају следеће закључке:

- 1) Кристална структура BRD2(BD2) у комплексу са једињењем **(71)** (Слика 60А) употребљена је као основа за дизајн амида изведених из (+)-JQ1, од којих су неки имали бољу активност и/или физичко-хемијске и фармакокинетичке особине у односу на референтне инхибиторе ВЕТ протеина (+)-JQ1 и бирабресиб.
- 2) Афинитет за BD2 је генерално био већи него за BD1, а неколико амида који садрже хетероцикле надмашило је и (+)-JQ1 и бирабресиб у биохемијском TR-FRET тесту. У оквиру тог скупа, једињење **(85)** се издвојило као један од најснажнијих лиганата за бромодомене.
- 3) Однос између везивања за бромодомене и ћелијске антипролиферативне активности био је повољан, али не и апсолутан. Једињење **(77)** дефинисало је горњу границу потентности у ћелијама у најосетљивијим моделима, док је једињење **(85)** имало готово најбољу активност у ћелијама са укупним профилем који погодује даљем развоју овог једињења. Насупрот томе, једињења изведена из аминокиселина, посебно једињење **(80)**, показала су да одличан афинитет не обезбеђује сам по себи подједнако снажно дејство у ћелијама.
- 4) У *in vivo* испитивању, једињење **(85)** показало је низак клиренс након IV примене, уз високу оралну биорасположивост код мишева. Истовремено, компаративна *in silico/in vitro* анализа показала је да је рачунарско профилисање било корисно углавном за рангирање и рано оквирно процењивање једињења, док су експериментално добијени подаци из Сасо-2 ћелија и микрозома остали одлучујући за избор погодних једињења.

5. ЗАКЉУЧАК

Добијени резултати у овој докторској дисертацији подржавају следеће закључке:

- 1) У оквиру PROTAC молекула усмерених на HSP90 успостављена је јасна хијерархија скелета. Скелет пироло[2,3-*d*]пиримидина био је најбољи у овој студији, при чему су једињења **(3)** и **(7)** задржала веома снажно везивање за HSP90 и показала најбоље одговоре у CTG тесту на MV4-11 ћелијској линији.
- 2) Скелет тиено[2,3-*d*]пиримидина је показао да препознавање HSP90 може бити очувано након више стратегија увођења линкера, али је такође показао да очувани бинарни афинитет не гарантује подједнако снажну активност у ћелијама.
- 3) У оквиру серије деградера изведених из скелета 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазола, бензамидни лиганд био је убедљиво супериорнији у односу на бензонитрилну алтернативу. Иако је бензонитрилни инхибитор показао повољније особине, та предност је била поништена великим губитком афинитета за HSP90 и није довела до стварања активних PROTAC и НуТ молекула.
- 4) У целокупном скупу PROTAC молекула усмерених на HSP90, појединачни дескриптори нису били сами по себи довољни да објасне њихове коначне биолошке профиле. Дакле, учинак PROTAC молекула усмерених на HSP90 био је условљен комбинацијом структурних, физичко-хемијских и фармакокинетичких особина.
- 5) Скуп података за НуТ молекуле усмерене на HSP90 довео је до познатог централног закључка у погледу особина лиганда – у контексту тетрахидроиндазолских НуТ молекула, бензамидни лиганд је био јасно супериорнији у односу на бензонитрилну алтернативу. Стога, на активност НуТ молекула је утицао слаб афинитет лиганда изведеног из бензонитрила за HSP90. Ефекти линкера били су очигледни, пошто је њихово умерено продужење могло бити неповољно, док је прекомерно продужење јасно ослабило најуспешнији бензамидни НуТ молекул.
- 6) Иако су НуТ молекули били нешто повољнији по физичко-хемијским својствима од одговарајућих PROTAC молекула, то није само по себи омогућило снажан биолошки ефекат. Једињење **(65)** се издвојило као најкредибилнији молекул, јер је задржао субмикромоларно везивање за HSP90 и дао најизраженији одговор у CTG тесту међу НуТ молекулима. Ипак, серија у целини није дала довољно снажан образац активности у ћелијама који би оправдао процену деградације HSP90 *Western blot* анализом.
- 7) Амиди изведени из (+)-JQ1 били су веома успешни на биохемијском нивоу. Неколико амида који садрже хетероцикле надмашило је и (+)-JQ1 и бирабресиб у целокупном TR-FRET панелу. У оквиру испитиваних једињења, једињење **(85)** се издвојило као један од најснажнијих лиганада за бромодомене.
- 8) Посматрајући однос структуре и активности, оптимизовани амиди очували су уобичајени начин препознавања бромодомена од стране диазепинског језгра као код (+)-JQ1, а повећање потентности проистекло је из додатних интеракција у близини амидне групе на ободу цепа за везивање бромодомена. У том оквиру, положај хетероатома и последични образац интеракција посредованих водом били су важнији од једноставног увођења хетероцикла или броја хетероатома, при чему се једињење **(85)** издвојило својом посебном интеракцијом са Tug139.
- 9) Избор амида за даљи развој није се могао свести ни на један појединачни физичко-хемијски или фармакокинетички дескриптор, јер се растворљивост, пасивна пермеабилност, транспорт кроз епител, понашање у погледу ефлукса, стабилност у плазми и микрозомална стабилност нису кретали паралелно међу амидима. Стога, стратегија није била максимизација било ког појединачног параметра, већ идентификација једињења које је у највећој мери очувало високу потентност и избегло неповољна својства.

10) Једињење **(85)** се издвојило као кандидат са најбољим укупним особинама. Показало је веома снажно везивање за бромодомене ВЕТ протеина, високу активност у ћелијама, прихватљиву растворљивост, одговарајућу Сако-2 пермеабилност, знатно нижи ефлукс него неколико блиских конкурената, одличну стабилност у плазми и PBS-у, побољшану стабилност у хуманим микрозомима у односу на (+)-JQ1 и бирабресиб, потентну пан-инхибиторну активност према ВЕТ протеинима, са извесном релативном преференцијом за BRD4(BD1), а у MV4-11 ћелијама испољило је очекивани ефекат снижења c-Мус. Додатно, у *in vivo* тестирању на мишевима, једињење **(85)** је показало низак клиренс након IV примене, као и високу оралну биорасположивост.

11) Сагледавши целу дисертацију, део истраживања усмерен на HSP90 пружио је молекуле за будућа механистичка испитивања, а део усмерен на ВЕТ протеине завршен је добијањем једињења **(85)** као водећег једињења.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Toure, M.; Crews, C.M. Small-Molecule PROTACS: New Approaches to Protein Degradation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1966–1973, doi:10.1002/anie.201507978.
2. Lazo, J.S.; Sharlow, E.R. Drugging Undruggable Molecular Cancer Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 23–40, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103440.
3. Jin, L.; Wang, W.; Fang, G. Targeting Protein-Protein Interaction by Small Molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 435–456, doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-140028.
4. Adjei, A.A. What Is the Right Dose? The Elusive Optimal Biologic Dose in Phase I Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 4054–4055, doi:10.1200/JCO.2006.07.4658.
5. Paiva, S.-L.; Crews, C.M. Targeted Protein Degradation: Elements of PROTAC Design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *50*, 111–119, doi:10.1016/j.cbpa.2019.02.022.
6. An, S.; Fu, L. Small-Molecule PROTACs: An Emerging and Promising Approach for the Development of Targeted Therapy Drugs. *EBioMedicine* **2018**, *36*, 553–562, doi:10.1016/j.ebiom.2018.09.005.
7. Leiser, D.; Pochon, B.; Blank-Liss, W.; Francica, P.; Glück, A.A.; Aebersold, D.M.; Zimmer, Y.; Medová, M. Targeting of the MET Receptor Tyrosine Kinase by Small Molecule Inhibitors Leads to MET Accumulation by Impairing the Receptor Downregulation. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 653–658, doi:10.1016/j.febslet.2013.12.025.
8. Spiegel, J.; Cromm, P.M.; Zimmermann, G.; Grossmann, T.N.; Waldmann, H. Small-Molecule Modulation of Ras Signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 613–622, doi:10.1038/nchembio.1560.
9. Dogan, S.; Shen, R.; Ang, D.C.; Johnson, M.L.; D'Angelo, S.P.; Paik, P.K.; Brzostowski, E.B.; Riely, G.J.; Kris, M.G.; Zakowski, M.F.; et al. Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related KRAS-Mutant Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 6169–6177, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-3265.
10. Eisermann, K.; Wang, D.; Jing, Y.; Pascal, L.E.; Wang, Z. Androgen Receptor Gene Mutation, Rearrangement, Polymorphism. *Transl. Androl. Urol.* **2013**, *2*, 13747–13147, doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.15.
11. Neklesa, T.K.; Winkler, J.D.; Crews, C.M. Targeted Protein Degradation by PROTACs. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *174*, 138–144, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.027.
12. Liu, L. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *Protein Cell* **2018**, *9*, 15–32, doi:10.1007/s13238-017-0408-4.
13. Gaston, J.; Maestrali, N.; Lalle, G.; Gagnaire, M.; Masiero, A.; Dumas, B.; Dabdoubi, T.; Radošević, K.; Berne, P.-F. Intracellular Delivery of Therapeutic Antibodies into Specific Cells Using Antibody-Peptide Fusions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18688, doi:10.1038/s41598-019-55091-0.
14. Ryman, J.T.; Meibohm, B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* **2017**, *6*, 576–588, doi:10.1002/psp4.12224.
15. Nandi, S.; Kwong, A.T.; Holtz, B.R.; Erwin, R.L.; Marcel, S.; McDonald, K.A. Techno-Economic Analysis of a Transient Plant-Based Platform for Monoclonal Antibody Production. *mAbs* **2016**, *8*, 1456–1466, doi:10.1080/19420862.2016.1227901.
16. Kanasty, R.L.; Whitehead, K.A.; Vegas, A.J.; Anderson, D.G. Action and Reaction: The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 513–524, doi:10.1038/mt.2011.294.
17. Alemán, L.M.; Doench, J.; Sharp, P.A. Comparison of siRNA-Induced off-Target RNA and Protein Effects. *RNA* **2007**, *13*, 385–395, doi:10.1261/rna.352507.
18. Carthew, R.W.; Sontheimer, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **2009**, *136*, 642–655, doi:10.1016/j.cell.2009.01.035.
19. Yu, M.; Qin, J.; Liu, X.; Ramsden, D.; Williams, B.; Zlatev, I.; Guenther, D.; Matsuda, S.; Tymon, R.; Darcy, J.; et al. Evaluating the Oral Delivery of GalNAc-Conjugated siRNAs in Rodents and Non-Human Primates. *Nucleic Acids Res.* **2024**, *52*, 5423–5437, doi:10.1093/nar/gkae350.
20. Thompson, J.D.; Kornbrust, D.J.; Foy, J.W.-D.; Solano, E.C.R.; Schneider, D.J.; Feinstein, E.; Molitoris, B.A.; Erlich, S. Toxicological and Pharmacokinetic Properties of Chemically

- Modified siRNAs Targeting P53 RNA Following Intravenous Administration. *Nucleic Acid Ther.* **2012**, *22*, 255–264, doi:10.1089/nat.2012.0371.
21. Malek, A.; Merkel, O.; Fink, L.; Czubayko, F.; Kissel, T.; Aigner, A. *In Vivo* Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Underlying Mechanisms of Various PEI(–PEG)/siRNA Complexes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *236*, 97–108, doi:10.1016/j.taap.2009.01.014.
 22. Caplan, A.L.; Parent, B.; Shen, M.; Plunkett, C. No Time to Waste—the Ethical Challenges Created by CRISPR. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 1421–1426, doi:10.15252/embr.201541337.
 23. Liu, M.-S.; Gong, S.; Yu, H.-H.; Taylor, D.W.; Johnson, K.A. Chapter Thirteen - Kinetic Characterization of Cas9 Enzymes. In *Methods in Enzymology*; Bailey, S., Ed.; CRISPR-Cas Enzymes; Academic Press, 2019; Vol. 616, pp. 289–311.
 24. Rueda, J.; de Miguel Beriain, Í.; Montoliu, L. Affordable Pricing of CRISPR Treatments Is a Pressing Ethical Imperative. *CRISPR J.* **2024**, *7*, 220–226, doi:10.1089/crispr.2024.0042.
 25. Crews, C.M. Targeting the Undruggable Proteome: The Small Molecules of My Dreams. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 551–555, doi:10.1016/j.chembiol.2010.05.011.
 26. Deshaies, R.J. Prime Time for PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 634–635, doi:10.1038/nchembio.1887.
 27. Sun, X.; Gao, H.; Yang, Y.; He, M.; Wu, Y.; Song, Y.; Tong, Y.; Rao, Y. PROTACs: Great Opportunities for Academia and Industry. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2019**, *4*, 1–33, doi:10.1038/s41392-019-0101-6.
 28. Nelson, C.E.; Hakim, C.H.; Ousterout, D.G.; Thakore, P.I.; Moreb, E.A.; Rivera, R.M.C.; Madhavan, S.; Pan, X.; Ran, F.A.; Yan, W.X.; et al. In Vivo Genome Editing Improves Muscle Function in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Science* **2016**, *351*, 403–407, doi:10.1126/science.aad5143.
 29. Koravović, M.; Marković, B.; Kovačević, M.; Rmandić, M.; Tasić, G. Protein Degradation Induced by PROTAC Molecules as an Emerging Drug Discovery Strategy: Survey. *J. Serbian Chem. Soc.* **2022**, *87*, 785–811, doi:10.2298/JSC211209027K.
 30. Lai, A.C.; Crews, C.M. Induced Protein Degradation: An Emerging Drug Discovery Paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 101–114, doi:10.1038/nrd.2016.211.
 31. Cromm, P.M.; Crews, C.M. Targeted Protein Degradation: From Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1181–1190, doi:10.1016/j.chembiol.2017.05.024.
 32. Yoon, H.; Rutter, J.C.; Li, Y.-D.; Ebert, B.L. Induced Protein Degradation for Therapeutics: Past, Present, and Future. *J. Clin. Invest.* **2024**, *134*, doi:10.1172/JCI175265.
 33. Li, X.; Pu, W.; Zheng, Q.; Ai, M.; Chen, S.; Peng, Y. Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs) in Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2022**, *21*, 99, doi:10.1186/s12943-021-01434-3.
 34. Becker, S.; Groner, B.; Müller, C.W. Three-Dimensional Structure of the Stat3 β Homodimer Bound to DNA. *Nature* **1998**, *394*, 145–151, doi:10.1038/28101.
 35. Duffy, M.J.; O’Grady, S.; Tang, M.; Crown, J. MYC as a Target for Cancer Treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2021**, *94*, 102154, doi:10.1016/j.ctrv.2021.102154.
 36. Nair, S.K.; Burley, S.K. X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA: Molecular Bases of Regulation by Proto-Oncogenic Transcription Factors. *Cell* **2003**, *112*, 193–205, doi:10.1016/S0092-8674(02)01284-9.
 37. Bai, L.; Zhou, H.; Xu, R.; Zhao, Y.; Chinnaswamy, K.; McEachern, D.; Chen, J.; Yang, C.-Y.; Liu, Z.; Wang, M.; et al. A Potent and Selective Small-Molecule Degradator of STAT3 Achieves Complete Tumor Regression *In Vivo*. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 498–511.e17, doi:10.1016/j.ccell.2019.10.002.
 38. Siokatas, C.; Lampropoulou, A.; Smina, A.; Soupsana, K.; Kontostathi, M.; Karra, A.-V.; Karampelas, T.; Politou, A.S.; Christoforidis, S.; Tamvakopoulos, C.; et al. Developing MYC Degradators Bearing the Von Hippel–Lindau Ligand to Target the “Undruggable” MYC. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2024**, *7*, 3955–3968, doi:10.1021/acspsci.4c00452.
 39. Kiely-Collins, H.; Winter, G.E.; Bernardes, G.J.L. The Role of Reversible and Irreversible Covalent Chemistry in Targeted Protein Degradation. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 952–968, doi:10.1016/j.chembiol.2021.03.005.

40. Burke, M.R.; Smith, A.R.; Zheng, G. Overcoming Cancer Drug Resistance Utilizing PROTAC Technology. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, doi:10.3389/fcell.2022.872729.
41. Yesilkanal, A.E.; Johnson, G.L.; Ramos, A.F.; Rosner, M.R. New Strategies for Targeting Kinase Networks in Cancer. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101128, doi:10.1016/j.jbc.2021.101128.
42. Nandi, D.; Tahiliani, P.; Kumar, A.; Chandu, D. The Ubiquitin-Proteasome System. *J. Biosci.* **2006**, *31*, 137–155, doi:10.1007/BF02705243.
43. Ciechanover, A. The Ubiquitin–Proteasome Pathway: On Protein Death and Cell Life. *EMBO J.* **1998**, *17*, 7151–7160, doi:10.1093/emboj/17.24.7151.
44. Jin, J.; Li, X.; Gygi, S.P.; Harper, J.W. Dual E1 Activation Systems for Ubiquitin Differentially Regulate E2 Enzyme Charging. *Nature* **2007**, *447*, 1135–1138, doi:10.1038/nature05902.
45. Stewart, M.D.; Ritterhoff, T.; Klevit, R.E.; Brzovic, P.S. E2 Enzymes: More than Just Middle Men. *Cell Res.* **2016**, *26*, 423–440, doi:10.1038/cr.2016.35.
46. Zheng, N.; Shabek, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 129–157, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014922.
47. Hann, Z.S.; Ji, C.; Olsen, S.K.; Lu, X.; Lux, M.C.; Tan, D.S.; Lima, C.D. Structural Basis for Adenylation and Thioester Bond Formation in the Ubiquitin E1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 15475–15484, doi:10.1073/pnas.1905488116.
48. Truongvan, N.; Li, S.; Misra, M.; Kuhn, M.; Schindelin, H. Structures of UBA6 Explain Its Dual Specificity for Ubiquitin and FAT10. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 4789, doi:10.1038/s41467-022-32040-6.
49. Liao, Y.; Zhang, W.; Liu, Y.; Zhu, C.; Zou, Z. The Role of Ubiquitination in Health and Disease. *MedComm* **2024**, *5*, e736, doi:10.1002/mco2.736.
50. Osborne, H.C.; Irving, E.; Forment, J.V.; Schmidt, C.K. E2 Enzymes in Genome Stability: Pulling the Strings behind the Scenes. *Trends Cell Biol.* **2021**, *31*, 628–643, doi:10.1016/j.tcb.2021.01.009.
51. Liwocha, J.; Krist, D.T.; van der Heden van Noort, G.J.; Hansen, F.M.; Truong, V.H.; Karayel, O.; Purser, N.; Houston, D.; Burton, N.; Bostock, M.J.; et al. Linkage-Specific Ubiquitin Chain Formation Depends on a Lysine Hydrocarbon Ruler. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 272–279, doi:10.1038/s41589-020-00696-0.
52. Soss, S.E.; Yue, Y.; Dhe-Paganon, S.; Chazin, W.J. E2 Conjugating Enzyme Selectivity and Requirements for Function of the E3 Ubiquitin Ligase CHIP*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21277–21286, doi:10.1074/jbc.M111.224006.
53. Ye, Y.; Rape, M. Building Ubiquitin Chains: E2 Enzymes at Work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 755–764, doi:10.1038/nrm2780.
54. Vittal, V.; Stewart, M.D.; Brzovic, P.S.; Klevit, R.E. Regulating the Regulators: Recent Revelations in the Control of E3 Ubiquitin Ligases*. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 21244–21251, doi:10.1074/jbc.R115.675165.
55. Ohi, M.D.; Vander Kooi, C.W.; Rosenberg, J.A.; Chazin, W.J.; Gould, K.L. Structural Insights into the U-Box, a Domain Associated with Multi-Ubiquitination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 250–255, doi:10.1038/nsb906.
56. Dove, K.K.; Stieglitz, B.; Duncan, E.D.; Rittinger, K.; Klevit, R.E. Molecular Insights into RBR E3 Ligase Ubiquitin Transfer Mechanisms. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1221–1235, doi:10.15252/embr.201642641.
57. Pruneda, J.N.; Littlefield, P.J.; Soss, S.E.; Nordquist, K.A.; Chazin, W.J.; Brzovic, P.S.; Klevit, R.E. Structure of an E3:E2~Ub Complex Reveals an Allosteric Mechanism Shared among RING/U-Box Ligases. *Mol. Cell* **2012**, *47*, 933–942, doi:10.1016/j.molcel.2012.07.001.
58. Zheng, N.; Schulman, B.A.; Song, L.; Miller, J.J.; Jeffrey, P.D.; Wang, P.; Chu, C.; Koepf, D.M.; Elledge, S.J.; Pagano, M.; et al. Structure of the Cull1–Rbx1–Skp1–F boxSkp2 SCF Ubiquitin Ligase Complex. *Nature* **2002**, *416*, 703–709, doi:10.1038/416703a.
59. Sivakumar, S.; Gorbsky, G.J. Spatiotemporal Regulation of the Anaphase-Promoting Complex in Mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 82–94, doi:10.1038/nrm3934.

