

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії  
Доктор хімічних наук, професор  
Рябухін Сергій Вікторович  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
Від «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**МАКРОЦИКЛІЧНІ ІНГІБІТОРИ PIN1**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студентки спеціальності  
102 хімія  
ОП «Хімія та наноматеріали»  
**Швець Вікторії Андріївни**

Науковий керівник, доктор хімічних наук, професор  
**Комаров Ігор Володимирович**  
Консультант, кандидат хімічних наук  
**Харченко Сергій Григорович**

**Робота виконана на базі  
ТОВ НВП «Єнамін»**

**Оцінка захисту роботи**

---

**Київ – 2022 р.**

## Анотація

### Випускна кваліфікаційна робота магістра

**Key words:** PIN1, inhibitor, peptidomimetic, cancerogenesis, neurodegenerative diseases, macrocycles, photopharmacology

Targeted drugs have changed cancer treatment but are often ineffective in the long term against solid tumors, largely because of the activation of heterogeneous oncogenic pathways. A central common signaling mechanism in many of these pathways is proline-directed phosphorylation of serine and threonine residues, which is regulated by many kinases and phosphatases. The structure and function of these phosphorylated proteins are further controlled by a single proline isomerase: PIN1. Also known, that PIN1 is overactivated in cancers and it promotes cancer and cancer stem cells by disrupting the balance of oncogenes and tumor suppressors.

In this work, we have analyzed known inhibitors, their advantages and disadvantages and also synthesized new PIN1 macrocyclic inhibitors for future research by the light. The isomer generated by visible light shows much stronger toxicity against tumor cells than the UV-generated isomer. That is why the peptidomimetic can be administered in the less toxic form and then