60. Poyurovsky, M.V.; Priest, C.; Kentsis, A.; Borden, K.L.; Pan, Z.; Pavletich, N.; Prives, C. The Mdm2 RING Domain C-terminus Is Required for Supramolecular Assembly and Ubiquitin Ligase Activity. *EMBO J.* **2007**, *26*, 90–101, doi:10.1038/sj.emboj.7601465.
61. Fang, S.; Jensen, J.P.; Ludwig, R.L.; Vousden, K.H.; Weissman, A.M. Mdm2 Is a RING Finger-Dependent Ubiquitin Protein Ligase for Itself and P53*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8945–8951, doi:10.1074/jbc.275.12.8945.
62. Dou, H.; Buetow, L.; Sibbet, G.J.; Cameron, K.; Huang, D.T. Essentiality of a Non-RING Element in Priming Donor Ubiquitin for Catalysis by a Monomeric E3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 982–986, doi:10.1038/nsmb.2621.
63. Peschard, P.; Fournier, T.M.; Lamorte, L.; Naujokas, M.A.; Band, H.; Langdon, W.Y.; Park, M. Mutation of the C-Cbl TKB Domain Binding Site on the Met Receptor Tyrosine Kinase Converts It into a Transforming Protein. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 995–1004, doi:10.1016/S1097-2765(01)00378-1.
64. Brzovic, P.S.; Rajagopal, P.; Hoyt, D.W.; King, M.-C.; Klevit, R.E. Structure of a BRCA1–BARD1 Heterodimeric RING–RING Complex. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 833–837, doi:10.1038/nsb1001-833.
65. Christensen, D.E.; Brzovic, P.S.; Klevit, R.E. E2–BRCA1 RING Interactions Dictate Synthesis of Mono- or Specific Polyubiquitin Chain Linkages. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 941–948, doi:10.1038/nsmb1295.
66. Scheffner, M.; Nuber, U.; Huibregtse, J.M. Protein Ubiquitination Involving an E1–E2–E3 Enzyme Ubiquitin Thioester Cascade. *Nature* **1995**, *373*, 81–83, doi:10.1038/373081a0.
67. Huang, L.; Kinnucan, E.; Wang, G.; Beaudenon, S.; Howley, P.M.; Huibregtse, J.M.; Pavletich, N.P. Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *Science* **1999**, *286*, 1321–1326, doi:10.1126/science.286.5443.1321.
68. Persaud, A.; Alberts, P.; Amsen, E.M.; Xiong, X.; Wasmuth, J.; Saadon, Z.; Fladd, C.; Parkinson, J.; Rotin, D. Comparison of Substrate Specificity of the Ubiquitin Ligases Nedd4 and Nedd4-2 Using Proteome Arrays. *Mol. Syst. Biol.* **2009**, *5*, 333, doi:10.1038/msb.2009.85.
69. Plant, P.J.; Yeger, H.; Staub, O.; Howard, P.; Rotin, D. The C2 Domain of the Ubiquitin Protein Ligase Nedd4 Mediates Ca²⁺-Dependent Plasma Membrane Localization*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32329–32336, doi:10.1074/jbc.272.51.32329.
70. Hochrainer, K.; Mayer, H.; Baranyi, U.; Binder, BerndR.; Lipp, J.; Kroismayr, R. The Human HERC Family of Ubiquitin Ligases: Novel Members, Genomic Organization, Expression Profiling, and Evolutionary Aspects. *Genomics* **2005**, *85*, 153–164, doi:10.1016/j.ygeno.2004.10.006.
71. Lemak, A.; Yee, A.; Bezsonova, I.; Dhe-Paganon, S.; Arrowsmith, C.H. Zn-Binding AZUL Domain of Human Ubiquitin Protein Ligase Ube3A. *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 185, doi:10.1007/s10858-011-9552-y.
72. Zhong, Q.; Gao, W.; Du, F.; Wang, X. Mule/ARF-BP1, a BH3-Only E3 Ubiquitin Ligase, Catalyzes the Polyubiquitination of Mcl-1 and Regulates Apoptosis. *Cell* **2005**, *121*, 1085–1095, doi:10.1016/j.cell.2005.06.009.
73. Wiesner, S.; Ogunjimi, A.A.; Wang, H.-R.; Rotin, D.; Sicheri, F.; Wrana, J.L.; Forman-Kay, J.D. Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell* **2007**, *130*, 651–662, doi:10.1016/j.cell.2007.06.050.
74. Persaud, A.; Alberts, P.; Hayes, M.; Guettler, S.; Clarke, I.; Sicheri, F.; Dirks, P.; Ciruna, B.; Rotin, D. Nedd4-1 Binds and Ubiquitylates Activated FGFR1 to Control Its Endocytosis and Function. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3259–3273, doi:10.1038/emboj.2011.234.
75. Scheffner, M.; Huibregtse, J.M.; Vierstra, R.D.; Howley, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of P53. *Cell* **1993**, *75*, 495–505, doi:10.1016/0092-8674(93)90384-3.
76. Adhikary, S.; Marinoni, F.; Hock, A.; Hulleman, E.; Popov, N.; Beier, R.; Bernard, S.; Quarto, M.; Capra, M.; Goettig, S.; et al. The Ubiquitin Ligase HectH9 Regulates Transcriptional

- Activation by Myc and Is Essential for Tumor Cell Proliferation. *Cell* **2005**, *123*, 409–421, doi:10.1016/j.cell.2005.08.016.
77. Cotton, T.R.; Lechtenberg, B.C. Chain Reactions: Molecular Mechanisms of RBR Ubiquitin Ligases. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48*, 1737–1750, doi:10.1042/BST20200237.
 78. Zheng, N.; Wang, P.; Jeffrey, P.D.; Pavletich, N.P. Structure of a C-Cbl–UbcH7 Complex: RING Domain Function in Ubiquitin-Protein Ligases. *Cell* **2000**, *102*, 533–539, doi:10.1016/S0092-8674(00)00057-X.
 79. Stieglitz, B.; Morris-Davies, A.C.; Koliopoulos, M.G.; Christodoulou, E.; Rittinger, K. LUBAC Synthesizes Linear Ubiquitin Chains via a Thioester Intermediate. *EMBO Rep.* **2012**, *13*, 840–846, doi:10.1038/embor.2012.105.
 80. Spratt, D.E.; Mercier, P.; Shaw, G.S. Structure of the HHARI Catalytic Domain Shows Glimpses of a HECT E3 Ligase. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e74047, doi:10.1371/journal.pone.0074047.
 81. Kitada, T.; Asakawa, S.; Hattori, N.; Matsumine, H.; Yamamura, Y.; Minoshima, S.; Yokochi, M.; Mizuno, Y.; Shimizu, N. Mutations in the Parkin Gene Cause Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. *Nature* **1998**, *392*, 605–608, doi:10.1038/33416.
 82. Chaugule, V.K.; Burchell, L.; Barber, K.R.; Sidhu, A.; Leslie, S.J.; Shaw, G.S.; Walden, H. Autoregulation of Parkin Activity through Its Ubiquitin-like Domain. *EMBO J.* **2011**, *30*, 2853–2867, doi:10.1038/emboj.2011.204.
 83. Koyano, F.; Okatsu, K.; Kosako, H.; Tamura, Y.; Go, E.; Kimura, M.; Kimura, Y.; Tsuchiya, H.; Yoshihara, H.; Hirokawa, T.; et al. Ubiquitin Is Phosphorylated by PINK1 to Activate Parkin. *Nature* **2014**, *510*, 162–166, doi:10.1038/nature13392.
 84. Smit, J.J.; Monteferrario, D.; Noordermeer, S.M.; van Dijk, W.J.; van der Reijden, B.A.; Sixma, T.K. The E3 Ligase HOIP Specifies Linear Ubiquitin Chain Assembly through Its RING-IBR-RING Domain and the Unique LDD Extension. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3833–3844, doi:10.1038/emboj.2012.217.
 85. Dittmar, G.; Winklhofer, K.F. Linear Ubiquitin Chains: Cellular Functions and Strategies for Detection and Quantification. *Front. Chem.* **2020**, *7*, doi:10.3389/fchem.2019.00915.
 86. Peng, J.; Schwartz, D.; Elias, J.E.; Thoreen, C.C.; Cheng, D.; Marsischky, G.; Roelofs, J.; Finley, D.; Gygi, S.P. A Proteomics Approach to Understanding Protein Ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 921–926, doi:10.1038/nbt849.
 87. Chau, V.; Tobias, J.W.; Bachmair, A.; Marriott, D.; Ecker, D.J.; Gonda, D.K.; Varshavsky, A. A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein. *Science* **1989**, *243*, 1576–1583, doi:10.1126/science.2538923.
 88. Thrower, J.S.; Hoffman, L.; Rechsteiner, M.; Pickart, C.M. Recognition of the Polyubiquitin Proteolytic Signal. *EMBO J.* **2000**, *19*, 94–102, doi:10.1093/emboj/19.1.94.
 89. Wu, T.; Merbl, Y.; Huo, Y.; Gallop, J.L.; Tzur, A.; Kirschner, M.W. UBE2S Drives Elongation of K11-Linked Ubiquitin Chains by the Anaphase-Promoting Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1355–1360, doi:10.1073/pnas.0912802107.
 90. Deng, L.; Wang, C.; Spencer, E.; Yang, L.; Braun, A.; You, J.; Slaughter, C.; Pickart, C.; Chen, Z.J. Activation of the IκB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* **2000**, *103*, 351–361, doi:10.1016/S0092-8674(00)00126-4.
 91. Hofmann, R.M.; Pickart, C.M. Noncanonical MMS2-Encoded Ubiquitin-Conjugating Enzyme Functions in Assembly of Novel Polyubiquitin Chains for DNA Repair. *Cell* **1999**, *96*, 645–653, doi:10.1016/S0092-8674(00)80575-9.
 92. Duncan, L.M.; Piper, S.; Dodd, R.B.; Saville, M.K.; Sanderson, C.M.; Luzio, J.P.; Lehner, P.J. Lysine-63-linked Ubiquitination Is Required for Endolysosomal Degradation of Class I Molecules. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1635–1645, doi:10.1038/sj.emboj.7601056.
 93. Tokunaga, F.; Sakata, S.; Saeki, Y.; Satomi, Y.; Kirisako, T.; Kamei, K.; Nakagawa, T.; Kato, M.; Murata, S.; Yamaoka, S.; et al. Involvement of Linear Polyubiquitylation of NEMO in NF-κB Activation. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 123–132, doi:10.1038/ncb1821.

94. Laplantine, E.; Fontan, E.; Chiaravalli, J.; Lopez, T.; Lakisic, G.; Véron, M.; Agou, F.; Israël, A. NEMO Specifically Recognizes K63-linked Poly-ubiquitin Chains through a New Bipartite Ubiquitin-binding Domain. *EMBO J.* **2009**, *28*, 2885–2895, doi:10.1038/emboj.2009.241.
95. Liu, P.; Gan, W.; Su, S.; Hauenstein, A.V.; Fu, T.; Brasher, B.; Schwerdtfeger, C.; Liang, A.C.; Xu, M.; Wei, W. K63-Linked Polyubiquitin Chains Bind to DNA to Facilitate DNA Damage Repair. *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaar8133, doi:10.1126/scisignal.aar8133.
96. McIntyre, J.; Vidal, A.E.; McLenigan, M.P.; Bomar, M.G.; Curti, E.; McDonald, J.P.; Plosky, B.S.; Ohashi, E.; Woodgate, R. Ubiquitin Mediates the Physical and Functional Interaction between Human DNA Polymerases η and ι . *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1649–1660, doi:10.1093/nar/gks1277.
97. Wu, C.-Y.; Kang, H.-Y.; Yang, W.-L.; Wu, J.; Jeong, Y.S.; Wang, J.; Chan, C.-H.; Lee, S.-W.; Zhang, X.; Lamothe, B.; et al. Critical Role of Monoubiquitination of Histone H2AX Protein in Histone H2AX Phosphorylation and DNA Damage Response*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 30806–30815, doi:10.1074/jbc.M111.257469.
98. Terrell, J.; Shih, S.; Dunn, R.; Hicke, L. A Function for Monoubiquitination in the Internalization of a G Protein–Coupled Receptor. *Mol. Cell* **1998**, *1*, 193–202, doi:10.1016/S1097-2765(00)80020-9.
99. McCormick, L.E.; Suarez, C.; Herring, L.E.; Cannon, K.S.; Kovar, D.R.; Brown, N.G.; Gupton, S.L. Multi-Monoubiquitylation Controls VASP-Mediated Actin Dynamics. *J. Cell Sci.* **2024**, *137*, jcs261527, doi:10.1242/jcs.261527.
100. Bothos, J.; Summers, M.K.; Venere, M.; Scolnick, D.M.; Halazonetis, T.D. The Chfr Mitotic Checkpoint Protein Functions with Ubc13-Mms2 to Form Lys63-Linked Polyubiquitin Chains. *Oncogene* **2003**, *22*, 7101–7107, doi:10.1038/sj.onc.1206831.
101. Petroski, M.D.; Deshaies, R.J. Mechanism of Lysine 48-Linked Ubiquitin-Chain Synthesis by the Cullin-RING Ubiquitin-Ligase Complex SCF-Cdc34. *Cell* **2005**, *123*, 1107–1120, doi:10.1016/j.cell.2005.09.033.
102. Kirisako, T.; Kamei, K.; Murata, S.; Kato, M.; Fukumoto, H.; Kanie, M.; Sano, S.; Tokunaga, F.; Tanaka, K.; Iwai, K. A Ubiquitin Ligase Complex Assembles Linear Polyubiquitin Chains. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4877–4887, doi:10.1038/sj.emboj.7601360.
103. French, M.E.; Klosowiak, J.L.; Aslanian, A.; Reed, S.I.; Yates, J.R.; Hunter, T. Mechanism of Ubiquitin Chain Synthesis Employed by a HECT Domain Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 10398–10413, doi:10.1074/jbc.M117.789479.
104. Bond, M.J.; Crews, C.M. Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs) Come of Age: Entering the Third Decade of Targeted Protein Degradation. *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 725–742, doi:10.1039/D1CB00011J.
105. Ciechanover, A.; Heller, H.; Elias, S.; Haas, A.L.; Hershko, A. ATP-Dependent Conjugation of Reticulocyte Proteins with the Polypeptide Required for Protein Degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 1365–1368, doi:10.1073/pnas.77.3.1365.
106. Hershko, A.; Ciechanover, A.; Heller, H.; Haas, A.L.; Rose, I.A. Proposed Role of ATP in Protein Breakdown: Conjugation of Protein with Multiple Chains of the Polypeptide of ATP-Dependent Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 1783–1786, doi:10.1073/pnas.77.4.1783.
107. Winston, J.T.; Strack, P.; Beer-Romero, P.; Chu, C.Y.; Elledge, S.J.; Harper, J.W. The SCF β -TRCP–Ubiquitin Ligase Complex Associates Specifically with Phosphorylated Destruction Motifs in I κ B α and β -Catenin and Stimulates I κ B α Ubiquitination in Vitro. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 270–283.
108. Orian, A.; Gonen, H.; Bercovich, B.; Fajerman, I.; Eytan, E.; Israël, A.; Mercurio, F.; Iwai, K.; Schwartz, A.L.; Ciechanover, A. SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase-mediated Processing of NF- κ B p 105 Requires Phosphorylation of Its C-terminus by I κ B Kinase. *EMBO J.* **2000**, *19*, 2580–2591, doi:10.1093/emboj/19.11.2580.
109. Amara, J.F.; Clackson, T.; Rivera, V.M.; Guo, T.; Keenan, T.; Natesan, S.; Pollock, R.; Yang, W.; Courage, N.L.; Holt, D.A.; et al. A Versatile Synthetic Dimerizer for the Regulation of

- Protein–Protein Interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 10618–10623, doi:10.1073/pnas.94.20.10618.
110. Sakamoto, K.M.; Kim, K.B.; Kumagai, A.; Mercurio, F.; Crews, C.M.; Deshaies, R.J. Protacs: Chimeric Molecules That Target Proteins to the Skp1–Cullin–F Box Complex for Ubiquitination and Degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 8554–8559, doi:10.1073/pnas.141230798.
 111. Sakamoto, K.M.; Kim, K.B.; Verma, R.; Ransick, A.; Stein, B.; Crews, C.M.; Deshaies, R.J. Development of Protacs to Target Cancer-Promoting Proteins for Ubiquitination and Degradation*. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1350–1358, doi:10.1074/mcp.T300009-MCP200.
 112. Schneekloth, J.S.Jr.; Fonseca, F.N.; Koldobskiy, M.; Mandal, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C.M. Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3748–3754, doi:10.1021/ja039025z.
 113. Schneekloth, A.R.; Pucheault, M.; Tae, H.S.; Crews, C.M. Targeted Intracellular Protein Degradation Induced by a Small Molecule: En Route to Chemical Proteomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5904–5908, doi:10.1016/j.bmcl.2008.07.114.
 114. Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. Protein Knockdown Using Methyl Bestatin–Ligand Hybrid Molecules: Design and Synthesis of Inducers of Ubiquitination-Mediated Degradation of Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5820–5826, doi:10.1021/ja100691p.
 115. Sekine, K.; Takubo, K.; Kikuchi, R.; Nishimoto, M.; Kitagawa, M.; Abe, F.; Nishikawa, K.; Tsuruo, T.; Naito, M. Small Molecules Destabilize cIAP1 by Activating Auto-Ubiquitylation*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8961–8968, doi:10.1074/jbc.M709525200.
 116. McBride, W.G. THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES. *The Lancet* **1961**, *278*, 1358, doi:10.1016/S0140-6736(61)90927-8.
 117. Ito, T.; Ando, H.; Suzuki, T.; Ogura, T.; Hotta, K.; Imamura, Y.; Yamaguchi, Y.; Handa, H. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* **2010**, *327*, 1345–1350, doi:10.1126/science.1177319.
 118. Krönke, J.; Udeshi, N.D.; Narla, A.; Grauman, P.; Hurst, S.N.; McConkey, M.; Svinkina, T.; Heckl, D.; Comer, E.; Li, X.; et al. Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science* **2014**, *343*, 301–305, doi:10.1126/science.1244851.
 119. Lu, J.; Qian, Y.; Altieri, M.; Dong, H.; Wang, J.; Raina, K.; Hines, J.; Winkler, J.D.; Crew, A.P.; Coleman, K.; et al. Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 755–763, doi:10.1016/j.chembiol.2015.05.009.
 120. Winter, G.E.; Buckley, D.L.; Paulk, J.; Roberts, J.M.; Souza, A.; Dhe-Paganon, S.; Bradner, J.E. Phthalimide Conjugation as a Strategy for in Vivo Target Protein Degradation. *Science* **2015**, *348*, 1376–1381, doi:10.1126/science.aab1433.
 121. Iwai, K.; Yamanaka, K.; Kamura, T.; Minato, N.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W.; Klausner, R.D.; Pause, A. Identification of the von Hippel–Lindau Tumor-Suppressor Protein as Part of an Active E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 12436–12441, doi:10.1073/pnas.96.22.12436.
 122. Lisztwan, J.; Imbert, G.; Wirbelauer, C.; Gstaiger, M.; Krek, W. The von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Protein Is a Component of an E3 Ubiquitin–Protein Ligase Activity. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1822–1833.
 123. Cockman, M.E.; Masson, N.; Mole, D.R.; Jaakkola, P.; Chang, G.-W.; Clifford, S.C.; Maher, E.R.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J.; Maxwell, P.H. Hypoxia Inducible Factor- α Binding and Ubiquitylation by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25733–25741, doi:10.1074/jbc.M002740200.
 124. Kamura, T.; Sato, S.; Iwai, K.; Czyzyk-Krzeska, M.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W. Activation of HIF1 α Ubiquitination by a Reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 10430–10435, doi:10.1073/pnas.190332597.

125. Tanimoto, K.; Makino, Y.; Pereira, T.; Poellinger, L. Mechanism of Regulation of the Hypoxia-inducible Factor-1 α by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *EMBO J.* **2000**, *19*, 4298–4309, doi:10.1093/emboj/19.16.4298.
126. Buckley, D.L.; Van Molle, I.; Gareiss, P.C.; Tae, H.S.; Michel, J.; Noblin, D.J.; Jorgensen, W.L.; Ciulli, A.; Crews, C.M. Targeting the von Hippel–Lindau E3 Ubiquitin Ligase Using Small Molecules To Disrupt the VHL/HIF-1 α Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4465–4468, doi:10.1021/ja209924v.
127. Buckley, D.L.; Gustafson, J.L.; Van Molle, I.; Roth, A.G.; Tae, H.S.; Gareiss, P.C.; Jorgensen, W.L.; Ciulli, A.; Crews, C.M. Small-Molecule Inhibitors of the Interaction between the E3 Ligase VHL and HIF1 α . *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11463–11467, doi:10.1002/anie.201206231.
128. Galdeano, C.; Gadd, M.S.; Soares, P.; Scaffidi, S.; Van Molle, I.; Birced, I.; Hewitt, S.; Dias, D.M.; Ciulli, A. Structure-Guided Design and Optimization of Small Molecules Targeting the Protein–Protein Interaction between the von Hippel–Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase and the Hypoxia Inducible Factor (HIF) Alpha Subunit with in Vitro Nanomolar Affinities. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8657–8663, doi:10.1021/jm5011258.
129. Zengerle, M.; Chan, K.-H.; Ciulli, A. Selective Small Molecule Induced Degradation of the BET Bromodomain Protein BRD4. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1770–1777, doi:10.1021/acscchembio.5b00216.
130. Gadd, M.S.; Testa, A.; Lucas, X.; Chan, K.-H.; Chen, W.; Lamont, D.J.; Zengerle, M.; Ciulli, A. Structural Basis of PROTAC Cooperative Recognition for Selective Protein Degradation. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 514–521, doi:10.1038/nchembio.2329.
131. Arvinas Announces Initiation of Patient Dosing in the First Phase 1 Clinical Trial of PROTAC™ Protein Degradator, ARV-110 | Arvinas Available online: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-announces-initiation-patient-dosing-first-phase-1/> (accessed on 10 October 2025).
132. Arvinas Announces the Initiation of Patient Dosing in a First-in-Human Phase 1 Study of ARV-471, an Estrogen Receptor-Targeting PROTAC® Protein Degradator | Arvinas Available online: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-announces-initiation-patient-dosing-first-human-phase-1/> (accessed on 10 October 2025).
133. Petrylak, D.P.; Gao, X.; Vogelzang, N.J.; Garfield, M.H.; Taylor, I.; Dougan Moore, M.; Peck, R.A.; Burris, H.A. First-in-Human Phase I Study of ARV-110, an Androgen Receptor (AR) PROTAC Degradator in Patients (Pts) with Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer (mCRPC) Following Enzalutamide (ENZ) and/or Abiraterone (ABI). *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3500–3500, doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3500.
134. Gao, X.; Burris III, H.A.; Vuky, J.; Dreicer, R.; Sartor, A.O.; Sternberg, C.N.; Percent, I.J.; Hussain, M.H.A.; Rezazadeh Kalebasty, A.; Shen, J.; et al. Phase 1/2 Study of ARV-110, an Androgen Receptor (AR) PROTAC Degradator, in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, 17–17, doi:10.1200/JCO.2022.40.6_suppl.017.
135. Hamilton, E.P.; Schott, A.F.; Nanda, R.; Lu, H.; Keung, C.F.; Gedrich, R.; Parameswaran, J.; Han, H.S.; Hurvitz, S.A. ARV-471, an Estrogen Receptor (ER) PROTAC Degradator, Combined with Palbociclib in Advanced ER+/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative (HER2–) Breast Cancer: Phase 1b Cohort (Part C) of a Phase 1/2 Study. *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, TPS1120–TPS1120, doi:10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.TPS1120.
136. Wurz, R.P.; Rui, H.; Dellamaggiore, K.; Ghimire-Rijal, S.; Choi, K.; Smither, K.; Amegadzie, A.; Chen, N.; Li, X.; Banerjee, A.; et al. Affinity and Cooperativity Modulate Ternary Complex Formation to Drive Targeted Protein Degradation. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 4177, doi:10.1038/s41467-023-39904-5.
137. Testa, A.; Lucas, X.; Castro, G.V.; Chan, K.-H.; Wright, J.E.; Runcie, A.C.; Gadd, M.S.; Harrison, W.T.A.; Ko, E.-J.; Fletcher, D.; et al. 3-Fluoro-4-Hydroxyprolines: Synthesis, Conformational Analysis, and Stereoselective Recognition by the VHL E3 Ubiquitin Ligase for

- Targeted Protein Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 9299–9313, doi:10.1021/jacs.8b05807.
138. Bondeson, D.P.; Smith, B.E.; Burslem, G.M.; Buhimschi, A.D.; Hines, J.; Jaime-Figueroa, S.; Wang, J.; Hamman, B.D.; Ishchenko, A.; Crews, C.M. Lessons in PROTAC Design from Selective Degradation with a Promiscuous Warhead. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25*, 78–87.e5, doi:10.1016/j.chembiol.2017.09.010.
 139. Burslem, G.M.; Crews, C.M. Small-Molecule Modulation of Protein Homeostasis. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11269–11301, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00077.
 140. Troup, R.I.; Fallan, C.; Baud, M.G.J. Current Strategies for the Design of PROTAC Linkers: A Critical Review. *Explor. Target. Anti-Tumor Ther.* **2020**, *1*, 273–312, doi:10.37349/etat.2020.00018.
 141. Smith, B.E.; Wang, S.L.; Jaime-Figueroa, S.; Harbin, A.; Wang, J.; Hamman, B.D.; Crews, C.M. Differential PROTAC Substrate Specificity Dictated by Orientation of Recruited E3 Ligase. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 131, doi:10.1038/s41467-018-08027-7.
 142. Roy, M.J.; Winkler, S.; Hughes, S.J.; Whitworth, C.; Galant, M.; Farnaby, W.; Rumpel, K.; Ciulli, A. SPR-Measured Dissociation Kinetics of PROTAC Ternary Complexes Influence Target Degradation Rate. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 361–368, doi:10.1021/acscchembio.9b00092.
 143. Zorba, A.; Nguyen, C.; Xu, Y.; Starr, J.; Borzilleri, K.; Smith, J.; Zhu, H.; Farley, K.A.; Ding, W.; Schiemer, J.; et al. Delineating the Role of Cooperativity in the Design of Potent PROTACs for BTK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, E7285–E7292, doi:10.1073/pnas.1803662115.
 144. Cardote, T.A.F.; Gadd, M.S.; Ciulli, A. Crystal Structure of the Cul2-Rbx1-EloBC-VHL Ubiquitin Ligase Complex. *Structure* **2017**, *25*, 901–911.e3, doi:10.1016/j.str.2017.04.009.
 145. Huang, H.; Joazeiro, C.A.P.; Bonfoco, E.; Kamada, S.; Leverson, J.D.; Hunter, T. The Inhibitor of Apoptosis, cIAP2, Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase and Promotes *in Vitro* Monoubiquitination of Caspases 3 and 7*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26661–26664, doi:10.1016/S0021-9258(19)61427-4.
 146. Ichikawa, S.; Flaxman, H.A.; Xu, W.; Vallavoju, N.; Lloyd, H.C.; Wang, B.; Shen, D.; Pratt, M.R.; Woo, C.M. The E3 Ligase Adapter Cereblon Targets the C-Terminal Cyclic Imide Degron. *Nature* **2022**, *610*, 775–782, doi:10.1038/s41586-022-05333-5.
 147. Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J.M.; Lane, W.S.; Kaelin Jr., W.G. HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science* **2001**, *292*, 464–468, doi:10.1126/science.1059817.
 148. Fischer, E.S.; Böhm, K.; Lydeard, J.R.; Yang, H.; Stadler, M.B.; Cavadini, S.; Nagel, J.; Serluca, F.; Acker, V.; Lingaraju, G.M.; et al. Structure of the DDB1–CRBN E3 Ubiquitin Ligase in Complex with Thalidomide. *Nature* **2014**, *512*, 49–53, doi:10.1038/nature13527.
 149. Tanimura, S.; Ohtsuka, S.; Mitsui, K.; Shirouzu, K.; Yoshimura, A.; Ohtsubo, M. MDM2 Interacts with MDMX through Their RING Finger Domains. *FEBS Lett.* **1999**, *447*, 5–9, doi:10.1016/S0014-5793(99)00254-9.
 150. Feltham, R.; Bettjeman, B.; Budhidarmo, R.; Mace, P.D.; Shirley, S.; Condon, S.M.; Chunduru, S.K.; McKinlay, M.A.; Vaux, D.L.; Silke, J.; et al. Smac Mimetics Activate the E3 Ligase Activity of cIAP1 Protein by Promoting RING Domain Dimerization*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 17015–17028, doi:10.1074/jbc.M111.222919.
 151. Rajalingam, K.; Sharma, M.; Paland, N.; Hurwitz, R.; Thieck, O.; Oswald, M.; Machuy, N.; Rudel, T. IAP-IAP Complexes Required for Apoptosis Resistance of C. Trachomatis-Infected Cells. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e114, doi:10.1371/journal.ppat.0020114.
 152. Chen, G.; Huang, H.; Fröhlich, O.; Yang, Y.; Klein, J.D.; Price, S.R.; Sands, J.M. MDM2 E3 Ubiquitin Ligase Mediates UT-A1 Urea Transporter Ubiquitination and Degradation. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2008**, *295*, F1528–F1534, doi:10.1152/ajprenal.90482.2008.
 153. Sawamura, N.; Wakabayashi, S.; Matsumoto, K.; Yamada, H.; Asahi, T. Cereblon Is Recruited to Aggresome and Shows Cytoprotective Effect against Ubiquitin-Proteasome System

- Dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *464*, 1054–1059, doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.068.
154. Higgins, J.J.; Pucilowska, J.; Lombardi, R.Q.; Rooney, J.P. A Mutation in a Novel ATP-Dependent Lon Protease Gene in a Kindred with Mild Mental Retardation. *Neurology* **2004**, *63*, 1927–1931, doi:10.1212/01.WNL.0000146196.01316.A2.
155. Chamberlain, P.P.; Lopez-Girona, A.; Miller, K.; Carmel, G.; Pagarigan, B.; Chie-Leon, B.; Rychak, E.; Corral, L.G.; Ren, Y.J.; Wang, M.; et al. Structure of the Human Cereblon–DDB1–Lenalidomide Complex Reveals Basis for Responsiveness to Thalidomide Analogs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 803–809, doi:10.1038/nsmb.2874.
156. Mori, T.; Ito, T.; Liu, S.; Ando, H.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, Y.; Tokunaga, E.; Shibata, N.; Handa, H.; Hakoshima, T. Structural Basis of Thalidomide Enantiomer Binding to Cereblon. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1294, doi:10.1038/s41598-018-19202-7.
157. Schumacher, H.; Smith, R.L.; Williams, R.T. The Metabolism of Thalidomide: The Spontaneous Hydrolysis of Thalidomide in Solution. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1965**, *25*, 324–337, doi:10.1111/j.1476-5381.1965.tb02053.x.
158. Min, J.; Mayasundari, A.; Keramatnia, F.; Jonchere, B.; Yang, S.W.; Jarusiewicz, J.; Actis, M.; Das, S.; Young, B.; Slavish, J.; et al. Phenyl-Glutarimides: Alternative Cereblon Binders for the Design of PROTACs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 26663–26670, doi:10.1002/anie.202108848.
159. Xie, H.; Li, C.; Tang, H.; Tandon, I.; Liao, J.; Roberts, B.L.; Zhao, Y.; Tang, W. Development of Substituted Phenyl Dihydrouracil as the Novel Achiral Cereblon Ligands for Targeted Protein Degradation. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 2904–2917, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01941.
160. Ichikawa, S.; Payne, N.C.; Xu, W.; Chang, C.-F.; Vallavoju, N.; Frome, S.; Flaxman, H.A.; Mazitschek, R.; Woo, C.M. The Cyclimids: Degron-Inspired Cereblon Binders for Targeted Protein Degradation. *Cell Chem. Biol.* **2024**, *31*, 1162–1175.e10, doi:10.1016/j.chembiol.2024.01.003.
161. Kamura, T.; Sato, S.; Haque, D.; Liu, L.; Kaelin, W.G.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W. The Elongin BC Complex Interacts with the Conserved SOCS-Box Motif Present in Members of the SOCS, Ras, WD-40 Repeat, and Ankyrin Repeat Families. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 3872–3881, doi:10.1101/gad.12.24.3872.
162. Pause, A.; Lee, S.; Worrell, R.A.; Chen, D.Y.T.; Burgess, W.H.; Linehan, W.M.; Klausner, R.D. The von Hippel-Lindau Tumor-Suppressor Gene Product Forms a Stable Complex with Human CUL-2, a Member of the Cdc53 Family of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 2156–2161, doi:10.1073/pnas.94.6.2156.
163. Kamura, T.; Conrad, M.N.; Yan, Q.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W. The Rbx1 Subunit of SCF and VHL E3 Ubiquitin Ligase Activates Rub1 Modification of Cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2928–2933.
164. Ohh, M.; Park, C.W.; Ivan, M.; Hoffman, M.A.; Kim, T.-Y.; Huang, L.E.; Pavletich, N.; Chau, V.; Kaelin, W.G. Ubiquitination of Hypoxia-Inducible Factor Requires Direct Binding to the β -Domain of the von Hippel-Lindau Protein. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 423–427, doi:10.1038/35017054.
165. Stebbins, C.E.; Kaelin, W.G.; Pavletich, N.P. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB Complex: Implications for VHL Tumor Suppressor Function. *Science* **1999**, *284*, 455–461, doi:10.1126/science.284.5413.455.
166. Boh, B.K.; Smith, P.G.; Hagen, T. Neddylation-Induced Conformational Control Regulates Cullin RING Ligase Activity *In Vivo*. *J. Mol. Biol.* **2011**, *409*, 136–145, doi:10.1016/j.jmb.2011.03.023.
167. Faull, S.V.; Lau, A.M.C.; Martens, C.; Ahdash, Z.; Hansen, K.; Yebenes, H.; Schmidt, C.; Beuron, F.; Cronin, N.B.; Morris, E.P.; et al. Structural Basis of Cullin 2 RING E3 Ligase Regulation by the COP9 Signalosome. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3814, doi:10.1038/s41467-019-11772-y.

168. Wang, K.; Diaz, S.; Li, L.; Lohman, J.R.; Liu, X. CAND1 Inhibits Cullin-2-RING Ubiquitin Ligases for Enhanced Substrate Specificity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2024**, *31*, 323–335, doi:10.1038/s41594-023-01167-5.
169. Nguyen, H.C.; Yang, H.; Fribourgh, J.L.; Wolfe, L.S.; Xiong, Y. Insights into Cullin-RING E3 Ubiquitin Ligase Recruitment: Structure of the VHL-EloBC-Cul2 Complex. *Structure* **2015**, *23*, 441–449, doi:10.1016/j.str.2014.12.014.
170. Masson, N.; Willam, C.; Maxwell, P.H.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J. Independent Function of Two Destruction Domains in Hypoxia-inducible Factor- α Chains Activated by Prolyl Hydroxylation. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5197–5206, doi:10.1093/emboj/20.18.5197.
171. Jaakkola, P.; Mole, D.R.; Tian, Y.-M.; Wilson, M.I.; Gielbert, J.; Gaskell, S.J.; Kriegsheim, A. von; Hebestreit, H.F.; Mukherji, M.; Schofield, C.J.; et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* **2001**, *292*, 468–472, doi:10.1126/science.1059796.
172. Min, J.-H.; Yang, H.; Ivan, M.; Gertler, F.; Kaelin, W.G.; Pavletich, N.P. Structure of an HIF-1 α -pVHL Complex: Hydroxyproline Recognition in Signaling. *Science* **2002**, *296*, 1886–1889, doi:10.1126/science.1073440.
173. Yu, F.; White, S.B.; Zhao, Q.; Lee, F.S. HIF-1 α Binding to VHL Is Regulated by Stimulus-Sensitive Proline Hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 9630–9635, doi:10.1073/pnas.181341498.
174. Domene, C.; Jorgensen, C.; Vanommeslaeghe, K.; Schofield, C.J.; MacKerell, A.Jr. Quantifying the Binding Interaction between the Hypoxia-Inducible Transcription Factor and the von Hippel–Lindau Suppressor. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3946–3954, doi:10.1021/acs.jctc.5b00411.
175. Anderson, K.; Nordquist, K.A.; Gao, X.; Hicks, K.C.; Zhai, B.; Gygi, S.P.; Patel, T.B. Regulation of Cellular Levels of Sprouty2 Protein by Prolyl Hydroxylase Domain and von Hippel-Lindau Proteins*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 42027–42036, doi:10.1074/jbc.M111.303222.
176. Kuznetsova, A.V.; Meller, J.; Schnell, P.O.; Nash, J.A.; Ignacak, M.L.; Sanchez, Y.; Conaway, J.W.; Conaway, R.C.; Czyzyk-Krzeska, M.F. Von Hippel–Lindau Protein Binds Hyperphosphorylated Large Subunit of RNA Polymerase II through a Proline Hydroxylation Motif and Targets It for Ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 2706–2711, doi:10.1073/pnas.0436037100.
177. Na, X.; Duan, H.O.; Messing, E.M.; Schoen, S.R.; Ryan, C.K.; di Sant’Agnese, P.A.; Golemis, E.A.; Wu, G. Identification of the RNA Polymerase II Subunit hsRPB7 as a Novel Target of the von Hippel–Lindau Protein. *EMBO J.* **2003**, *22*, 4249–4259, doi:10.1093/emboj/cdg410.
178. Okuda, H.; Hirai, S.; Takaki, Y.; Kamada, M.; Baba, M.; Sakai, N.; Kishida, T.; Kaneko, S.; Yao, M.; Ohno, S.; et al. Direct Interaction of the β -Domain of VHL Tumor Suppressor Protein with the Regulatory Domain of Atypical PKC Isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 491–497, doi:10.1006/bbrc.1999.1347.
179. Zhou, L.; Yang, H. The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Promotes c-Cbl-Independent Poly-Ubiquitylation and Degradation of the Activated EGFR. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e23936, doi:10.1371/journal.pone.0023936.
180. Heir, P.; Sufan, R.I.; Greer, S.N.; Poon, B.P.; Lee, J.E.; Ohh, M. DCNL1 Functions as a Substrate Sensor and Activator of Cullin 2-RING Ligase. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 1621–1631, doi:10.1128/MCB.01342-12.
181. Van Molle, I.; Thomann, A.; Buckley, D.L.; So, E.C.; Lang, S.; Crews, C.M.; Ciulli, A. Dissecting Fragment-Based Lead Discovery at the von Hippel-Lindau Protein:Hypoxia Inducible Factor 1 α Protein-Protein Interface. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1300–1312, doi:10.1016/j.chembiol.2012.08.015.

182. Diehl, C.J.; Ciulli, A. Discovery of Small Molecule Ligands for the von Hippel-Lindau (VHL) E3 Ligase and Their Use as Inhibitors and PROTAC Degraders. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 8216–8257, doi:10.1039/D2CS00387B.
183. Roy, R.D.; Rosenmund, C.; Stefan, M.I. Cooperative Binding Mitigates the High-Dose Hook Effect. *BMC Syst. Biol.* **2017**, *11*, 74, doi:10.1186/s12918-017-0447-8.
184. Pettersson, M.; Crews, C.M. PROTeolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) — Past, Present and Future. *Drug Discov. Today Technol.* **2019**, *31*, 15–27, doi:10.1016/j.ddtec.2019.01.002.
185. Schwalm, M.P.; Krämer, A.; Dölle, A.; Weckesser, J.; Yu, X.; Jin, J.; Saxena, K.; Knapp, S. Tracking the PROTAC Degradation Pathway in Living Cells Highlights the Importance of Ternary Complex Measurement for PROTAC Optimization. *Cell Chem. Biol.* **2023**, *30*, 753–765.e8, doi:10.1016/j.chembiol.2023.06.002.
186. Lin, W.; Chen, T. General Stepwise Approach to Optimize a TR-FRET Assay for Characterizing the BRD/PROTAC/CRBN Ternary Complex. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4*, 941–952, doi:10.1021/acspsci.1c00032.
187. Bead Selection and Bead Interference | Revvity Available online: <https://www.revvity.com/ask/bead-selection-and-bead-interference> (accessed on 19 November 2025).
188. Yasgar, A.; Jadhav, A.; Simeonov, A.; Coussens, N.P. AlphaScreen-Based Assays: Ultra-High-Throughput Screening for Small-Molecule Inhibitors of Challenging Enzymes and Protein-Protein Interactions. In *High Throughput Screening: Methods and Protocols*; Janzen, W.P., Ed.; Springer: New York, NY, 2016; pp. 77–98 ISBN 978-1-4939-3673-1.
189. Jarusiewicz, J.A.; Yoshimura, S.; Mayasundari, A.; Actis, M.; Aggarwal, A.; McGowan, K.; Yang, L.; Li, Y.; Fu, X.; Mishra, V.; et al. Phenyl Dihydrouracil: An Alternative Cereblon Binder for PROTAC Design. *ACS Med. Chem. Lett.* **2023**, *14*, 141–145, doi:10.1021/acsmchemlett.2c00436.
190. Hickey, C.M.; Digianantonio, K.M.; Zimmermann, K.; Harbin, A.; Quinn, C.; Patel, A.; Gareiss, P.; Chapman, A.; Tiberi, B.; Dobrodziej, J.; et al. Co-Opting the E3 Ligase KLHDC2 for Targeted Protein Degradation by Small Molecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2024**, *31*, 311–322, doi:10.1038/s41594-023-01146-w.
191. Wells, J.A.; McClendon, C.L. Reaching for High-Hanging Fruit in Drug Discovery at Protein–Protein Interfaces. *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009, doi:10.1038/nature06526.
192. Kim, J.; Kim, H.; Park, S.B. Privileged Structures: Efficient Chemical “Navigators” toward Unexplored Biologically Relevant Chemical Spaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14629–14638, doi:10.1021/ja508343a.
193. Gao, H.; Sun, X.; Rao, Y. PROTAC Technology: Opportunities and Challenges. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 237–240, doi:10.1021/acsmchemlett.9b00597.
194. Wang, W.; Zhou, Q.; Jiang, T.; Li, S.; Ye, J.; Zheng, J.; Wang, X.; Liu, Y.; Deng, M.; Ke, D.; et al. A Novel Small-Molecule PROTAC Selectively Promotes Tau Clearance to Improve Cognitive Functions in Alzheimer-like Models. *Theranostics* **2021**, *11*, 5279–5295, doi:10.7150/thno.55680.
195. Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. Degradation of Huntingtin Mediated by a Hybrid Molecule Composed of IAP Antagonist Linked to Phenylidiazanyl Benzothiazole Derivative. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 707–710, doi:10.1016/j.bmcl.2018.01.012.
196. Smith, M.C.; Gestwicki, J.E. Features of Protein–Protein Interactions That Translate into Potent Inhibitors: Topology, Surface Area and Affinity. *Expert Rev. Mol. Med.* **2012**, *14*, e16, doi:10.1017/erm.2012.10.
197. Hines, J.; Gough, J.D.; Corson, T.W.; Crews, C.M. Posttranslational Protein Knockdown Coupled to Receptor Tyrosine Kinase Activation with phosphoPROTACs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 8942–8947, doi:10.1073/pnas.1217206110.

198. Li, S.; Wang, X.; Huang, J.; Cao, X.; Liu, Y.; Bai, S.; Zeng, T.; Chen, Q.; Li, C.; Lu, C.; et al. Decoy-PROTAC for Specific Degradation of “Undruggable” STAT3 Transcription Factor. *Cell Death Dis.* **2025**, *16*, 197, doi:10.1038/s41419-025-07535-x.
199. Hsu, J.H.-R.; Rasmusson, T.; Robinson, J.; Pachl, F.; Read, J.; Kawatkar, S.; O’ Donovan, D.H.; Bagal, S.; Code, E.; Rawlins, P.; et al. EED-Targeted PROTACs Degrade EED, EZH2, and SUZ12 in the PRC2 Complex. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 41-46.e17, doi:10.1016/j.chembiol.2019.11.004.
200. Liu, Z.; Hu, X.; Wang, Q.; Wu, X.; Zhang, Q.; Wei, W.; Su, X.; He, H.; Zhou, S.; Hu, R.; et al. Design and Synthesis of EZH2-Based PROTACs to Degrade the PRC2 Complex for Targeting the Noncatalytic Activity of EZH2. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2829–2848, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c02234.
201. Wu, P.; Nielsen, T.E.; Clausen, M.H. FDA-Approved Small-Molecule Kinase Inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422–439, doi:10.1016/j.tips.2015.04.005.
202. Sun, Y.; Ding, N.; Song, Y.; Yang, Z.; Liu, W.; Zhu, J.; Rao, Y. Degradation of Bruton’s Tyrosine Kinase Mutants by PROTACs for Potential Treatment of Ibrutinib-Resistant Non-Hodgkin Lymphomas. *Leukemia* **2019**, *33*, 2105–2110, doi:10.1038/s41375-019-0440-x.
203. Molina, D.M.; Nordlund, P. The Cellular Thermal Shift Assay: A Novel Biophysical Assay for In Situ Drug Target Engagement and Mechanistic Biomarker Studies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2016**, *56*, 141–161, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103715.
204. Scaltriti, M.; Verma, C.; Guzman, M.; Jimenez, J.; Parra, J.L.; Pedersen, K.; Smith, D.J.; Landolfi, S.; Ramon y Cajal, S.; Arribas, J.; et al. Lapatinib, a HER2 Tyrosine Kinase Inhibitor, Induces Stabilization and Accumulation of HER2 and Potentiates Trastuzumab-Dependent Cell Cytotoxicity. *Oncogene* **2009**, *28*, 803–814, doi:10.1038/onc.2008.432.
205. Levenson, J.D.; Zhang, H.; Chen, J.; Tahir, S.K.; Phillips, D.C.; Xue, J.; Nimmer, P.; Jin, S.; Smith, M.; Xiao, Y.; et al. Potent and Selective Small-Molecule MCL-1 Inhibitors Demonstrate on-Target Cancer Cell Killing Activity as Single Agents and in Combination with ABT-263 (Navitoclax). *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1590–e1590, doi:10.1038/cddis.2014.561.
206. Cai, C.; He, H.H.; Chen, S.; Coleman, I.; Wang, H.; Fang, Z.; Chen, S.; Nelson, P.S.; Liu, X.S.; Brown, M.; et al. Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 457–471, doi:10.1016/j.ccr.2011.09.001.
207. Ramon, E.; Belanche-Muñoz, L.; Pérez-Enciso, M. HIV Drug Resistance Prediction with Weighted Categorical Kernel Functions. *BMC Bioinformatics* **2019**, *20*, 410, doi:10.1186/s12859-019-2991-2.
208. Lovly, C.M.; Shaw, A.T. Molecular Pathways: Resistance to Kinase Inhibitors and Implications for Therapeutic Strategies. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2249–2256, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1610.
209. Koppikar, P.; Bhagwat, N.; Kilpivaara, O.; Manshouri, T.; Adli, M.; Hricik, T.; Liu, F.; Saunders, L.M.; Mullally, A.; Abdel-Wahab, O.; et al. Heterodimeric JAK–STAT Activation as a Mechanism of Persistence to JAK2 Inhibitor Therapy. *Nature* **2012**, *489*, 155–159, doi:10.1038/nature11303.
210. M. Riching, K.; A. Caine, E.; Urh, M.; L. Daniels, D. The Importance of Cellular Degradation Kinetics for Understanding Mechanisms in Targeted Protein Degradation. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 6210–6221, doi:10.1039/D2CS00339B.
211. King, A.J.; Arnone, M.R.; Bleam, M.R.; Moss, K.G.; Yang, J.; Fedorowicz, K.E.; Smitheman, K.N.; Erhardt, J.A.; Hughes-Earle, A.; Kane-Carson, L.S.; et al. Dabrafenib; Preclinical Characterization, Increased Efficacy When Combined with Trametinib, While BRAF/MEK Tool Combination Reduced Skin Lesions. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e67583, doi:10.1371/journal.pone.0067583.
212. Nabet, B.; Roberts, J.M.; Buckley, D.L.; Paulk, J.; Dastjerdi, S.; Yang, A.; Leggett, A.L.; Erb, M.A.; Lawlor, M.A.; Souza, A.; et al. The dTAG System for Immediate and Target-

- Specific Protein Degradation. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 431–441, doi:10.1038/s41589-018-0021-8.
213. Khan, S.; Zhang, X.; Lv, D.; Zhang, Q.; He, Y.; Zhang, P.; Liu, X.; Thummuri, D.; Yuan, Y.; Wiegand, J.S.; et al. A Selective BCL-XL PROTAC Degradator Achieves Safe and Potent Antitumor Activity. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1938–1947, doi:10.1038/s41591-019-0668-z.
214. Shemorry, A.; Hwang, C.-S.; Varshavsky, A. Control of Protein Quality and Stoichiometries by N-Terminal Acetylation and the N-End Rule Pathway. *Mol. Cell* **2013**, *50*, 540–551, doi:10.1016/j.molcel.2013.03.018.
215. Bondeson, D.P.; Mares, A.; Smith, I.E.D.; Ko, E.; Campos, S.; Miah, A.H.; Mulholland, K.E.; Routly, N.; Buckley, D.L.; Gustafson, J.L.; et al. Catalytic in Vivo Protein Knockdown by Small-Molecule PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 611–617, doi:10.1038/nchembio.1858.
216. Strelow, J.M. A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 3–20, doi:10.1177/1087057116671509.
217. Advani, R.H.; Buggy, J.J.; Sharman, J.P.; Smith, S.M.; Boyd, T.E.; Grant, B.; Kolibaba, K.S.; Furman, R.R.; Rodriguez, S.; Chang, B.Y.; et al. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 88–94, doi:10.1200/JCO.2012.42.7906.
218. Mares, A.; Miah, A.H.; Smith, I.E.D.; Rackham, M.; Thawani, A.R.; Cryan, J.; Haile, P.A.; Votta, B.J.; Beal, A.M.; Capriotti, C.; et al. Extended Pharmacodynamic Responses Observed upon PROTAC-Mediated Degradation of RIPK2. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 140, doi:10.1038/s42003-020-0868-6.
219. Rognan, D. Rational Design of Protein–Protein Interaction Inhibitors. *MedChemComm* **2015**, *6*, 51–60, doi:10.1039/C4MD00328D.
220. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings1. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26, doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0.
221. Lipinski, C.A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341, doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
222. Maple, H.J.; Clayden, N.; Baron, A.; Stacey, C.; Felix, R. Developing Degradators: Principles and Perspectives on Design and Chemical Space. *MedChemComm* **2019**, *10*, 1755–1764, doi:10.1039/C9MD00272C.
223. Neklesa, T.; Snyder, L.B.; Willard, R.R.; Vitale, N.; Pizzano, J.; Gordon, D.A.; Bookbinder, M.; Macaluso, J.; Dong, H.; Ferraro, C.; et al. ARV-110: An Oral Androgen Receptor PROTAC Degradator for Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 259–259, doi:10.1200/JCO.2019.37.7_suppl.259.
224. Arvinas to Present Preclinical Tau-Directed PROTAC® Protein Degradator Data at Alzheimer’s Association International Conference | Arvinas Available online: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-present-preclinical-tau-directed-protacr-protein/> (accessed on 30 July 2025).
225. Cecchini, C.; Pannilunghi, S.; Tardy, S.; Scapozza, L. From Conception to Development: Investigating PROTACs Features for Improved Cell Permeability and Successful Protein Degradation. *Front. Chem.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fchem.2021.672267.
226. Ermondi, G.; Garcia-Jimenez, D.; Caron, G. PROTACs and Building Blocks: The 2D Chemical Space in Very Early Drug Discovery. *Molecules* **2021**, *26*, 672, doi:10.3390/molecules26030672.
227. Kaur, T.; Menon, A.; Garner, A.L. Synthesis of 7-Benzylguanosine Cap-Analogue Conjugates for eIF4E Targeted Degradation. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 339–350, doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.080.
228. Atilaw, Y.; Poongavanam, V.; Svensson Nilsson, C.; Nguyen, D.; Giese, A.; Meibom, D.; Erdelyi, M.; Kihlberg, J. Solution Conformations Shed Light on PROTAC Cell Permeability. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 107–114, doi:10.1021/acsmchemlett.0c00556.

229. Kim, K.; Lee, D.H.; Park, S.; Jo, S.-H.; Ku, B.; Park, S.G.; Park, B.C.; Jeon, Y.U.; Ahn, S.; Kang, C.H.; et al. Disordered Region of Cereblon Is Required for Efficient Degradation by Proteolysis-Targeting Chimera. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19654, doi:10.1038/s41598-019-56177-5.
230. Cyrus, K.; Wehenkel, M.; Choi, E.-Y.; Lee, H.; Swanson, H.; Kim, K.-B. Jostling for Position: Optimizing Linker Location in the Design of Estrogen Receptor-Targeting PROTACs. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 979–985, doi:10.1002/cmdc.201000146.
231. Goracci, L.; Desantis, J.; Valeri, A.; Castellani, B.; Eleuteri, M.; Cruciani, G. Understanding the Metabolism of Proteolysis Targeting Chimeras (PROTACs): The Next Step toward Pharmaceutical Applications. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11615–11638, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00793.
232. Hayhow, T.G.; Williamson, B.; Lawson, M.; Cureton, N.; Braybrooke, E.L.; Campbell, A.; Carbajo, R.J.; Cheraghchi-Bashi, A.; Chiarparin, E.; Diène, C.R.; et al. Metabolism-Driven in Vitro/in Vivo Disconnect of an Oral ERα VHL-PROTAC. *Commun. Biol.* **2024**, *7*, 563, doi:10.1038/s42003-024-06238-x.
233. Wei, M.; Zhao, R.; Cao, Y.; Wei, Y.; Li, M.; Dong, Z.; Liu, Y.; Ruan, H.; Li, Y.; Cao, S.; et al. First Orally Bioavailable Prodrug of Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degrades Cyclin-Dependent Kinases 2/4/6 *in Vivo*. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112903, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112903.
234. Klein, V.G.; Townsend, C.E.; Testa, A.; Zengerle, M.; Maniaci, C.; Hughes, S.J.; Chan, K.-H.; Ciulli, A.; Lokey, R.S. Understanding and Improving the Membrane Permeability of VH032-Based PROTACs. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1732–1738, doi:10.1021/acsmedchemlett.0c00265.
235. Churcher, I. Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 444–452, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01272.
236. Zattoni, J.; Vottero, P.; Carena, G.; Uliveto, C.; Pozzati, G.; Morabito, B.; Gitari, E.; Tuszyński, J.; Aminpour, M. A Comprehensive Primer and Review of PROTACs and Their *In Silico* Design. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2025**, *264*, 108687, doi:10.1016/j.cmpb.2025.108687.
237. Screen, M.A.; McCabe, J.F.; Askin, S.; Guest, J.L.; Hodgkinson, P.; Cruz-Cabeza, A.J.; Blundell, T.J.; Rainer, D.N.; Coles, S.J.; Longcake, A.; et al. Crystallizing the Uncrystallizable: Insights from Extensive Screening of PROTACs. *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, doi:10.1021/jacs.5c07977.
238. PROTAC Shrinks Mutated Prostate Tumors. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, OF2, doi:10.1158/2159-8290.CD-NB2022-0020.
239. Petrylak, D.P.; Stewart, T.F.; Gao, X.; Berghorn, E.; Lu, H.; Chan, E.; Gedrich, R.; Lang, J.M.; McKean, M. A Phase 2 Expansion Study of ARV-766, a PROTAC Androgen Receptor (AR) Degradar, in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **2023**, *41*, TPS290–TPS290, doi:10.1200/JCO.2023.41.6_suppl.TPS290.
240. Bristol Myers Squibb - Bristol Myers Squibb Investor Series - Early Pipeline and Immunology Available online: <https://investors.bms.com/iframes/events-and-presentations/event-details/2020/Early-Pipeline-and-Immuno-Oncology/default.aspx> (accessed on 8 July 2025).
241. Tam, C.S.; Frustaci, A.M.; Bijou, F.; Zinzani, P.L.; Seymour, J.F.; Lasica, M.; Eradat, H.A.; Lin, V.T.G.; Alwan, M.; Mocanu, I.; et al. Preliminary Efficacy and Safety of the Bruton Tyrosine Kinase Degradar BGB-16673 in Patients with Relapsed or Refractory (R/R) Indolent NHL: Results from the Phase 1 CaDAnCe-101 Study. *Blood* **2024**, *144*, 1649, doi:10.1182/blood-2024-199154.
242. Mihalic, J.T.; Brathaban, N.; Bravo, B.; Ingallinera, T.; Kato, D.; Lu, H.; Ma, J.; McIntosh, J.; Tenn-McClellan, A.; Mukerji, R.; et al. Abstract 3423: NX-2127: A First-in-Class Clinical Stage Degradar of BTK and IKZF1/3 for the Treatment of Patients with B Cell Malignancies. *Cancer Res.* **2023**, *83*, 3423, doi:10.1158/1538-7445.AM2023-3423.

243. Ackerman, L.; Acloque, G.; Bacchelli, S.; Schwartz, H.; Feinstein, B.J.; La Stella, P.; Alavi, A.; Gollerkeri, A.; Davis, J.; Campbell, V.; et al. IRAK4 Degradation in Hidradenitis Suppurativa and Atopic Dermatitis: A Phase 1 Trial. *Nat. Med.* **2023**, *29*, 3127–3136, doi:10.1038/s41591-023-02635-7.
244. Sharma, K.; Fei, X.; Shi, Y.; Browne, C.; Walther, D.; Daigle, C.; Ramanathan, A.; Miller, R.; Yuan, K.; Mahasenan, K.; et al. Abstract LB037: E3 Pairing and Structural Mechanisms Underlying Anti-Tumor Activity of Clinical STAT3 Degradation Agent KT-333. *Cancer Res.* **2024**, *84*, LB037, doi:10.1158/1538-7445.AM2024-LB037.
245. Arvinas Announces FDA Approval of VEPPANU (Vepdegestrant) for the Treatment of ESR1m, ER+/HER2- Advanced Breast Cancer | Arvinas Available online: <https://ir.arvinas.com/news-releases/news-release-details/arvinas-announces-fda-approval-veppanu-vepdegestrant-treatment/> (accessed on 6 May 2026).
246. Sasso, J.M.; Tenchov, R.; Wang, D.; Johnson, L.S.; Wang, X.; Zhou, Q.A. Molecular Glues: The Adhesive Connecting Targeted Protein Degradation to the Clinic. *Biochemistry* **2023**, *62*, 601–623, doi:10.1021/acs.biochem.2c00245.
247. Liu, J.; Farmer, J.D.; Lane, W.S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S.L. Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* **1991**, *66*, 807–815, doi:10.1016/0092-8674(91)90124-H.
248. Casement, R.; Bond, A.; Craigon, C.; Ciulli, A. Mechanistic and Structural Features of PROTAC Ternary Complexes. In *Targeted Protein Degradation: Methods and Protocols*; Cacace, A.M., Hickey, C.M., Békés, M., Eds.; Springer US: New York, NY, 2021; pp. 79–113 ISBN 978-1-0716-1665-9.
249. Lu, G.; Middleton, R.E.; Sun, H.; Naniong, M.; Ott, C.J.; Mitsiades, C.S.; Wong, K.-K.; Bradner, J.E.; Kaelin, W.G. The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science* **2014**, *343*, 305–309, doi:10.1126/science.1244917.
250. Lenalidomide Triggers Ikaros Protein Degradation. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, OF13, doi:10.1158/2159-8290.CD-RW2013-268.
251. Matyskiela, M.E.; Lu, G.; Ito, T.; Pagarigan, B.; Lu, C.-C.; Miller, K.; Fang, W.; Wang, N.-Y.; Nguyen, D.; Houston, J.; et al. A Novel Cereblon Modulator Recruits GSPT1 to the CRL4CRBN Ubiquitin Ligase. *Nature* **2016**, *535*, 252–257, doi:10.1038/nature18611.
252. Sievers, Q.L.; Petzold, G.; Bunker, R.D.; Renneville, A.; Słabicki, M.; Liddicoat, B.J.; Abdulrahman, W.; Mikkelsen, T.; Ebert, B.L.; Thomä, N.H. Defining the Human C2H2 Zinc Finger Degrome Targeted by Thalidomide Analogs through CRBN. *Science* **2018**, *362*, eaat0572, doi:10.1126/science.aat0572.
253. Petzold, G.; Gainza, P.; Annunziato, S.; Lamberto, I.; Trenh, P.; McAllister, L.A.; DeMarco, B.; Schwander, L.; Bunker, R.D.; Zlotosch, M.; et al. Mining the CRBN Target Space Redefines Rules for Molecular Glue-Induced Neosubstrate Recognition. *Science* **2025**, *389*, eadt6736, doi:10.1126/science.adt6736.
254. Han, T.; Goralski, M.; Gaskill, N.; Capota, E.; Kim, J.; Ting, T.C.; Xie, Y.; Williams, N.S.; Nijhawan, D. Anticancer Sulfonamides Target Splicing by Inducing RBM39 Degradation via Recruitment to DCAF15. *Science* **2017**, *356*, eaal3755, doi:10.1126/science.aal3755.
255. Du, X.; Volkov, O.A.; Czerwinski, R.M.; Tan, H.; Huerta, C.; Morton, E.R.; Rizzi, J.P.; Wehn, P.M.; Xu, R.; Nijhawan, D.; et al. Structural Basis and Kinetic Pathway of RBM39 Recruitment to DCAF15 by a Sulfonamide Molecular Glue E7820. *Structure* **2019**, *27*, 1625–1633.e3, doi:10.1016/j.str.2019.10.005.
256. Faust, T.B.; Yoon, H.; Nowak, R.P.; Donovan, K.A.; Li, Z.; Cai, Q.; Eleuteri, N.A.; Zhang, T.; Gray, N.S.; Fischer, E.S. Structural Complementarity Facilitates E7820-Mediated Degradation of RBM39 by DCAF15. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 7–14, doi:10.1038/s41589-019-0378-3.

257. Ting, T.C.; Goralski, M.; Klein, K.; Wang, B.; Kim, J.; Xie, Y.; Nijhawan, D. Aryl Sulfonamides Degrade RBM39 and RBM23 by Recruitment to CRL4-DCAF15. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 1499–1510.e6, doi:10.1016/j.celrep.2019.09.079.
258. Owa, T.; Yoshino, H.; Okauchi, T.; Yoshimatsu, K.; Ozawa, Y.; Sugi, N.H.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Discovery of Novel Antitumor Sulfonamides Targeting G1 Phase of the Cell Cycle. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3789–3799, doi:10.1021/jm9902638.
259. Petzold, G.; Fischer, E.S.; Thomä, N.H. Structural Basis of Lenalidomide-Induced CK1 α Degradation by the CRL4CRBN Ubiquitin Ligase. *Nature* **2016**, *532*, 127–130, doi:10.1038/nature16979.
260. Wang, H.; Wang, H.; Wang, R.; Li, Y.; Wang, Z.; Zhou, W.; Deng, L.; Li, X.; Zou, L.; Yang, Q.; et al. Discovery of a Molecular Glue for EGFR Degradation. *Oncogene* **2025**, *44*, 545–556, doi:10.1038/s41388-024-03241-8.
261. Simonetta, K.R.; Taygerly, J.; Boyle, K.; Basham, S.E.; Padovani, C.; Lou, Y.; Cummins, T.J.; Yung, S.L.; von Soly, S.K.; Kayser, F.; et al. Prospective Discovery of Small Molecule Enhancers of an E3 Ligase-Substrate Interaction. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1402, doi:10.1038/s41467-019-09358-9.
262. Neklesa, T.K.; Tae, H.S.; Schneekloth, A.R.; Stulberg, M.J.; Corson, T.W.; Sundberg, T.B.; Raina, K.; Holley, S.A.; Crews, C.M. Small-Molecule Hydrophobic Tagging-Induced Degradation of HaloTag Fusion Proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543, doi:10.1038/nchembio.597.
263. Rambacher, K.M.; Calabrese, M.F.; Yamaguchi, M. Perspectives on the Development of First-in-Class Protein Degraders. *Future Med. Chem.* **2021**, *13*, 1203–1226, doi:10.4155/fmc-2021-0033.
264. Wang, Y.; Jiang, X.; Feng, F.; Liu, W.; Sun, H. Degradation of Proteins by PROTACs and Other Strategies. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 207–238, doi:10.1016/j.apsb.2019.08.001.
265. Li, H.; Dong, J.; Cai, M.; Xu, Z.; Cheng, X.-D.; Qin, J.-J. Protein Degradation Technology: A Strategic Paradigm Shift in Drug Discovery. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2021**, *14*, 138, doi:10.1186/s13045-021-01146-7.
266. Gao, N.; Chu, T.-T.; Li, Q.-Q.; Lim, Y.-J.; Qiu, T.; Ma, M.-R.; Hu, Z.-W.; Yang, X.-F.; Chen, Y.-X.; Zhao, Y.-F.; et al. Hydrophobic Tagging-Mediated Degradation of Alzheimer's Disease Related Tau. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 40362–40366, doi:10.1039/C7RA05347A.
267. Hirai, K.; Yamashita, H.; Tomoshige, S.; Mishima, Y.; Niwa, T.; Ohgane, K.; Ishii, M.; Kanamitsu, K.; Ikemi, Y.; Nakagawa, S.; et al. Conversion of a PROTAC Mutant Huntingtin Degradation into Small-Molecule Hydrophobic Tags Focusing on Drug-like Properties. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 396–402, doi:10.1021/acsmchemlett.1c00500.
268. He, Q.; Zhao, X.; Wu, D.; Jia, S.; Liu, C.; Cheng, Z.; Huang, F.; Chen, Y.; Lu, T.; Lu, S. Hydrophobic Tag-Based Protein Degradation: Development, Opportunity and Challenge. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *260*, 115741, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115741.
269. Wiech, H.; Buchner, J.; Zimmermann, R.; Jakob, U. Hsp90 Chaperones Protein Folding in Vitro. *Nature* **1992**, *358*, 169–170, doi:10.1038/358169a0.
270. Garg, G.; Khandelwal, A.; Blagg, B.S.J. Chapter Three - Anticancer Inhibitors of Hsp90 Function: Beyond the Usual Suspects. In *Advances in Cancer Research*; Isaacs, J., Whitesell, L., Eds.; Hsp90 in Cancer: Beyond the Usual Suspects; Academic Press, 2016; Vol. 129, pp. 51–88.
271. Walter, S.; Buchner, J. Molecular Chaperones—Cellular Machines for Protein Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1098–1113, doi:10.1002/1521-3773(20020402)41:7<1098::AID-ANIE1098>3.0.CO;2-9.
272. Chaudhury, S.; Welch, T.R.; Blagg, B.S.J. Hsp90 as a Target for Drug Development. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1331–1340, doi:10.1002/cmdc.200600112.
273. Murphy, P.J.M.; Kanelakis, K.C.; Galigniana, M.D.; Morishima, Y.; Pratt, W.B. Stoichiometry, Abundance, and Functional Significance of the Hsp90/Hsp70-Based

- Multiprotein Chaperone Machinery in Reticulocyte Lysate*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30092–30098, doi:10.1074/jbc.M103773200.
274. Caplan, A.J.; Mandal, A.K.; Theodoraki, M.A. Molecular Chaperones and Protein Kinase Quality Control. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 87–92, doi:10.1016/j.tcb.2006.12.002.
275. Lopez, A.; Dahiya, V.; Delhommel, F.; Freiburger, L.; Stehle, R.; Asami, S.; Rutz, D.; Blair, L.; Buchner, J.; Sattler, M. Client Binding Shifts the Populations of Dynamic Hsp90 Conformations through an Allosteric Network. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabl7295, doi:10.1126/sciadv.abl7295.
276. Vaughan, C.K.; Gohlke, U.; Sobott, F.; Good, V.M.; Ali, M.M.U.; Prodromou, C.; Robinson, C.V.; Saibil, H.R.; Pearl, L.H. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 Complex. *Mol. Cell* **2006**, *23*, 697–707, doi:10.1016/j.molcel.2006.07.016.
277. Ali, M.M.U.; Roe, S.M.; Vaughan, C.K.; Meyer, P.; Panaretou, B.; Piper, P.W.; Prodromou, C.; Pearl, L.H. Crystal Structure of an Hsp90–Nucleotide–P23/Sba1 Closed Chaperone Complex. *Nature* **2006**, *440*, 1013–1017, doi:10.1038/nature04716.
278. Panaretou, B.; Siligardi, G.; Meyer, P.; Maloney, A.; Sullivan, J.K.; Singh, S.; Millson, S.H.; Clarke, P.A.; Naaby-Hansen, S.; Stein, R.; et al. Activation of the ATPase Activity of Hsp90 by the Stress-Regulated Cochaperone Aha1. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1307–1318, doi:10.1016/S1097-2765(02)00785-2.
279. Gvozdenov, Z.; Bendix, L.D.; Kolhe, J.; Freeman, B.C. The Hsp90 Molecular Chaperone Regulates the Transcription Factor Network Controlling Chromatin Accessibility. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 4993–5003, doi:10.1016/j.jmb.2019.09.007.
280. Echtenkamp, F.J.; Gvozdenov, Z.; Adkins, N.L.; Zhang, Y.; Lynch-Day, M.; Watanabe, S.; Peterson, C.L.; Freeman, B.C. Hsp90 and P23 Molecular Chaperones Control Chromatin Architecture by Maintaining the Functional Pool of the RSC Chromatin Remodeler. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 888–899, doi:10.1016/j.molcel.2016.09.040.
281. Basso, A.D.; Solit, D.B.; Chiosis, G.; Giri, B.; Tschlis, P.; Rosen, N. Akt Forms an Intracellular Complex with Heat Shock Protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and Is Destabilized by Inhibitors of Hsp90 Function*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39858–39866, doi:10.1074/jbc.M206322200.
282. Kosano, H.; Stensgard, B.; Charlesworth, M.C.; McMahon, N.; Toft, D. The Assembly of Progesterone Receptor-Hsp90 Complexes Using Purified Proteins*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32973–32979, doi:10.1074/jbc.273.49.32973.
283. Prodromou, C.; Panaretou, B.; Chohan, S.; Siligardi, G.; O’Brien, R.; Ladbury, J.E.; Roe, S.M.; Piper, P.W.; Pearl, L.H. The ATPase Cycle of Hsp90 Drives a Molecular ‘Clamp’ via Transient Dimerization of the N-terminal Domains. *EMBO J.* **2000**, *19*, 4383–4392, doi:10.1093/emboj/19.16.4383.
284. Donnelly, A.; Blagg, B.S.J. Novobiocin and Additional Inhibitors of the Hsp90 C-Terminal Nucleotide- Binding Pocket. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2702–2717, doi:10.2174/092986708786242895.
285. Hoter, A.; El-Sabban, M.E.; Naim, H.Y. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2560, doi:10.3390/ijms19092560.
286. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
287. Isaacs, J.S.; Xu, W.; Neckers, L. Heat Shock Protein 90 as a Molecular Target for Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 213–217, doi:10.1016/S1535-6108(03)00029-1.
288. Younes, A.; Georgakis, G.V. Heat-Shock Protein 90 Inhibitors in Cancer Therapy: 17AAG and Beyond. *Future Oncol.* **2005**, *1*, 273–281, doi:10.1517/14796694.1.2.273.
289. Workman, P. Combinatorial Attack on Multistep Oncogenesis by Inhibiting the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cancer Lett.* **2004**, *206*, 149–157, doi:10.1016/j.canlet.2003.08.032.
290. Whitesell, L.; Lindquist, S.L. HSP90 and the Chaperoning of Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 761–772, doi:10.1038/nrc1716.

291. Neckers, L. Chaperoning Oncogenes: Hsp90 as a Target of Geldanamycin. In *Molecular Chaperones in Health and Disease*; Starke, K., Gaestel, M., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2006; pp. 259–277 ISBN 978-3-540-29717-8.
292. Calderwood, S.K.; Khaleque, M.A.; Sawyer, D.B.; Ciocca, D.R. Heat Shock Proteins in Cancer: Chaperones of Tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 164–172, doi:10.1016/j.tibs.2006.01.006.
293. Bansal, H.; Kornblau, S.; Yihua, Q.; Coombes, K.R.; Panneerdoss, S.; Karnad, A.; Weitman, S.; Tomlinson, G.; Bansal, S.; Iyer, S.P. Overexpression of BRD4 Is an Adverse Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2017**, *130*, 3794, doi:10.1182/blood.V130.Suppl_1.3794.3794.
294. Wang, L.; Xie, C.; Greggio, E.; Parisiadou, L.; Shim, H.; Sun, L.; Chandran, J.; Lin, X.; Lai, C.; Yang, W.-J.; et al. The Chaperone Activity of Heat Shock Protein 90 Is Critical for Maintaining the Stability of Leucine-Rich Repeat Kinase 2. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 3384–3391, doi:10.1523/JNEUROSCI.0185-08.2008.
295. Zhou, X.; Fan, L.X.; Peters, D.J.M.; Trudel, M.; Bradner, J.E.; Li, X. Therapeutic Targeting of BET Bromodomain Protein, Brd4, Delays Cyst Growth in ADPKD. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 3982–3993, doi:10.1093/hmg/ddv136.
296. Xu, W.; Mimnaugh, E.; Rosser, M.F.N.; Nicchitta, C.; Marcu, M.; Yarden, Y.; Neckers, L. Sensitivity of Mature ErbB2 to Geldanamycin Is Conferred by Its Kinase Domain and Is Mediated by the Chaperone Protein Hsp90*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3702–3708, doi:10.1074/jbc.M006864200.
297. Ahsan, A.; Ramanand, S.G.; Whitehead, C.; Hiniker, S.M.; Rehemtulla, A.; Pratt, W.B.; Jolly, S.; Gouveia, C.; Truong, K.; Waes, C.V.; et al. Wild-Type EGFR Is Stabilized by Direct Interaction with HSP90 in Cancer Cells and Tumors. *Neoplasia* **2012**, *14*, 670-IN1, doi:10.1593/neo.12986.
298. Poole, C.J.; Zheng, W.; Lee, H.; Young, D.; Lodh, A.; Chadli, A.; Van Riggelen, J. Targeting the MYC Oncogene in Burkitt Lymphoma through HSP90 Inhibition. *Cancers* **2018**, *10*, 448, doi:10.3390/cancers10110448.
299. Kamal, A.; Boehm, M.F.; Burrows, F.J. Therapeutic and Diagnostic Implications of Hsp90 Activation. *Trends Mol. Med.* **2004**, *10*, 283–290, doi:10.1016/j.molmed.2004.04.006.
300. Liu, M.; Jin, J.; Ji, Y.; Shan, H.; Zou, Z.; Cao, Y.; Yang, L.; Liu, L.; Zhou, L.; Lei, H.; et al. Hsp90/C Terminal Hsc70-Interacting Protein Regulates the Stability of Ikaros in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Sci. China Life Sci.* **2021**, *64*, 1481–1490, doi:10.1007/s11427-020-1860-2.
301. Xu, W.; Soga, S.; Beebe, K.; Lee, M.-J.; Kim, Y.S.; Trepel, J.; Neckers, L. Sensitivity of Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB2 Exon 20 Insertion Mutants to Hsp90 Inhibition. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 741–744, doi:10.1038/sj.bjc.6603950.
302. Workman, P.; Burrows, F.; Neckers, L.; Rosen, N. Drugging the Cancer Chaperone HSP90. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1113*, 202–216, doi:10.1196/annals.1391.012.
303. Zuehlke, A.; Johnson, J.L. Hsp90 and Co-Chaperones Twist the Functions of Diverse Client Proteins. *Biopolymers* **2010**, *93*, 211–217, doi:10.1002/bip.21292.
304. Silverstein, A.M.; Grammatikakis, N.; Cochran, B.H.; Chinkers, M.; Pratt, W.B. P50cdc37 Binds Directly to the Catalytic Domain of Raf as Well as to a Site on Hsp90 That Is Topologically Adjacent to the Tetratricopeptide Repeat Binding Site*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20090–20095, doi:10.1074/jbc.273.32.20090.
305. Gray, P.J.; Prince, T.; Cheng, J.; Stevenson, M.A.; Calderwood, S.K. Targeting the Oncogene and Kinome Chaperone CDC37. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 491–495, doi:10.1038/nrc2420.
306. Knoblauch, R.; Garabedian, M.J. Role for Hsp90-Associated Cochaperone P23 in Estrogen Receptor Signal Transduction. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 3748–3759, doi:10.1128/MCB.19.5.3748.
307. Zurawska, A.; Urbanski, J.; Matulienė, J.; Baraniak, J.; Klejman, M.P.; Filipek, S.; Matulis, D.; Bieganowski, P. Mutations That Increase Both Hsp90 ATPase Activity in Vitro and Hsp90

- Drug Resistance in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803*, 575–583, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.03.002.
308. Noddings, C.M.; Johnson, J.L.; Agard, D.A. Cryo-EM Reveals How Hsp90 and FKBP Immunophilins Co-Regulate the Glucocorticoid Receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2023**, *30*, 1867–1877, doi:10.1038/s41594-023-01128-y.
309. Maeda, K.; Habara, M.; Kawaguchi, M.; Matsumoto, H.; Hanaki, S.; Masaki, T.; Sato, Y.; Matsuyama, H.; Kunieda, K.; Nakagawa, H.; et al. FKBP51 and FKBP52 Regulate Androgen Receptor Dimerization and Proliferation in Prostate Cancer Cells. *Mol. Oncol.* **2022**, *16*, 940–956, doi:10.1002/1878-0261.13030.
310. Schmid, A.B.; Lagleder, S.; Gräwert, M.A.; Röhl, A.; Hagn, F.; Wandinger, S.K.; Cox, M.B.; Demmer, O.; Richter, K.; Groll, M.; et al. The Architecture of Functional Modules in the Hsp90 Co-chaperone Sti1/Hop. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1506–1517, doi:10.1038/emboj.2011.472.
311. Bhattacharya, K.; Picard, D. The Hsp70–Hsp90 Go-between Hop/Sti1/Sti1 Is a Proteostatic Switch and May Be a Drug Target in Cancer and Neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 7257–7273, doi:10.1007/s00018-021-03962-z.
312. Ni, L.; Yang, C.-S.; Gioeli, D.; Frierson, H.; Toft, D.O.; Paschal, B.M. FKBP51 Promotes Assembly of the Hsp90 Chaperone Complex and Regulates Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 1243–1253, doi:10.1128/MCB.01891-08.
313. Smith, J.R.; Clarke, P.A.; de Billy, E.; Workman, P. Silencing the Cochaperone CDC37 Destabilizes Kinase Clients and Sensitizes Cancer Cells to HSP90 Inhibitors. *Oncogene* **2009**, *28*, 157–169, doi:10.1038/onc.2008.380.
314. Sittler, A.; Lurz, R.; Lueder, G.; Priller, J.; Hayer-Hartl, M.K.; Hartl, F.U.; Lehrach, H.; Wanker, E.E. Geldanamycin Activates a Heat Shock Response and Inhibits Huntingtin Aggregation in a Cell Culture Model of Huntington’s Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1307–1315, doi:10.1093/hmg/10.12.1307.
315. Doi, T.; Onozawa, Y.; Fuse, N.; Yoshino, T.; Yamazaki, K.; Watanabe, J.; Akimov, M.; Robson, M.; Boku, N.; Ohtsu, A. Phase I Dose-Escalation Study of the HSP90 Inhibitor AUY922 in Japanese Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74*, 629–636, doi:10.1007/s00280-014-2521-x.
316. Peterson, L.B.; Eskew, J.D.; Vielhauer, G.A.; Blagg, B.S.J. The hERG Channel Is Dependent upon the Hsp90 α Isoform for Maturation and Trafficking. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1841–1846, doi:10.1021/mp300138n.
317. Goetz, M.P.; Toft, D.; Reid, J.; Ames, M.; Stensgard, B.; Safgren, S.; Adjei, A.A.; Sloan, J.; Atherton, P.; Vasile, V.; et al. Phase I Trial of 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin in Patients With Advanced Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1078–1087, doi:10.1200/JCO.2005.09.119.
318. Ramanathan, R.K.; Trump, D.L.; Eiseman, J.L.; Belani, C.P.; Agarwala, S.S.; Zuhowski, E.G.; Lan, J.; Potter, D.M.; Ivy, S.P.; Ramalingam, S.; et al. Phase I Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Study of 17-(Allylamino)-17-Demethoxygeldanamycin (17AAG, NSC 330507), a Novel Inhibitor of Heat Shock Protein 90, in Patients with Refractory Advanced Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3385–3391, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2322.
319. A. Kitson, R.R.; J. Moody, C. An Improved Route to 19-Substituted Geldanamycins as Novel Hsp90 Inhibitors – Potential Therapeutics in Cancer and Neurodegeneration. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8441–8443, doi:10.1039/C3CC43457E.
320. Sausville, E.A.; Tomaszewski, J.E.; Ivy, P. Clinical Development of 17-Allylamino, 17-Demethoxygeldanamycin. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 377–383, doi:10.2174/1568009033481831.
321. Dimopoulos, M.-A.; Mitsiades, C.S.; Anderson, K.C.; Richardson, P.G. Tanespimycin as Antitumor Therapy. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2011**, *11*, 17–22, doi:10.3816/CLML.2011.n.002.
322. Neckers, L.; Workman, P. Hsp90 Molecular Chaperone Inhibitors: Are We There Yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64–76, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1000.

323. Taldone, T.; Gozman, A.; Maharaj, R.; Chiosis, G. Targeting Hsp90: Small-Molecule Inhibitors and Their Clinical Development. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 370–374, doi:10.1016/j.coph.2008.06.015.
324. Jhaveri, K.; Taldone, T.; Modi, S.; Chiosis, G. Advances in the Clinical Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors in Cancers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 742–755, doi:10.1016/j.bbamer.2011.10.008.
325. Uno, T.; Kitade, M.; Yamashita, S.; Oshiumi, H.; Kawai, Y.; Mizutani, T.; Yoshimura, C.; Kodama, Y.; Muraoka, H.; Takahashi, K.; et al. Abstract C127: TAS-116, an Orally Available HSP90 α/β Selective Inhibitor: Synthesis and Biological Evaluation. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, C127, doi:10.1158/1535-7163.TARG-13-C127.
326. Ohkubo, S.; Kodama, Y.; Muraoka, H.; Hitotsumachi, H.; Yoshimura, C.; Kitade, M.; Hashimoto, A.; Ito, K.; Gomori, A.; Takahashi, K.; et al. TAS-116, a Highly Selective Inhibitor of Heat Shock Protein 90 α and β , Demonstrates Potent Antitumor Activity and Minimal Ocular Toxicity in Preclinical Models. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 14–22, doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0219.
327. Doi, T.; Kurokawa, Y.; Sawaki, A.; Komatsu, Y.; Ozaka, M.; Takahashi, T.; Naito, Y.; Ohkubo, S.; Nishida, T. Efficacy and Safety of TAS-116, an Oral Inhibitor of Heat Shock Protein 90, in Patients with Metastatic or Unresectable Gastrointestinal Stromal Tumour Refractory to Imatinib, Sunitinib and Regorafenib: A Phase II, Single-Arm Trial. *Eur. J. Cancer* **2019**, *121*, 29–39, doi:10.1016/j.ejca.2019.08.009.
328. Kurokawa, Y.; Honma, Y.; Sawaki, A.; Naito, Y.; Iwagami, S.; Komatsu, Y.; Takahashi, T.; Nishida, T.; Doi, T. Pimipib in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumor (CHAPTER-GIST-301): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial. *Ann. Oncol.* **2022**, *33*, 959–967, doi:10.1016/j.annonc.2022.05.518.
329. Naito, Y.; Iwagami, S.; Doi, T.; Takahashi, T.; Kurokawa, Y. Pimipib in Patients with Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors in Japan: An Expanded Access Program. *Int. J. Clin. Oncol.* **2025**, *30*, 935–943, doi:10.1007/s10147-025-02726-0.
330. Shapiro, G.I.; Kwak, E.; Dezube, B.J.; Yule, M.; Ayrton, J.; Lyons, J.; Mahadevan, D. First-in-Human Phase I Dose Escalation Study of a Second-Generation Non-Ansamycin HSP90 Inhibitor, AT13387, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 87–97, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0979.
331. Do, K.; Speranza, G.; Chang, L.-C.; Polley, E.C.; Bishop, R.; Zhu, W.; Trepel, J.B.; Lee, S.; Lee, M.-J.; Kinders, R.J.; et al. Phase I Study of the Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitor Onalespib (AT13387) Administered on a Daily for 2 Consecutive Days per Week Dosing Schedule in Patients with Advanced Solid Tumors. *Invest. New Drugs* **2015**, *33*, 921–930, doi:10.1007/s10637-015-0255-1.
332. Ramalingam, S.; Goss, G.; Rosell, R.; Schmid-Bindert, G.; Zaric, B.; Andric, Z.; Bondarenko, I.; Komov, D.; Ceric, T.; Khuri, F.; et al. A Randomized Phase II Study of Ganetespib, a Heat Shock Protein 90 Inhibitor, in Combination with Docetaxel in Second-Line Therapy of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (GALAXY-1). *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 1741–1748, doi:10.1093/annonc/mdv220.
333. Pillai, R.N.; Fennell, D.A.; Kovcin, V.; Ciuleanu, T.-E.; Ramlau, R.; Kowalski, D.; Schenker, M.; Yalcin, I.; Teofilovici, F.; Vukovic, V.M.; et al. Randomized Phase III Study of Ganetespib, a Heat Shock Protein 90 Inhibitor, With Docetaxel Versus Docetaxel in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (GALAXY-2). *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 613–622, doi:10.1200/JCO.19.00816.
334. Paraiso, K.H.T.; Haarberg, H.E.; Wood, E.; Rebecca, V.W.; Chen, Y.A.; Xiang, Y.; Ribas, A.; Lo, R.S.; Weber, J.S.; Sondak, V.K.; et al. The HSP90 Inhibitor XL888 Overcomes BRAF Inhibitor Resistance Mediated through Diverse Mechanisms. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 2502–2514, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2612.
335. Phillips, M.J.; Alese, O.B.; Horvat, N.K.; Greene, E.; Gbolahan, O.B.; Coleman, K.; Doxie, D.B.; Parihar, V.; Mahdi, Z.K.; McCook-Veal, A.; et al. XL888 and Pembrolizumab Modulate

- the Immune Landscape of Colorectal Tumors in a Phase Ib/II Clinical Trial. *OncoImmunology* **2025**, *14*, 2475620, doi:10.1080/2162402X.2025.2475620.
336. Reynolds, T.S.; Mishra, S.J.; Blagg, B.S.J. Assessment of Hsp90 β -Selective Inhibitor Safety and on-Target Effects. *Sci. Rep.* **2025**, *15*, 3692, doi:10.1038/s41598-025-86647-y.
337. Xie, X.; Zhang, N.; Li, X.; Huang, H.; Peng, C.; Huang, W.; Foster, L.J.; He, G.; Han, B. Small-Molecule Dual Inhibitors Targeting Heat Shock Protein 90 for Cancer Targeted Therapy. *Bioorganic Chem.* **2023**, *139*, 106721, doi:10.1016/j.bioorg.2023.106721.
338. Seo, Y.H. Small Molecule Inhibitors to Disrupt Protein-Protein Interactions of Heat Shock Protein 90 Chaperone Machinery. *J. Cancer Prev.* **2015**, *20*, 5–11, doi:10.15430/JCP.2015.20.1.5.
339. Liu, Q.; Tu, G.; Hu, Y.; Jiang, Q.; Liu, J.; Lin, S.; Yu, Z.; Li, G.; Wu, X.; Tang, Y.; et al. Discovery of BP3 as an Efficacious Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradator of HSP90 for Treating Breast Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *228*, 114013, doi:10.1016/j.ejmech.2021.114013.
340. Jiang, Q.; Fu, M.; Tang, Y.; Li, G.; Tu, G.; Wu, X.; Wu, Q.; Huang, X.; Xu, J.; Liu, Y.; et al. Discovery of X10g as a Selective PROTAC Degradator of Hsp90 α Protein for Treating Breast Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *260*, 115690, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115690.
341. Wurnig, S.; Vogt, M.; Hogenkamp, J.; Dienstbier, N.; Borkhardt, A.; Bhatia, S.; Hansen, F.K. Development of the First Geldanamycin-Based HSP90 Degradators. *Front. Chem.* **2023**, *11*, doi:10.3389/fchem.2023.1219883.
342. Liang, J.; Wang, D.; Zhao, Y.; Wu, Y.; Liu, X.; Xin, L.; Dai, J.; Ren, H.; Zhou, H.-B.; Cai, H.; et al. Novel Hsp90-Targeting PROTACs: Enhanced Synergy with Cisplatin in Combination Therapy of Cervical Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *275*, 116572, doi:10.1016/j.ejmech.2024.116572.
343. Shelton, S.N.; Shawgo, M.E.; Matthews, S.B.; Lu, Y.; Donnelly, A.C.; Szabla, K.; Tanol, M.; Vielhauer, G.A.; Rajewski, R.A.; Matts, R.L.; et al. KU135, a Novel Novobiocin-Derived C-Terminal Inhibitor of the 90-kDa Heat Shock Protein, Exerts Potent Antiproliferative Effects in Human Leukemic Cells. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *76*, 1314–1322, doi:10.1124/mol.109.058545.
344. Brownell, J.E.; Zhou, J.; Ranalli, T.; Kobayashi, R.; Edmondson, D.G.; Roth, S.Y.; Allis, C.D. Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell* **1996**, *84*, 843–851, doi:10.1016/S0092-8674(00)81063-6.
345. Jang, M.K.; Mochizuki, K.; Zhou, M.; Jeong, H.-S.; Brady, J.N.; Ozato, K. The Bromodomain Protein Brd4 Is a Positive Regulatory Component of P-TEFb and Stimulates RNA Polymerase II-Dependent Transcription. *Mol. Cell* **2005**, *19*, 523–534, doi:10.1016/j.molcel.2005.06.027.
346. Bisgrove, D.A.; Mahmoudi, T.; Henklein, P.; Verdin, E. Conserved P-TEFb-Interacting Domain of BRD4 Inhibits HIV Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 13690–13695, doi:10.1073/pnas.0705053104.
347. Vollmuth, F.; Blankenfeldt, W.; Geyer, M. Structures of the Dual Bromodomains of the P-TEFb-Activating Protein Brd4 at Atomic Resolution*. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 36547–36556, doi:10.1074/jbc.M109.033712.
348. Dhalluin, C.; Carlson, J.E.; Zeng, L.; He, C.; Aggarwal, A.K.; Zhou, M.-M. Structure and Ligand of a Histone Acetyltransferase Bromodomain. *Nature* **1999**, *399*, 491–496, doi:10.1038/20974.
349. Rahman, S.; Sowa, M.E.; Ottinger, M.; Smith, J.A.; Shi, Y.; Harper, J.W.; Howley, P.M. The Brd4 Extraterminal Domain Confers Transcription Activation Independent of pTEFb by Recruiting Multiple Proteins, Including NSD3. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 2641–2652, doi:10.1128/MCB.01341-10.
350. Itzen, F.; Greifenberg, A.K.; Böskén, C.A.; Geyer, M. Brd4 Activates P-TEFb for RNA Polymerase II CTD Phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7577–7590, doi:10.1093/nar/gku449.

351. Yang, Z.; Yik, J.H.N.; Chen, R.; He, N.; Jang, M.K.; Ozato, K.; Zhou, Q. Recruitment of P-TEFb for Stimulation of Transcriptional Elongation by the Bromodomain Protein Brd4. *Mol. Cell* **2005**, *19*, 535–545, doi:10.1016/j.molcel.2005.06.029.
352. Dey, A.; Nishiyama, A.; Karpova, T.; McNally, J.; Ozato, K. Brd4 Marks Select Genes on Mitotic Chromatin and Directs Postmitotic Transcription. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 4899–4909, doi:10.1091/mbc.e09-05-0380.
353. Dey, A.; Chitsaz, F.; Abbasi, A.; Misteli, T.; Ozato, K. The Double Bromodomain Protein Brd4 Binds to Acetylated Chromatin during Interphase and Mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 8758–8763, doi:10.1073/pnas.1433065100.
354. Sarnik, J.; Popławski, T.; Tokarz, P. BET Proteins as Attractive Targets for Cancer Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11102, doi:10.3390/ijms222011102.
355. Huang, B.; Yang, X.-D.; Zhou, M.-M.; Ozato, K.; Chen, L.-F. Brd4 Coactivates Transcriptional Activation of NF- κ B via Specific Binding to Acetylated RelA. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 1375–1387, doi:10.1128/MCB.01365-08.
356. Lovén, J.; Hoke, H.A.; Lin, C.Y.; Lau, A.; Orlando, D.A.; Vakoc, C.R.; Bradner, J.E.; Lee, T.I.; Young, R.A. Selective Inhibition of Tumor Oncogenes by Disruption of Super-Enhancers. *Cell* **2013**, *153*, 320–334, doi:10.1016/j.cell.2013.03.036.
357. LeRoy, G.; Rickards, B.; Flint, S.J. The Double Bromodomain Proteins Brd2 and Brd3 Couple Histone Acetylation to Transcription. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 51–60, doi:10.1016/j.molcel.2008.01.018.
358. Kanno, T.; Kanno, Y.; Siegel, R.M.; Jang, M.K.; Lenardo, M.J.; Ozato, K. Selective Recognition of Acetylated Histones by Bromodomain Proteins Visualized in Living Cells. *Mol. Cell* **2004**, *13*, 33–43, doi:10.1016/S1097-2765(03)00482-9.
359. Sang, X.; Zhang, Y.; Fang, F.; Gao, L.; Tao, Y.; Li, X.; Zhang, Z.; Wang, J.; Tian, Y.; Li, Z.; et al. BRD4 Inhibitor GNE-987 Exerts Anticancer Effects by Targeting Super-Enhancer-Related Gene LYL1 in Acute Myeloid Leukemia. *J. Immunol. Res.* **2022**, *2022*, 7912484, doi:10.1155/2022/7912484.
360. Roe, J.-S.; Mercan, F.; Rivera, K.; Pappin, D.J.; Vakoc, C.R. BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Cell* **2015**, *58*, 1028–1039, doi:10.1016/j.molcel.2015.04.011.
361. Fang, F.; Lu, J.; Sang, X.; Tao, Y.-F.; Wang, J.-W.; Zhang, Z.-M.; Zhang, Y.-P.; Li, X.-L.; Xie, Y.; Wu, S.-Y.; et al. Super-Enhancer Profiling Identifies Novel Critical and Targetable Cancer Survival Gene LYL1 in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 225, doi:10.1186/s13046-022-02428-9.
362. Filippakopoulos, P.; Qi, J.; Picaud, S.; Shen, Y.; Smith, W.B.; Fedorov, O.; Morse, E.M.; Keates, T.; Hickman, T.T.; Felletar, I.; et al. Selective Inhibition of BET Bromodomains. *Nature* **2010**, *468*, 1067–1073, doi:10.1038/nature09504.
363. Delmore, J.E.; Issa, G.C.; Lemieux, M.E.; Rahl, P.B.; Shi, J.; Jacobs, H.M.; Kastiris, E.; Gilpatrick, T.; Paranal, R.M.; Qi, J.; et al. BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target C-Myc. *Cell* **2011**, *146*, 904–917, doi:10.1016/j.cell.2011.08.017.
364. Zuber, J.; Shi, J.; Wang, E.; Rappaport, A.R.; Herrmann, H.; Sison, E.A.; Magoon, D.; Qi, J.; Blatt, K.; Wunderlich, M.; et al. RNAi Screen Identifies Brd4 as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukaemia. *Nature* **2011**, *478*, 524–528, doi:10.1038/nature10334.
365. Berthon, C.; Raffoux, E.; Thomas, X.; Vey, N.; Gomez-Roca, C.; Yee, K.; Taussig, D.C.; Rezai, K.; Roumier, C.; Herait, P.; et al. Bromodomain Inhibitor OTX015 in Patients with Acute Leukaemia: A Dose-Escalation, Phase 1 Study. *Lancet Haematol.* **2016**, *3*, e186–e195, doi:10.1016/S2352-3026(15)00247-1.
366. Piha-Paul, S.A.; Hann, C.L.; French, C.A.; Cousin, S.; Braña, I.; Cassier, P.A.; Moreno, V.; de Bono, J.S.; Harward, S.D.; Ferron-Brady, G.; et al. Phase 1 Study of Molibresib (GSK525762), a Bromodomain and Extra-Terminal Domain Protein Inhibitor, in NUT Carcinoma and Other Solid Tumors. *JNCI Cancer Spectr.* **2020**, *4*, pkz093, doi:10.1093/jncics/pkz093.

367. Shi, J.; Van de Water, R.; Hong, K.; Lamer, R.B.; Weichert, K.W.; Sandoval, C.M.; Kasibhatla, S.R.; Boehm, M.F.; Chao, J.; Lundgren, K.; et al. EC144 Is a Potent Inhibitor of the Heat Shock Protein 90. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 7786–7795, doi:10.1021/jm300810x.
368. Yun, T.J.; Harning, E.K.; Giza, K.; Rabah, D.; Li, P.; Arndt, J.W.; Luchetti, D.; Biamonte, M.A.; Shi, J.; Lundgren, K.; et al. EC144, a Synthetic Inhibitor of Heat Shock Protein 90, Blocks Innate and Adaptive Immune Responses in Models of Inflammation and Autoimmunity. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 563–575, doi:10.4049/jimmunol.1000222.
369. Корововић, М.; Тасић, Г. Необјављени Резултати.
370. Zhou, B.; Hu, J.; Xu, F.; Chen, Z.; Bai, L.; Fernandez-Salas, E.; Lin, M.; Liu, L.; Yang, C.-Y.; Zhao, Y.; et al. Discovery of a Small-Molecule Degradator of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Proteins with Picomolar Cellular Potencies and Capable of Achieving Tumor Regression. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 462–481, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01816.
371. Hughes, P.F.; Barrott, J.J.; Carlson, D.A.; Loisselle, D.R.; Speer, B.L.; Bodoor, K.; Rund, L.A.; Haystead, T.A.J. A Highly Selective Hsp90 Affinity Chromatography Resin with a Cleavable Linker. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3298–3305, doi:10.1016/j.bmc.2012.03.043.
372. Neil, E.R.; Funk, A.M.; Yufit, D.S.; Parker, D. Synthesis, Stereocontrol and Structural Studies of Highly Luminescent Chiral Tris-Amidepyridyl-Triazacyclononane Lanthanide Complexes. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 5490–5504, doi:10.1039/C3DT53000K.
373. Percec, V.; Leowanawat, P.; Sun, H.-J.; Kulikov, O.; Nusbaum, C.D.; Tran, T.M.; Bertin, A.; Wilson, D.A.; Peterca, M.; Zhang, S.; et al. Modular Synthesis of Amphiphilic Janus Glycodendrimers and Their Self-Assembly into Glycodendrimersomes and Other Complex Architectures with Bioactivity to Biomedically Relevant Lectins. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9055–9077, doi:10.1021/ja403323y.
374. Kim, Y.; Park, T.; Woo, S.; Lee, H.; Kim, Y.; Cho, J.; Jung, D.; Kim, S.; Kwon, H.; Oh, K.; et al. Protein-Active Agent Conjugates and Method for Preparing the Same 2012.
375. St John-Campbell, S.; White, A.J.P.; Bull, J.A. Methylene C(Sp³)–H β,B'-Diarylation of Cyclohexanecarbaldehydes Promoted by a Transient Directing Group and Pyridone Ligand. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1807–1812, doi:10.1021/acs.orglett.0c00124.
376. Yao, G.; Yu, J.; Lin, C.; Zhu, Y.; Duan, A.; Li, M.; Yuan, J.; Zhang, J. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2'-Methyl-2'-Fluoro-6-Methyl-7-Alkynyl-7-Deazapurine Nucleoside Analogs as Anti-Zika Virus Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *234*, 114275, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114275.
377. Brough, P.A.; Barril, X.; Borgognoni, J.; Chene, P.; Davies, N.G.M.; Davis, B.; Drysdale, M.J.; Dymock, B.; Eccles, S.A.; Garcia-Echeverria, C.; et al. Combining Hit Identification Strategies: Fragment-Based and in Silico Approaches to Orally Active 2-Aminothieno[2,3-d]Pyrimidine Inhibitors of the Hsp90 Molecular Chaperone. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4794–4809, doi:10.1021/jm900357y.
378. Brady, R.M.; Vom, A.; Roy, M.J.; Toovey, N.; Smith, B.J.; Moss, R.M.; Hatzis, E.; Huang, D.C.S.; Parisot, J.P.; Yang, H.; et al. De-Novo Designed Library of Benzoylureas as Inhibitors of BCL-XL: Synthesis, Structural and Biochemical Characterization. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1323–1343, doi:10.1021/jm401948b.
379. Hamaguchi, W.; Masuda, N.; Isomura, M.; Miyamoto, S.; Kikuchi, S.; Amano, Y.; Honbou, K.; Mihara, T.; Watanabe, T. Design and Synthesis of Novel Benzimidazole Derivatives as Phosphodiesterase 10A Inhibitors with Reduced CYP1A2 Inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7612–7623, doi:10.1016/j.bmc.2013.10.035.
380. Li, Y.; Cheng, M.; Hao, J.; Wang, C.; Jia, G.; Li, C. Terpyridine–Cu(II) Targeting Human Telomeric DNA to Produce Highly Stereospecific G-Quadruplex DNA Metalloenzyme. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5578–5585, doi:10.1039/C5SC01381J.
381. Harijan, R.K.; Hoff, O.; Ducati, R.G.; Firestone, R.S.; Hirsch, B.M.; Evans, G.B.; Schramm, V.L.; Tyler, P.C. Selective Inhibitors of Helicobacter Pylori Methylthioadenosine Nucleosidase and Human Methylthioadenosine Phosphorylase. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 3286–3296, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01642.

382. Jalalian, N.; Olofsson, B. Design and Asymmetric Synthesis of Chiral Diaryliodonium Salts. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5793–5800, doi:10.1016/j.tet.2010.05.004.
383. Su, S.; Yang, Z.; Gao, H.; Yang, H.; Zhu, S.; An, Z.; Wang, J.; Li, Q.; Chandarlapaty, S.; Deng, H.; et al. Potent and Preferential Degradation of CDK6 via Proteolysis Targeting Chimera Degraders. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7575–7582, doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00871.
384. Zhang, H.; Zhao, H.-Y.; Xi, X.-X.; Liu, Y.-J.; Xin, M.; Mao, S.; Zhang, J.-J.; Lu, A.-X.; Zhang, S.-Q. Discovery of Potent Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Degraders by Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC). *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *189*, 112061, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112061.
385. Liu, H.; Sun, R.; Ren, C.; Qiu, X.; Yang, X.; Jiang, B. Construction of an IMiD-Based Azide Library as a Kit for PROTAC Research. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 166–170, doi:10.1039/D0OB02120B.
386. Yao, L.; Ohlson, S.; Dymock, B.W. Design and Synthesis of Triple Inhibitors of Janus Kinase (JAK), Histone Deacetylase (HDAC) and Heat Shock Protein 90 (HSP90). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 1357–1362, doi:10.1016/j.bmcl.2018.03.009.
387. Zhang, Y.; Tortorella, M.D.; Wang, Y.; Liu, J.; Tu, Z.; Liu, X.; Bai, Y.; Wen, D.; Lu, X.; Lu, Y.; et al. Synthesis of Deuterated Benzopyran Derivatives as Selective COX-2 Inhibitors with Improved Pharmacokinetic Properties. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1162–1166, doi:10.1021/ml500299q.
388. Munagala, G.; Yempalla, K.R.; Singh, S.; Sharma, S.; Kalia, N.P.; Rajput, V.S.; Kumar, S.; Sawant, S.D.; Khan, I.A.; Vishwakarma, R.A.; et al. Synthesis of New Generation Triazolyl- and Isoxazolyl-Containing 6-Nitro-2,3-Dihydroimidazooxazoles as Anti-TB Agents: In Vitro, Structure–Activity Relationship, Pharmacokinetics and in Vivo Evaluation. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3610–3624, doi:10.1039/C5OB00054H.
389. Bai, S.; Li, S.; Xu, J.; Peng, X.; Sai, K.; Chu, W.; Tu, Z.; Zeng, C.; Mach, R.H. Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of Conformationally Flexible Tetrahydroisoquinolinyl Triazole Carboxamide and Triazole Substituted Benzamide Analogues as $\Sigma 2$ Receptor Ligands. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4239–4251, doi:10.1021/jm5001453.
390. Huang, K.H.; Veal, J.M.; Fadden, R.P.; Rice, J.W.; Eaves, J.; Strachan, J.-P.; Barabasz, A.F.; Foley, B.E.; Barta, T.E.; Ma, W.; et al. Discovery of Novel 2-Aminobenzamide Inhibitors of Heat Shock Protein 90 as Potent, Selective and Orally Active Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4288–4305, doi:10.1021/jm900230j.
391. Rajan, A.; Kelly, R.J.; Trepel, J.B.; Kim, Y.S.; Alarcon, S.V.; Kummar, S.; Gutierrez, M.; Crandon, S.; Zein, W.M.; Jain, L.; et al. A Phase I Study of PF-04929113 (SNX-5422), an Orally Bioavailable Heat Shock Protein 90 Inhibitor, in Patients with Refractory Solid Tumor Malignancies and Lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6831–6839, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0821.
392. Reddy, N.; Voorhees, P.M.; Houk, B.E.; Brega, N.; Hinson, J.M.; Jillela, A. Phase I Trial of the HSP90 Inhibitor PF-04929113 (SNX5422) in Adult Patients With Recurrent, Refractory Hematologic Malignancies. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2013**, *13*, 385–391, doi:10.1016/j.clml.2013.03.010.
393. Infante, J.R.; Weiss, G.J.; Jones, S.; Tibes, R.; Bauer, T.M.; Bendell, J.C.; Hinson, J.M.; Von Hoff, D.D.; Burris, H.A.; Orlemans, E.O.; et al. Phase I Dose-Escalation Studies of SNX-5422, an Orally Bioavailable Heat Shock Protein 90 Inhibitor, in Patients with Refractory Solid Tumours. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50*, 2897–2904, doi:10.1016/j.ejca.2014.07.017.
394. Gutierrez, M.; Guo, R.; Giaccone, G.; Liu, S.V.; Hao, Z.; Hilton, C.; Hinson, J.M.; Kris, M.G.; Orlemans, E.O.; Drilon, A. Phase 1 Multicenter Study of the HSP90 Inhibitor SNX-5422 plus Carboplatin and Paclitaxel in Patients with Lung Cancers. *Lung Cancer* **2021**, *162*, 23–28, doi:10.1016/j.lungcan.2021.10.001.
395. Ernst, J.T.; Liu, M.; Zuccola, H.; Neubert, T.; Beaumont, K.; Turnbull, A.; Kallel, A.; Vought, B.; Stamos, D. Correlation between Chemotype-Dependent Binding Conformations of HSP90 α/β and Isoform Selectivity—Implications for the Structure-Based Design of HSP90 α/β

- Selective Inhibitors for Treating Neurodegenerative Diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 204–208, doi:10.1016/j.bmcl.2013.11.036.
396. Policarpo, R.L.; Decultot, L.; May, E.; Kuzmič, P.; Carlson, S.; Huang, D.; Chu, V.; Wright, B.A.; Dhakshinamoorthy, S.; Kannt, A.; et al. High-Affinity Alkynyl Bisubstrate Inhibitors of Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT). *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 9837–9873, doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01238.
397. Dong, Z.; Zhang, X.-W.; Li, W.; Li, Z.-M.; Wang, W.-Y.; Zhang, Y.; Liu, W.; Liu, W.-B. Synthesis of N-Fused Polycyclic Indoles via Ligand-Free Palladium-Catalyzed Annulation/Acyl Migration Reaction. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1082–1086, doi:10.1021/acs.orglett.8b04128.
398. Li, B.; Berliner, M.; Buzon, R.; Chiu, C.K.-F.; Colgan, S.T.; Kaneko, T.; Keene, N.; Kissel, W.; Le, T.; Leeman, K.R.; et al. Aqueous Phosphoric Acid as a Mild Reagent for Deprotection of Tert-Butyl Carbamates, Esters, and Ethers. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9045–9050, doi:10.1021/jo061377b.
399. Li, J.; Liu, T.; Song, Y.; Wang, M.; Liu, L.; Zhu, H.; Li, Q.; Lin, J.; Jiang, H.; Chen, K.; et al. Discovery of Small-Molecule Degraders of the CDK9-Cyclin T1 Complex for Targeting Transcriptional Addiction in Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 11034–11057, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00257.
400. Koravovic, M.; Mayasundari, A.; Tasic, G.; Keramatnia, F.; Stachowski, T.R.; Cui, H.; Chai, S.C.; Jonchere, B.; Yang, L.; Li, Y.; et al. From PROTAC to Inhibitor: Structure-Guided Discovery of Potent and Orally Bioavailable BET Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *251*, 115246, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115246.
401. Ozer, H.G.; El-Gamal, D.; Powell, B.; Hing, Z.A.; Blachly, J.S.; Harrington, B.; Mitchell, S.; Grieselhuber, N.R.; Williams, K.; Lai, T.-H.; et al. BRD4 Profiling Identifies Critical Chronic Lymphocytic Leukemia Oncogenic Circuits and Reveals Sensitivity to PLX51107, a Novel Structurally Distinct BET Inhibitor. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 458–477, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0902.
402. Huang, H.-T.; Dobrovolsky, D.; Paulk, J.; Yang, G.; Weisberg, E.L.; Doctor, Z.M.; Buckley, D.L.; Cho, J.-H.; Ko, E.; Jang, J.; et al. A Chemoproteomic Approach to Query the Degradable Kinome Using a Multi-Kinase Degradator. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25*, 88-99.e6, doi:10.1016/j.chembiol.2017.10.005.
403. Hasvold, L.A.; Sheppard, G.S.; Wang, L.; Fidanze, S.D.; Liu, D.; Pratt, J.K.; Mantei, R.A.; Wada, C.K.; Hubbard, R.; Shen, Y.; et al. Methylpyrrole Inhibitors of BET Bromodomains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2225–2233, doi:10.1016/j.bmcl.2017.02.057.
404. Di, L.; Kerns, E.H.; Hong, Y.; Chen, H. Development and Application of High Throughput Plasma Stability Assay for Drug Discovery. *Int. J. Pharm.* **2005**, *297*, 110–119, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.03.022.
405. Rakesh; Bruhn, D.; Madhura, D.B.; Maddox, M.; Lee, R.B.; Trivedi, A.; Yang, L.; Scherman, M.S.; Gilliland, J.C.; Gruppo, V.; et al. Antitubercular Nitrofurans with Improved Pharmacokinetic Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6063–6072, doi:10.1016/j.bmc.2012.08.023.
406. Mahindroo, N.; Connelly, M.C.; Punchihewa, C.; Yang, L.; Yan, B.; Fujii, N. Amide Conjugates of Ketoprofen and Indole as Inhibitors of Gli1-Mediated Transcription in the Hedgehog Pathway. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4801–4811, doi:10.1016/j.bmc.2010.05.001.
407. Uchida, M.; Fukazawa, T.; Yamazaki, Y.; Hashimoto, H.; Miyamoto, Y. A Modified Fast (4 Day) 96-Well Plate Caco-2 Permeability Assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2009**, *59*, 39–43, doi:10.1016/j.vascn.2008.10.006.
408. Waters, N.J.; Jones, R.; Williams, G.; Sohal, B. Validation of a Rapid Equilibrium Dialysis Approach for the Measurement of Plasma Protein Binding. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 4586–4595, doi:10.1002/jps.21317.
409. Di, L.; Kerns, E.H.; Li, S.Q.; Petusky, S.L. High Throughput Microsomal Stability Assay for Insoluble Compounds. *Int. J. Pharm.* **2006**, *317*, 54–60, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.03.007.

410. Di, L.; Kerns, E.H.; Ma, X.J.; Huang, Y.; Carter, G.T. Applications of High Throughput Microsomal Stability Assay in Drug Discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11*, 469–476, doi:10.2174/138620708784911429.
411. Dong, J.; Wang, N.-N.; Yao, Z.-J.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Ouyang, D.; Lu, A.-P.; Cao, D.-S. ADMETlab: A Platform for Systematic ADMET Evaluation Based on a Comprehensively Collected ADMET Database. *J. Cheminformatics* **2018**, *10*, 29, doi:10.1186/s13321-018-0283-x.
412. Kar, S.; Leszczynski, J. Open Access in Silico Tools to Predict the ADMET Profiling of Drug Candidates. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15*, 1473–1487, doi:10.1080/17460441.2020.1798926.
413. Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; et al. ADMETlab 2.0: An Integrated Online Platform for Accurate and Comprehensive Predictions of ADMET Properties. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W5–W14, doi:10.1093/nar/gkab255.
414. Schober, P.; Boer, C.; Schwarte, L.A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth. Analg.* **2018**, *126*, 1763–1768, doi:10.1213/ANE.0000000000002864.
415. Mishra, N.K.; Urick, A.K.; Ember, S.W.J.; Schönbrunn, E.; Pomerantz, W.C. Fluorinated Aromatic Amino Acids Are Sensitive ¹⁹F NMR Probes for Bromodomain-Ligand Interactions. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2755–2760, doi:10.1021/cb5007344.
416. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132, doi:10.1107/S0907444909047337.
417. Otwinowski, Z.; Minor, W. [20] Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 1997; Vol. 276, pp. 307–326.
418. McCoy, A.J.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Adams, P.D.; Winn, M.D.; Storoni, L.C.; Read, R.J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674, doi:10.1107/S0021889807021206.
419. Liebschner, D.; Afonine, P.V.; Baker, M.L.; Bunkóczi, G.; Chen, V.B.; Croll, T.I.; Hintze, B.; Hung, L.-W.; Jain, S.; McCoy, A.J.; et al. Macromolecular Structure Determination Using X-Rays, Neutrons and Electrons: Recent Developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **2019**, *75*, 861–877, doi:10.1107/S2059798319011471.
420. Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132, doi:10.1107/S0907444904019158.
421. Quentmeier, H.; Reinhardt, J.; Zaborski, M.; Drexler, H.G. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *Leukemia* **2003**, *17*, 120–124, doi:10.1038/sj.leu.2402740.
422. Minami, Y.; Kiyoi, H.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, K.; Ueda, R.; Saito, H.; Naoe, T. Selective Apoptosis of Tandemly Duplicated FLT3-Transformed Leukemia Cells by Hsp90 Inhibitors. *Leukemia* **2002**, *16*, 1535–1540, doi:10.1038/sj.leu.2402558.
423. Zhao, D.; Xu, Y.-M.; Cao, L.-Q.; Yu, F.; Zhou, H.; Qin, W.; Li, H.-J.; He, C.-X.; Xing, L.; Zhou, X.; et al. Complex Crystal Structure Determination and in Vitro Anti-Non-Small Cell Lung Cancer Activity of Hsp90N Inhibitor SNX-2112. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.650106.
424. Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623, doi:10.1021/jm020017n.
425. Schopf, F.H.; Biebl, M.M.; Buchner, J. The HSP90 Chaperone Machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 345–360, doi:10.1038/nrm.2017.20.
426. Taipale, M.; Krykbaeva, I.; Koeva, M.; Kayatekin, C.; Westover, K.D.; Karras, G.I.; Lindquist, S. Quantitative Analysis of Hsp90-Client Interactions Reveals Principles of Substrate Recognition. *Cell* **2012**, *150*, 987–1001, doi:10.1016/j.cell.2012.06.047.
427. Powell, C.E.; Du, G.; Bushman, J.W.; He, Z.; Zhang, T.; Fischer, E.S.; Gray, N.S. Selective Degradation-Inducing Probes for Studying Cereblon (CRBN) Biology. *RSC Med. Chem.* **2021**, *12*, 1381–1390, doi:10.1039/D0MD00382D.

428. Li, Z.; Ma, S.; Zhang, L.; Zhang, S.; Ma, Z.; Du, L.; Li, M. Targeted Protein Degradation Induced by HEMTACs Based on HSP90. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 733–751, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01648.
429. Dong, J.; Ma, F.; Cai, M.; Cao, F.; Li, H.; Liang, H.; Li, Y.; Ding, G.; Li, J.; Cheng, X.; et al. Heat Shock Protein 90 Interactome-Mediated Proteolysis Targeting Chimera (HIM-PROTAC) Degrading Glutathione Peroxidase 4 to Trigger Ferroptosis. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 16712–16736, doi:10.1021/acs.jmedchem.4c01518.
430. Deng, X.-Y.; Xu, H.; Peng, Y.-X.; Guo, Y.-Y.; He, R.-F.; Lu, G. Aurora A Degradation by HSP90 Interactome-Mediating PROTACs in A549 and Paclitaxel-Resistant A549 Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2025**, *300*, 118141, doi:10.1016/j.ejmech.2025.118141.
431. Liu, W.; Liu, J.; Shu, H.; Zhang, L.; Yin, X.; Xu, X.; You, Q.; Wang, L. HSP90 Mediates Targeted Degradation of Nonclient Protein PARP1 for Breast Cancer Treatment. *J. Med. Chem.* **2025**, *68*, 19933–19954, doi:10.1021/acs.jmedchem.5c00409.
432. Li, X.; Liu, M.; Wang, H.; Mao, J.; Zhai, X.; He, T.; Ma, J.; Zhou, Y.; Lu, W.; Yu, X.; et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of WEE1 Degraders via HSP90-Mediated Targeting Chimeras for Target Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *Eur. J. Med. Chem.* **2025**, *290*, 117512, doi:10.1016/j.ejmech.2025.117512.
433. Min, J.-N.; Whaley, R.A.; Sharpless, N.E.; Lockyer, P.; Portbury, A.L.; Patterson, C. CHIP Deficiency Decreases Longevity, with Accelerated Aging Phenotypes Accompanied by Altered Protein Quality Control. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4018–4025, doi:10.1128/MCB.00296-08.
434. Li, F.; Li, Y.; Liang, H.; Xu, T.; Kong, Y.; Huang, M.; Xiao, J.; Chen, X.; Xia, H.; Wu, Y.; et al. HECTD3 Mediates TRAF3 Polyubiquitination and Type I Interferon Induction during Bacterial Infection. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 4148–4162, doi:10.1172/JCI120406.
435. Figueroa, A.; Kotani, H.; Toda, Y.; Mazan-Mamczarz, K.; Mueller, E.-C.; Otto, A.; Disch, L.; Norman, M.; Ramdasi, R.M.; Keshtgar, M.; et al. Novel Roles of Hakai in Cell Proliferation and Oncogenesis. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 3533–3542, doi:10.1091/mbc.e08-08-0845.
436. Liao, X.; Li, W.; Zhou, H.; Rajendran, B.K.; Li, A.; Ren, J.; Luan, Y.; Calderwood, D.A.; Turk, B.; Tang, W.; et al. The CUL5 E3 Ligase Complex Negatively Regulates Central Signaling Pathways in CD8⁺ T Cells. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 603, doi:10.1038/s41467-024-44885-0.
437. Connell, P.; Ballinger, C.A.; Jiang, J.; Wu, Y.; Thompson, L.J.; Höhfeld, J.; Patterson, C. The Co-Chaperone CHIP Regulates Protein Triage Decisions Mediated by Heat-Shock Proteins. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 93–96, doi:10.1038/35050618.
438. Li, Z.; Zhou, L.; Prodromou, C.; Savic, V.; Pearl, L.H. HECTD3 Mediates an HSP90-Dependent Degradation Pathway for Protein Kinase Clients. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 2515–2528, doi:10.1016/j.celrep.2017.05.078.
439. Díaz-Díaz, A.; Roca-Lema, D.; Casas-Pais, A.; Romay, G.; Colombo, G.; Concha, Á.; Graña, B.; Figueroa, A. Heat Shock Protein 90 Chaperone Regulates the E3 Ubiquitin-Ligase Hakai Protein Stability. *Cancers* **2020**, *12*, 215, doi:10.3390/cancers12010215.
440. Ehrlich, E.S.; Wang, T.; Luo, K.; Xiao, Z.; Niewiadomska, A.M.; Martinez, T.; Xu, W.; Neckers, L.; Yu, X.-F. Regulation of Hsp90 Client Proteins by a Cullin5-RING E3 Ubiquitin Ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 20330–20335, doi:10.1073/pnas.0810571106.
441. Chrisochoidou, Y.; Scarpino, A.; Morales, S.; Martin, S.; Bird, S.; Li, Y.; Walker, B.; Caldwell, J.; Le Bihan, Y.-V.; Pawlyn, C. Evaluating the Impact of CRBN Mutations on Response to Immunomodulatory Drugs and Novel Cereblon E3 Ligase Modulators in Myeloma. *Blood* **2025**, *145*, 2630–2644, doi:10.1182/blood.2024025861.
442. Park, S.; Kim, K.; Haam, K.; Ban, H.S.; Kim, J.-A.; Park, B.C.; Park, S.G.; Kim, S.; Kim, J.-H. Long-Term Depletion of Cereblon Induces Mitochondrial Dysfunction in Cancer Cells. *BMB Rep.* **2021**, *54*, 305–310, doi:10.5483/BMBRep.2021.54.6.218.
443. SINHA, A.; FALLER, D.V.; DENIS, G.V. Bromodomain Analysis of Brd2-Dependent Transcriptional Activation of Cyclin A. *Biochem. J.* **2005**, *387*, 257–269, doi:10.1042/BJ20041793.

444. Belkina, A.C.; Nikolajczyk, B.S.; Denis, G.V. BET Protein Function Is Required for Inflammation: Brd2 Genetic Disruption and BET Inhibitor JQ1 Impair Mouse Macrophage Inflammatory Responses. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 3670–3678, doi:10.4049/jimmunol.1202838.
445. Gilan, O.; Rioja, I.; Knezevic, K.; Bell, M.J.; Yeung, M.M.; Harker, N.R.; Lam, E.Y.N.; Chung, C.; Bamborough, P.; Petretich, M.; et al. Selective Targeting of BD1 and BD2 of the BET Proteins in Cancer and Immunoinflammation. *Science* **2020**, *368*, 387–394, doi:10.1126/science.aaz8455.
446. Faivre, E.J.; McDaniel, K.F.; Albert, D.H.; Mantena, S.R.; Plotnik, J.P.; Wilcox, D.; Zhang, L.; Bui, M.H.; Sheppard, G.S.; Wang, L.; et al. Selective Inhibition of the BD2 Bromodomain of BET Proteins in Prostate Cancer. *Nature* **2020**, *578*, 306–310, doi:10.1038/s41586-020-1930-8.
447. Dawson, M.A.; Prinjha, R.K.; Dittmann, A.; Giotopoulos, G.; Bantscheff, M.; Chan, W.-I.; Robson, S.C.; Chung, C.; Hopf, C.; Savitski, M.M.; et al. Inhibition of BET Recruitment to Chromatin as an Effective Treatment for MLL-Fusion Leukaemia. *Nature* **2011**, *478*, 529–533, doi:10.1038/nature10509.
448. Dawson, M.A.; Gudgin, E.J.; Horton, S.J.; Giotopoulos, G.; Meduri, E.; Robson, S.; Cannizzaro, E.; Osaki, H.; Wiese, M.; Putwain, S.; et al. Recurrent Mutations, Including NPM1c, Activate a BRD4-Dependent Core Transcriptional Program in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia* **2014**, *28*, 311–320, doi:10.1038/leu.2013.338.
449. Henssen, A.G.; Thor, T.; Odersky, A.; Heukamp, L.; El-Hindy, N.; Beckers, A.; Spleleman, F.; Althoff, K.; Schäfers, S.; Schramm, A.; et al. BET Bromodomain Protein Inhibition Is a Therapeutic Option for Medulloblastoma. *Oncotarget* **2013**, *4*, 2080–2095, doi:10.18632/oncotarget.1534.
450. Venataraman, S.; Alimova, I.; Harris, P.; Birks, D.K.; Balakrishnan, I.; Remke, M.; Taylor, M.D.; Handler, M.; Foreman, N.K.; Vibhakar, R. Inhibition of BRD4 Attenuates Tumor Cell Selfrenewal and Suppresses Stem Cell Signaling in MYC Driven Medulloblastoma. *Oncotarget* **2014**, *5*, 2355–2371, doi:10.18632/oncotarget.1659.
451. Zuber, J.; Shi, J.; Wang, E.; Rappaport, A.R.; Herrmann, H.; Sison, E.A.; Magoon, D.; Qi, J.; Blatt, K.; Wunderlich, M.; et al. RNAi Screen Identifies Brd4 as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukaemia. *Nature* **2011**, *478*, 524–528, doi:10.1038/nature10334.
452. Mertz, J.A.; Conery, A.R.; Bryant, B.M.; Sandy, P.; Balasubramanian, S.; Mele, D.A.; Bergeron, L.; Sims, R.J. Targeting MYC Dependence in Cancer by Inhibiting BET Bromodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 16669–16674, doi:10.1073/pnas.1108190108.
453. Koravović, M.; Kovačević, M.; Jovanović, M.; Tasić, G.; Mayasundari, A.; Nishiguchi, G.; Marković, B.; Ranković, Z.; Savić, V. Comparative in Silico/in Vitro Analysis of Pharmacokinetic Profiles of BET Inhibitors. *J. Serbian Chem. Soc.* **2025**, *90*, 837–856.
454. ADMETlab 2.0 Available online: <https://admetmesh.scbdd.com/explanation/index> (accessed on 31 March 2026).
455. Sun, H.; Chow, E.C.; Liu, S.; Du, Y.; Pang, K.S. The Caco-2 Cell Monolayer: Usefulness and Limitations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 395–411, doi:10.1517/17425255.4.4.395.
456. Didziapetris, R.; Japertas, P.; Avdeef, A.; Petrauskas, A. Classification Analysis of P-Glycoprotein Substrate Specificity. *J. Drug Target.* **2003**, *11*, 391–406, doi:10.1080/10611860310001648248.
457. Oncoethix GmbH, a subsidiary of Merck & Co., Inc. (Rahway, New Jersey USA) *A Phase Ila Trial With Dose Optimization of OTX015, a Small Molecule Inhibitor of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Proteins, in Recurrent Glioblastoma Multiforme (GBM) Patients*; clinicaltrials.gov, 2021;
458. Gonzalez-Carter, D.A.; Ong, Z.Y.; McGilvery, C.M.; Dunlop, I.E.; Dexter, D.T.; Porter, A.E. L-DOPA Functionalized, Multi-Branched Gold Nanoparticles as Brain-Targeted Nano-Vehicles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2019**, *15*, 1–11, doi:10.1016/j.nano.2018.08.011.

7. ПРИЛОЗИ

7.1. Одобрење за коришћење резултата добијених кроз сарадњу са *St. Jude Children's Research Hospital*



Aseem Ansari, PhD
Chair and Faculty Member
Chemical Biology and Therapeutics
t 901.595.5714 f 901.595.5715
aseem.ansari@stjude.org

December 5, 2025

AUTHORIZATION FOR USE OF COLLABORATIVE RESEARCH DATA IN DOCTORAL DISSERTATION

This statement confirms that Mladen Koravovic, PhD candidate at the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, collaborated with researchers at St. Jude Children's Research Hospital, Department of Chemical Biology & Therapeutics, throughout his doctoral studies. His research included both work conducted during his visit to St. Jude and data generated through continued scientific collaboration between St. Jude and the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy.

I hereby authorize the inclusion of the collaboratively generated research results – specifically physicochemical, ADME, and biological characterization of PROTAC and HyT molecules targeting HSP90, as well as JQ1-derived BET inhibitors – in his doctoral dissertation. This authorization is provided to satisfy the requirement of the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy regarding the use of research data obtained through work conducted abroad or obtained through international collaboration.

I confirm that, to the best of my knowledge, the inclusion of these data in the dissertation does not violate any confidentiality obligations or institutional restrictions.

Aseem Z. Ansari

R. J. Ulrich Endowed Chair,
Chair, Department of Chemical Biology and Therapeutics
St. Jude Children's Research Hospital <https://www.stjude.org/ansari>

Founder & Director,
Khorana Program & S. N. Bose Program (Winstep Forward: www.winstepforward.org)

Finding cures. Saving children.

7.2. Оригинални извештај о фармакокинетичком профилисању једињења (85) у *in vivo* условима



Sai Life Sciences Limited

PHARMACOKINETIC REPORT

Study Number: SAIDMPK/PK-22-07-0639

Study Title

Pharmacokinetics and Bioavailability study of MK-885-2 Following a Single Intravenous Administration at 1 mg/kg and Oral Administration at 3 and 10 mg/kg in Female CD1 Mice

Sponsor

Anand Mayasundari, PhD
Chemical Biology Center
Chemical Biology and Therapeutics
St. Jude Children's Research Hospital
Mailstop 1000, Room E9011, 262 Danny Thomas Place
Memphis, TN 38105
Tel. 901-595-5992; Fax. 901-595-5715
Anand.Mayasundari@STJUDE.ORG

Test Facility

DMPK, Sai Life Sciences Pvt. Ltd.,
Biological Sciences Block, Plot No. DS-16
IKP Knowledge Park,
Survey No. 234/2, 234/3 and 235/2,
Turkpally village, Shamirpeth Mandal,
Medchal-Malkajgiri district,
Telangana, 500078

Date of Completion of Report: Jul 2022

Confidential

This is a **CONFIDENTIAL** document. Any distribution beyond the parties listed within must be authorized by the sponsoring or requisitioning company/function. Reference to this document should only be made in documents having the same or a higher security classification.

CONTENTS

CONTENTS.....2

LIST OF TABLES3

LIST OF FIGURES4

LIST OF ABBREVIATIONS.....5

SUMMARY6

1.0 STUDY OBJECTIVE.....8

2.0 STUDY PERSONNEL8

3.0 COMPLIANCE and ANIMAL WELFARE.....8

4.0 MATERIAL AND METHOD8

4.1 Test Item.....8

4.2 Test System8

4.3 Study Design9

4.4 Formulation Preparation.....9

4.5 Formulation Analysis Results10

4.6 Clinical Observations10

4.7 Sample Collection11

4.8 Bioanalysis11

5.0 DATA ANALYSIS.....11

6.0 RESULTS11

7.0 DATA ARCHIVING12

8.0 REFERENCE.....12

9.0 ANNEXURE I17

LIST OF TABLES

Table 1: Pharmacokinetic data of MK-885-2 following a single intravenous administration at 1 mg/kg and oral administration at 3 and 10 mg/kg in female CD1 mice 13

Table 2: Individual plasma concentration-time data of MK-885-2 following a single intravenous administration at 1 mg/kg in female CD1 mice 14

Table 3: Individual plasma concentration-time data of MK-885-2 following a single oral administration at 3 mg/kg in female CD1 mice 14

Table 4: Individual plasma concentration-time data of MK-885-2 following a single oral administration at 10 mg/kg in female CD1 mice 15

LIST OF FIGURES

Figure 1: Mean plasma concentrations-time profiles of MK-885-2 following a single intravenous administration at 1 mg/kg and oral administration at 3 and 10 mg/kg in female CD1 mice 16

LIST OF ABBREVIATIONS

AUC	Area under the plasma concentration-time profile
C _{max}	Peak plasma concentrations
CL	Clearance
Conc.	Concentration(s)
CPCSEA	Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals
CV	Coefficient of Variation
°C	Degree Celsius
DMPK	Drug Metabolism and Pharmacokinetics
g	gram
hr	hour
K ₂ -EDTA	Di-potassium Ethylenediaminetetra acetic acid
kg	kilo-gram
IAEC	Institutional Animal Ethics Committee
IV	Intravenous
IS	Internal Standard
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LLOQ	Lower limit of quantitation
mg	Milligram
min	Minute
mL	Milliliter
μL	Microliter
NA	Not applicable
NMP	N-methyl pyrrolidone
ng	Nano-gram
PO	Per oral
rpm	Rotations per minute
SD	Standard Deviation
SOP	Standard Operating Procedure
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
V _{ss}	Volume of distribution
T _{max}	Time to reach peak plasma concentration
T _{1/2}	Terminal Plasma half life
%F	Percent bioavailability

SUMMARY

The objective of this study was to investigate the plasma pharmacokinetic and bioavailability study of MK-885-2 in female CD1 mice following a single intravenous administration at 1 mg/kg and oral administration at 3 and 10 mg/kg. Total twenty seven mice (n=9/group) were divided in to two groups as Group 1, Group 2 and Group 3 with sparse sampling design (3 mice/time points). Animals in Group 1 were administered intravenously as slow bolus injection through tail vein and animals in Group 2 and Group 3 were administered through oral route with solution formulation of MK-885-2 at 1, 3 and 10 mg/kg respectively. The formulation vehicle was 5% v/v NMP, 5% v/v Solutol HS-15 and 90% v/v Normal saline.

Blood samples (approximately 60 µL) were collected under light isoflurane anesthesia (Surgivet®) from retro orbital plexus from a set of three mice at 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hr for IV and 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hr for PO. Immediately after blood collection, plasma was harvested by centrifugation at 4000 rpm, 10 min at 4°C and samples were stored at -70±10°C until bioanalysis.

All samples were processed for analysis by protein precipitation method and analyzed with fit-for-purpose LC-MS/MS method (LLOQ = 1.00 ng/mL). The plasma pharmacokinetic parameters were estimated using non-compartmental analysis tool of Phoenix® WinNonlin software (Ver 8.3) and parameters are summarized below:

Route	Dose (mg/kg)	T _{max} (hr)	^a C ₀ /C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	T _{1/2} (hr)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	%F
IV	1	NA	1931.29	1567.13	1.54	10.62	0.77	NA
PO	3	1.00	1555.30	3275.41	-	-	-	70
PO	10	0.50	3155.57	9472.95	-	-	-	60

a – Back extrapolated concentration in IV group.

Following a single intravenous administration of MK-885-2 in female CD1 mice at 1 mg/kg dose, compound showed low plasma clearance (12% of the normal liver blood flow in mice: 90 mL/min/kg) and moderate V_{ss} (approximately equal to the normal volume of distribution, 0.7 L/kg) with terminal elimination half-life of 1.54 hr.

Following a single oral dose administration of MK-885-2 in female CD1 mice at 3 and 10 mg/kg, peak plasma concentrations were observed at 1 and 0.5 hr,

Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

suggesting rapid absorption. The oral bioavailability was found to be 70% and 60% with solution-based formulation.

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

1.0 STUDY OBJECTIVE

To determine the plasma pharmacokinetics and bioavailability study of MK-885-2 following a single intravenous at 1 mg/kg dose and oral at 3 and 10 mg/kg dose administration in female CD1 mice

2.0 STUDY PERSONNEL

Study Director :	Ajit Gadekar, M. Pharm.
Formulation:	Sushmita Gaikwad, M. Pharm.
In-Life Phase:	Pavan Kumar Naik, M. Pharm. Datta Gore, M. Pharm. Ranjeeth K, M. Pharm.
Bioanalysis:	Srikant Jadhav, M. Pharm.
Data Analysis and Report	Bhanuchander Ellendula, M. Pharm.
QC By	Vishal Pathade. M. Pharm.

3.0 COMPLIANCE and ANIMAL WELFARE

The study was conducted at AAALAC accredited facility of Sai Life Sciences Limited, Hyderabad, India, in accordance with the Study Protocol SAIDMPK/PK-22-07-0639. All procedures of the present study were in accordance with the guidelines provided by the Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals (CPCSEA) as published in The Gazette of India, December 15, 1998. Prior approval of the Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) was obtained before initiation of the study. The study was conducted as non-GLP; however all appropriate documentation were maintained in study file.

4.0 MATERIAL AND METHOD

4.1 Test Item

The test item MK-885-2; Batch no-2; Mol. Wt: 484.00, Purity: 98.97% was received from sponsor.

4.2 Test System

Healthy female CD1 mice (6-12 weeks old) weighing between 20 to 35 g were procured from Hylasco, India. Three mice were housed in each cage. Temperature and humidity were maintained at 22 ± 3 °C and 30-70%, respectively and illumination was controlled to give a sequence of 12 hr light and 12 hr dark cycle. Temperature and humidity were recorded by auto-controlled data logger system. All

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

the animals were provided laboratory rodent diet (Altromin, Germany). Reverse osmosis water treated with ultraviolet light was provided *ad libitum*.

4.3 Study Design

Total twenty seven mice (n=9/group) were divided in to two groups as Group 1, Group 2 and Group 3 with sparse sampling design (3 mice/time points). Animals in Group 1 were administered intravenously as slow bolus injection through tail vein and animals in Group 2 and Group 3 were administered through oral route with solution formulation of MK-885-2 at 1, 3 and 10 mg/kg respectively. The formulation vehicle was 5% v/v NMP, 5% v/v Solutol HS-15 and 90% v/v Normal saline. The assignment of animals was shown in the table below:

Group	Route	Dose (mg/kg)	Matrix	Animal ID
Group 1	IV	1	Plasma	1-9
Group 2	PO	3	Plasma	10-18
Group 3	PO	10	Plasma	19-27

4.4 Formulation Preparation

Stock Preparation (20 mg/mL NMP stock) : 10.96 mg compound was received from the client, which was corrected for purity and 0.543 mL of NMP was added to obtain 20 mg/mL strength.

IV (0.2 mg/mL): Accurately 0.040 mL of MK-885-2 NMP stock solution (20 mg/mL) was added in a labeled bottle, to this 0.160 mL of NMP was added and vortexed. A volume of 0.200 mL of Solutol HS-15 and 3.600 mL of Normal saline was added slowly and vortexed. The final formulation was vortexed for 2 minutes to get clear solution. The amount weighed and calculation details are as below:

Ingredients	% content	Quantity
MK-885-2 (NMP Stock 20 mg/mL)		0.040 mL
NMP	5	0.160 mL
Solutol HS-15	5	0.200 mL
Normal saline	90	3.600 mL

PO (0.3 mg/mL): Accurately 0.060 mL of MK-885-2 NMP stock solution (20 mg/mL) was added in a labeled bottle, to this 0.140 mL of NMP was added and vortexed. To this a volume of 0.200 mL of Solutol HS-15 and 3.600 mL of Normal

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

saline was added slowly and vortexed. The final formulation was vortexed for 2 minutes to get clear solution. The amount weighed and calculation details are as below:

Ingredients	% content	Quantity
MK-885-2 (NMP Stock 20 mg/mL)	5	0.060 mL
NMP		0.140 mL
Solutol HS-15	5	0.200 mL
Normal saline	90	3.600 mL

PO (1 mg/mL): Accurately 0.200 mL of MK-885-2 NMP stock solution (20 mg/mL) was added in a labeled bottle. To this a volume of 0.200 mL of Solutol HS-15 and 3.600 mL of Normal saline was added slowly and vortexed. The final formulation was vortexed for 2 minutes to get clear solution. The amount weighed and calculation details are as below:

Ingredients	% content	Quantity
MK-885-2 (NMP Stock 20 mg/mL)	5	0.200 mL
Solutol HS-15	5	0.200 mL
Normal saline	90	3.600 mL

4.5 Formulation Analysis Results

After preparation of formulations, a volume of 200 µL was aliquot for analysis. The formulations were analyzed and found to be within the acceptance criteria (in-house acceptance criteria is $\pm 20\%$ from the nominal value). Formulations were prepared freshly prior to dosing.

Compound	Theoretical Conc. (mg/mL)	Conc. Found (mg/mL)	% Change
MK-885-2	0.20	0.207	3.69
	0.30	0.323	7.50
	1.00	1.108	10.76

4.6 Clinical Observations

Following a single intravenous at 1 mg/kg dose and oral at 3 and 10 mg/kg dose administration of MK-885-2, all the animals were normal without any clinical signs.

4.7 Sample Collection

Blood samples (approximately 60 μ L) were collected under light isoflurane anesthesia (Surgivet®) from retro orbital plexus from a set of three mice at 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hr for IV and 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hr for PO. Immediately after blood collection, plasma was harvested by centrifugation at 4000 rpm, 10 min at 4⁰C and samples were stored at -70 \pm 10⁰C until bioanalysis.

4.8 Bioanalysis

Concentrations of MK-885-2 in mouse plasma samples were determined by fit for purpose LC-MS/MS method. The sample processing and extraction procedure, chromatographic and mass spectrometric conditions were presented in Annexure I.

5.0 DATA ANALYSIS

Non-Compartmental-Analysis tool of Phoenix WinNonlin® (Version 8.3) was used to assess the pharmacokinetic parameters. Peak plasma concentration (C_{max}) and time for the peak plasma concentration (T_{max}) were the observed values. The areas under the concentration time curve (AUC_{last} and AUC_{inf}) were calculated by linear trapezoidal rule. The terminal elimination rate constant, k_e was determined by regression analysis of the linear terminal portion of the log plasma concentration-time curve. Clearance was estimated as $Dose/AUC_{inf}$ and V_{ss} as $CL * MRT$. The oral bioavailability was calculated as ratio of dose normalized AUC of oral and intravenous group multiplied by 100.

6.0 RESULTS

Following a single intravenous administration of MK-885-2 in female CD1 mice at 1 mg/kg dose, compound showed low plasma clearance (12% of the normal liver blood flow in mice: 90 mL/min/kg) and moderate V_{ss} (approximately equal to the normal volume of distribution, 0.7 L/kg) with terminal elimination half-life of 1.54 hr.

Following a single oral dose administration of MK-885-2 in female CD1 mice at 3 and 10 mg/kg, peak plasma concentrations were observed at 1 and 0.5 hr, suggesting rapid absorption. The oral bioavailability was found to be 70% and 60% with solution-based formulation.

7.0 DATA ARCHIVING

All raw data, study protocol, and final report were documented and will be archived. The materials (hard and soft copies) will be retained for 1 year from the date of approval of final report. Thereafter, the archived material will be destroyed.

8.0 REFERENCE

Study Protocol number: SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Table 1: Pharmacokinetic data of MK-885-2 following a single intravenous administration at 1 mg/kg and oral administration at 3 and 10 mg/kg in female CD1 mice

Route	Dose (mg/kg)	T _{max} (hr)	^a C ₀ /C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	T _{1/2} (hr)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (L/kg)	%F
IV	1	NA	1931.29	1567.13	1.54	10.62	0.77	NA
PO	3	1.00	1555.30	3275.41	-	-	-	70
PO	10	0.50	3155.57	9472.95	-	-	-	60

a – Back extrapolated concentration at time zero in IV group.

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Table 2: Individual plasma concentration-time data of MK-885-2 following a single intravenous administration at 1 mg/kg in female CD1 mice

Animal ID	Plasma Concentration (ng/mL)								
	Time (hr)								
	0.08	0.25	0.5	1	2	4	8	12	24
1	1663.10			315.50			4.00		
2	1926.00			510.20			6.50		
3	1047.50			411.90			5.30		
4		1031.90			138.80			1.30	
5		930.90			125.60			1.10	
6		925.00			328.70			BLQ	
7			811.70			42.90			BLQ
8			879.10			47.00			BLQ
9			978.20			41.60			BLQ
Mean	1545.53	962.6	889.67	412.53	197.7	43.83	5.27	1.20^d	NA
SD	450.90	60.09	83.75	97.35	113.64	2.82	1.25	NA	NA
%CV	29	6	9	24	57	6	24	NA	NA

LLOQ = 1.00 ng/mL; NA: Not Applicable; BLQ: Below limit of quantitation

d-Average of two values reported, considered in graph and data analysis

Table 3: Individual plasma concentration-time data of MK-885-2 following a single oral administration at 3 mg/kg in female CD1 mice

Animal ID	Plasma concentration (ng/mL)								
	Time (h)								
	0.25	0.5	1	2	4	8	12	24	
10	869.30			709.90			1.50		
11	704.40			502.40			1.50		
12	784.50			445.60			6.10		
13		1801.30			80.90				BLQ
14		1711.80			174.90				1.00
15		966.10			129.00				4.50
16			639.50			13.50			
17			2284.90			2.40			
18			1741.50			57.60			
Mean	786.07	1493.07	1555.30	552.63	128.27	24.50	3.03	2.75^d	
SD	82.46	458.56	838.35	139.13	47.00	29.2	2.66	2.47	
%CV	10	31	54	25	37	119	88	90	

LLOQ = 1.00 ng/mL; BLQ- Below limit of quantitation; NA- Not applicable;

d-Average of two values reported, considered in graph and data analysis

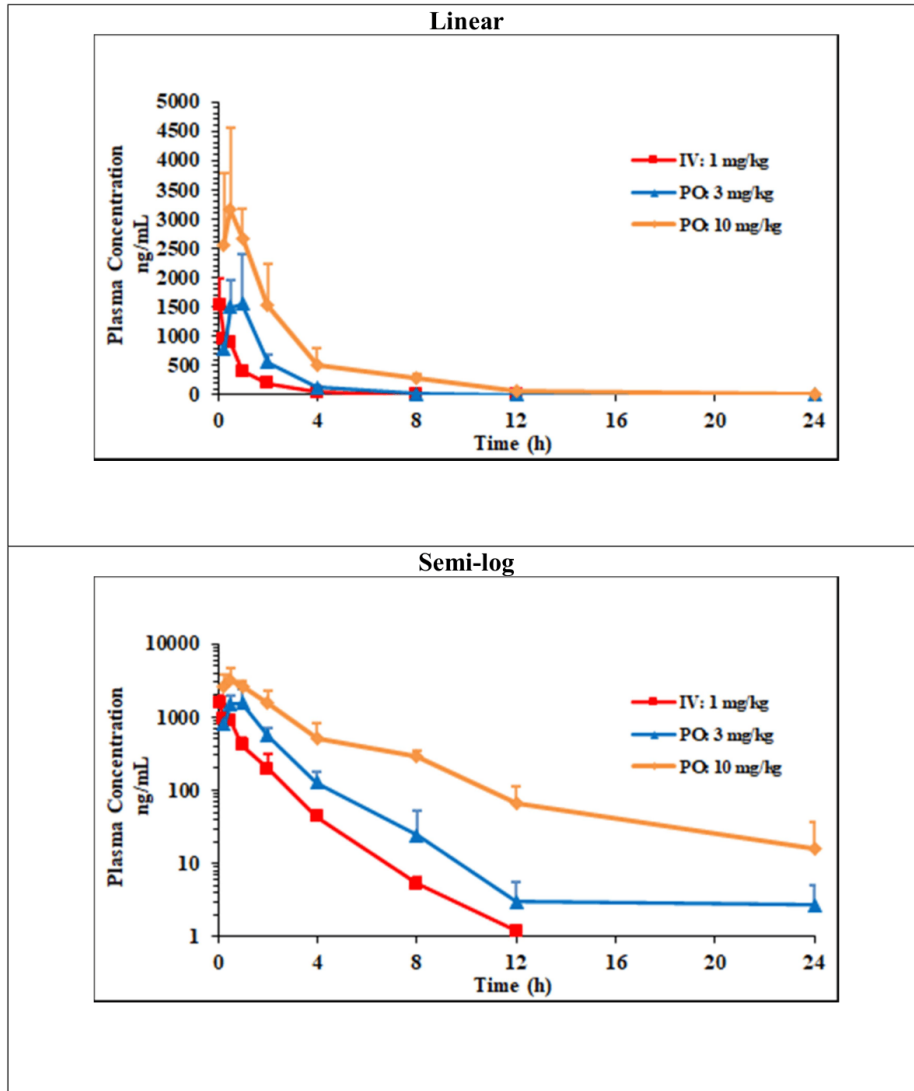
Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Table 4: Individual plasma concentration-time data of MK-885-2 following a single oral administration at 10 mg/kg in female CD1 mice

Animal ID	Plasma concentration (ng/mL)							
	Time (h)							
	0.25	0.5	1	2	4	8	12	24
19	2910.60			1238.30			123.50	
20	1230.90			1013.10			37.70	
21	3564.80			2333.80			40.60	
22		3703.30			675.50			30.9
23		4207.50			692.10			BLQ
24		1555.90			170.30			1.10
25			2076.30			342.40		
26			3066.30			315.40		
27			2814.70			237.30		
Mean	2568.77	3155.50	2652.43	1528.40	512.63	298.37	67.27	16.00^d
SD	1203.91	1408.10	514.56	706.53	296.59	54.58	48.72	21.07
%CV	47	45	19	46	58	18	72	132

LLOQ = 1.00 ng/mL; BLQ- Below limit of quantitation; NA- Not applicable; d-Average of two values reported, considered in graph and data analysis

Figure 1: Mean plasma concentrations-time profiles of MK-885-2 following a single intravenous administration at 1 mg/kg and oral administration at 3 and 10 mg/kg in female CD1 mice



9.0 ANNEXURE I

Bioanalytical Summary

LC conditionsMobile Phase

A: 0.1% Formic acid in Acetonitrile

B: 0.1% Formic acid in Water

Column : Acquity BEH C18, 50 X 2.1 mm, 1.7 µm

Injection Volume (µL) : 1

Column Oven Temperature (°C) : 45

Retention Time (in min) : Analyte: MK-885-2 : 1.18

IS: Cetrizine: 1.15

LC Gradient Used

Time (Minutes)	Flow Rate (mL/min)	PUMP A (% Conc)	PUMP B (% Conc)
Initial	0.5	2	98
0.50	0.5	2	98
0.80	0.5	98	2
1.60	0.5	98	2
1.80	0.5	2	98
2.20	0.5	2	98

Mass Conditions

Analyte ID / IS ID	Q1	Q3	Cone	eV	Dwell time (msec)
MK-885-2	484.01	177.08	22	66	0.019
Cetrizine	389.13	200.95	10	20	0.027

MRM Transitions:**Source Parameter:**

Polarity	Positive
Cone Voltage	30
Cone Gas Flow(L/hr)	150
Nebulliser Gas Flow(L/hr)	7.00
Desolvation Gas Flow(L/hr)	1000
Capillary Voltage(kV)	3.36
Desolvation Temperature	600

Source Temperature	150
--------------------	-----

Extraction Procedure:

The extraction procedure for plasma samples and the spiked plasma calibration standards were identical:

A 20 μ L of study sample plasma or spiked plasma calibration standard was added to individual pre-labeled micro-centrifuge tubes followed by 200 μ L of internal standard prepared in acetonitrile (Cetirizine, 50 ng/mL) was added except for blank, where 200 μ L of acetonitrile was added. Samples were vortexed for 5 minutes. Samples were centrifuged for 10 minutes at a speed of 4000 rpm at 4 °C. Following centrifugation, 200 μ L of clear supernatant was transferred in 96 well plates and analyzed using LC-MS/MS

Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Representative chromatogram of blank mouse plasma in the LC-MS/MS analysis of MK-885-2.

Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

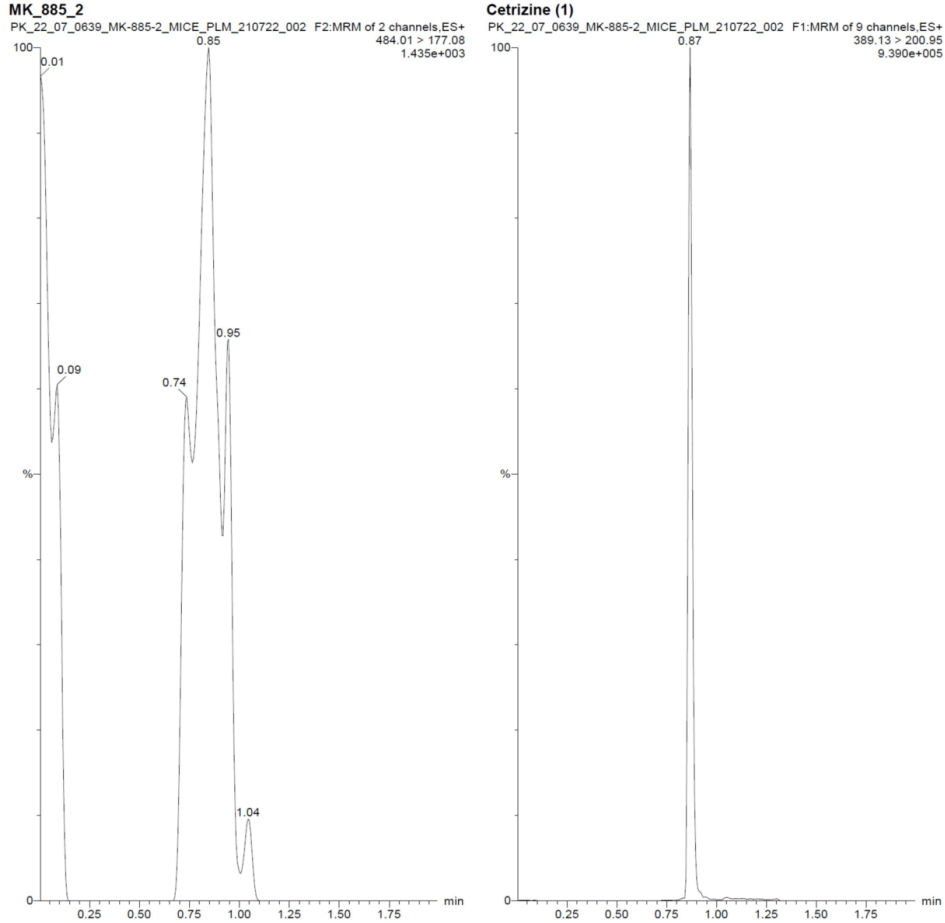
Quantify Sample Report MassLynx V4.2 SCN1012 Page 1 of 140
SAI LIFE SCIENCES LTD

Dataset: Z:\St Jude_2022.PRO\PeakDB\PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722.qld

Last Altered: Friday, July 22, 2022 11:00:40 India Standard Time
Printed: Friday, July 22, 2022 11:19:25 India Standard Time

Method: D:\Projects\St Jude_2022.PRO\MethDB\MK_885_210722.mdb 22 Jul 2022 11:00:35
Calibration: 22 Jul 2022 11:00:40

ID: MK_885_2_MICE_PLM_BLK_D, Date: 21-Jul-2022



Representative LC-MS/MS chromatogram of MK-885-2. LLOQ standard and Cetrizine (IS) in mouse plasma

Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Quantify Sample Report MassLynx V4.2 SCN1012
SAI LIFE SCIENCES LTD

Page 5 of 140

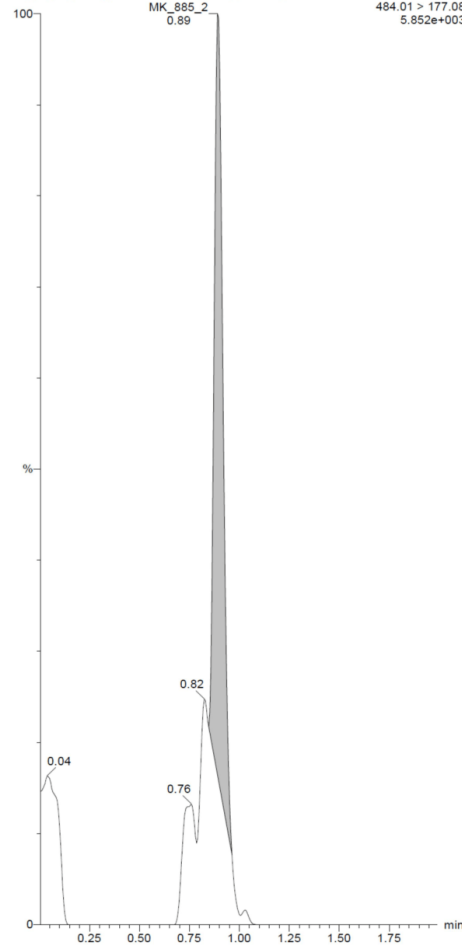
Dataset: Z:\St Jude_2022.PRO\PeakDB\PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722.qld

Last Altered: Friday, July 22, 2022 11:00:40 India Standard Time
Printed: Friday, July 22, 2022 11:19:25 India Standard Time

ID: MK_885_2_MICE_PLM_CS_01, Date: 21-Jul-2022

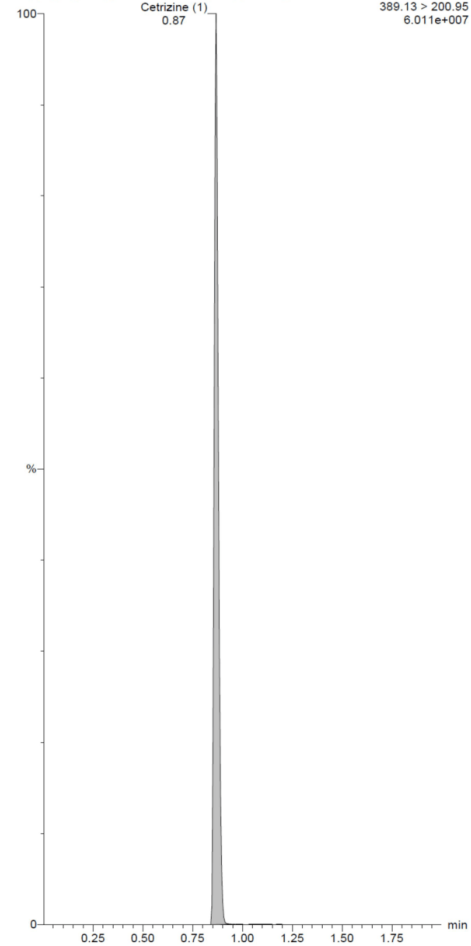
MK_885_2

PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722_006 F2:MRM of 2 channels.ES+
484.01 > 177.08
5.852e+003



Cetizine (1)

PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722_006 F1:MRM of 9 channels.ES+
389.13 > 200.95
6.011e+007



Representative LC-MS/MS chromatogram of MK-885-2 ULOQ standard and Cetizine (IS) in mouse plasma

Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Quantify Sample Report **MassLynx V4.2 SCN1012**
SAI LIFE SCIENCES LTD

Page 16 of 140

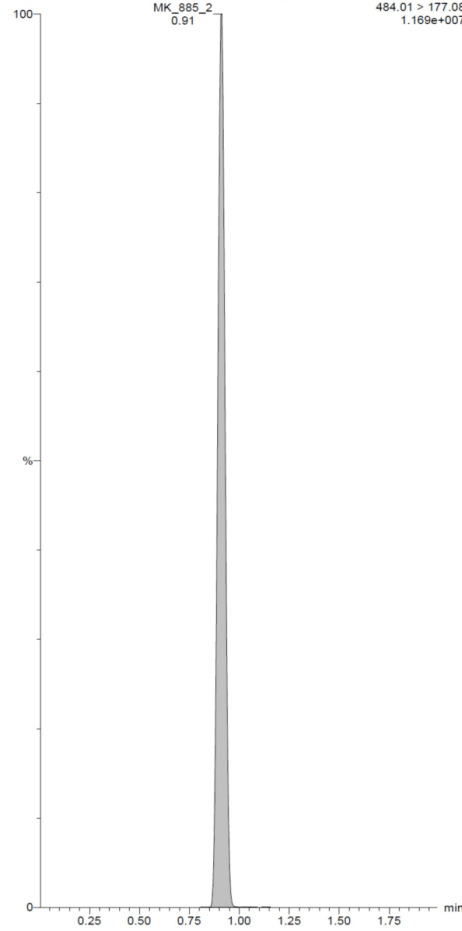
Dataset: Z:\St Jude_2022.PRO\PeakDB\PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722.qld

Last Altered: Friday, July 22, 2022 11:00:40 India Standard Time
Printed: Friday, July 22, 2022 11:19:25 India Standard Time

ID: MK_885_2_MICE_PLM_CS_11, Date: 21-Jul-2022

MK_885_2

PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722_017 F2:MRM of 2 channels,ES+
484.01 > 177.08
1.169e+007



Cetizine (1)

PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722_017 F1:MRM of 9 channels,ES+
389.13 > 200.85
6.286e+007



Representative LC-MS/MS chromatogram of MK-885-2 study sample (mouse plasma) and Cetizine (IS)

Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Quantify Sample Report
SAI LIFE SCIENCES LTD

MassLynx V4.2 SCN1012

Page 55 of 140

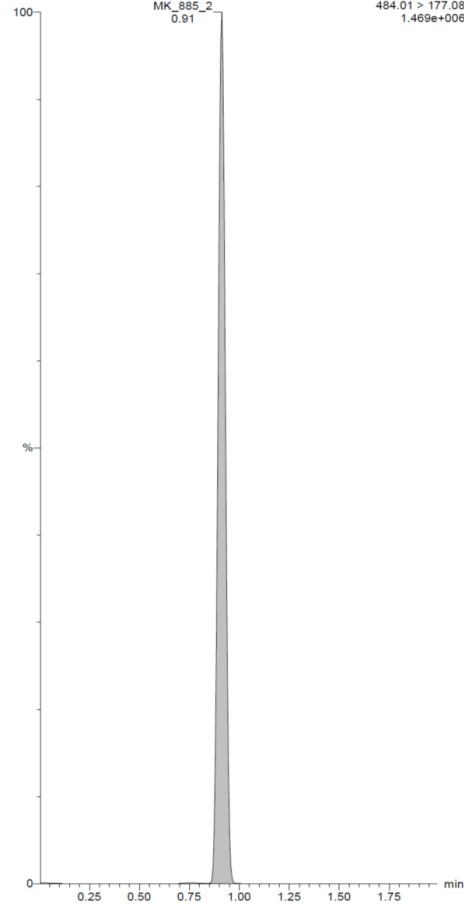
Dataset: Z:\St Jude_2022.PRO\PeakDB\PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722.qld

Last Altered: Friday, July 22, 2022 11:00:40 India Standard Time
Printed: Friday, July 22, 2022 11:19:25 India Standard Time

ID: MK_885_2_MICE_PLM_IV_1MPK_0.083 HR_3, Date: 21-Jul-2022

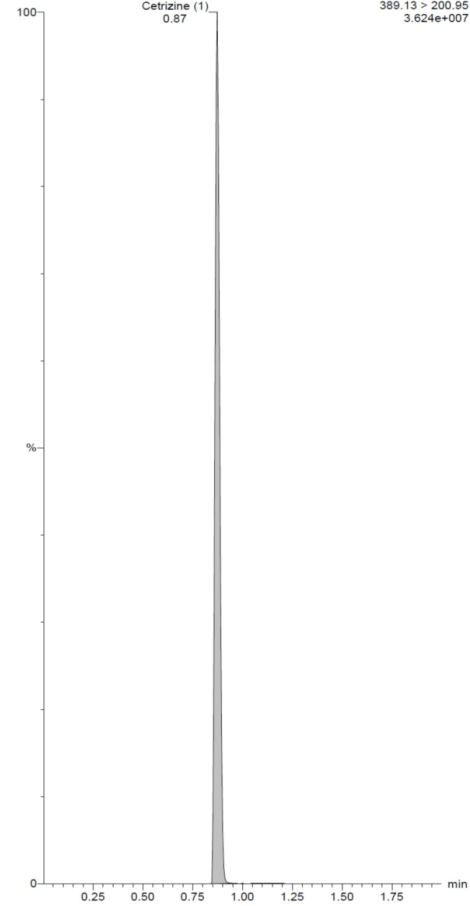
MK_885_2

PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722_056 F2:MRM of 2 channels.ES+
484.01 > 177.08
1.469e+006



Cetirizine (1)

PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722_056 F1:MRM of 9 channels.ES+
389.13 > 200.95
3.624e+007



Pharmacokinetic Report

Study No. SAIDMPK/PK-22-07-0639

Sponsor: St. Jude Children's Research Hospital

Calibration curve of MK-885-2 in mouse plasma

Quantify Calibration Report MassLynx V4.2 SCN1012
SAI LIFE SCIENCES LTD

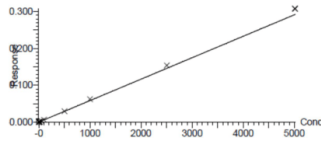
Page 1 of 1

Dataset: Z:\St_Jude_2022.PRO\PeakDB\PK_22_07_0639_MK-885-2_MICE_PLM_210722.qld

Last Altered: Friday, July 22, 2022 11:00:40 India Standard Time
Printed: Friday, July 22, 2022 11:18:30 India Standard Time

Method: D:\Projects\St_Jude_2022.PRO\MethDB\MK_885_210722.mdb 22 Jul 2022 11:00:35
Calibration: 22 Jul 2022 11:00:40

Compound name: MK_885_2
Correlation coefficient: $r = 0.994843$, $r^2 = 0.989713$
Calibration curve: $5.81825e-005 * x + 0.000165558$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



БИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Младен Д. Коравовић је рођен 29. септембра 1993. године у Књажевцу. Основну и средњу медицинску школу завршио је као носилац диплома „Вук Караџић“. Интегрисане академске студије, студијски програм *Фармација*, уписао је 2012. године на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету. У току студија је награђиван Годишњом наградом која се додељује најбољим студентима интегрисаних академских студија академске 2012/2013. (просечна оцена 9,91), 2013/2014. (просечна оцена 9,95), 2014/2015. (просечна оцена 9,97) и 2015/2016. године (просечна оцена 9,79). Факултет је завршио 1. марта 2018. године са просечном оценом 9,73 и 308 ЕСПБ одбраном завршног рада под називом „Квантитативни односи структуре и дејства инхибитора EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*)“ на Катедри за фармацеутску хемију. Након завршетка приправничког стажа за магистре фармације положио је стручни испит.

Докторске академске студије, модул *Фармацеутска хемија*, уписао је на Универзитету у Београду – Фармацеутском факултету под менторством проф. др Владимира Савића и проф. др Бојана Марковића. У оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије био је запослен прво као истраживач-приправник, а затим као истраживач-сарадник на Катедри за органску хемију. У периоду од 2.10.2022. до 24.11.2022. био је на студијском боравку у *St. Jude Children's Research Hospital* (Мемфис, САД) по основу Уговора о финансирању реализације научно-истраживачког Пројекта под називом „Design and synthesis of Hsp90 PROTAC degraders as potential anticancer agents“ (акроним: *DeSyHPRO*, евиденциони број: 6463913, руководилац: проф. др Владимир Савић), у оквиру Програма сарадње српске науке са дијаспором: ваучери за размену знања Фонда за науку Републике Србије.

У оквиру научно-истраживачког рада, Младен Коравовић је публикувао један рад у водећем међународном часопису категорије M21a, два рада у међународном часопису категорије M23, један рад у водећем националном часопису категорије M51 и имао једно саопштење на скупу националног значаја које је штампано у изводу (M64). Истраживачки интерес Младена Коравовића тиче се дизајна, синтезе и биолошке карактеризације молекула који индукују деградацију терапијски релевантних протеина.

РАДОВИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рад у водећем међународном часопису категорије M21a

Koravovic, M.; Mayasundari, A.; Tasic, G.; Keramatnia, F.; Stachowski, T.R.; Cui, H.; Chai, S.C.; Jonchere, B.; Yang, L.; Li, Y.; et al. From PROTAC to Inhibitor: Structure-Guided Discovery of Potent and Orally Bioavailable BET Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *251*, 115246, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115246.

IF (2023) = 6,0; област: *Chemistry, Medicinal* (8/72)

Рад у међународном часопису категорије M23

Koravović, M.; Kovačević, M.; Jovanović, M.; Tasić, G.; Mayasundari, A.; Nishiguchi, G.; Marković, B.; Ranković, Z.; Savić, V. Comparative in Silico/in Vitro Analysis of Pharmacokinetic Profiles of BET Inhibitors. *J. Serbian Chem. Soc.* **2025**, *90*, 837–856.

IF (2024) = 0,7; област: *Chemistry, Multidisciplinary* (201/239)

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Име и презиме аутора: Младен Коравовић

Број индекса: 17/2018

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

„Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 12.6.2026.

Потпис аутора

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора: Младен Коравовић

Број индекса: 17/2018

Студијски програм: Фармацеутска хемија

Наслов рада: Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и ВЕТ протеина

Ментори: др сц. Владимир Савић, редовни професор Катедре за органску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета и др сц. Бојан Марковић, редовни професор Катедре за фармацеутску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 12.6.2026.

Потпис аутора

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом

„Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и ВЕТ протеина“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве.)

У Београду, 12.6.2026.

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела и прераде ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела и прераде ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела и прераде ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела и прераде ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.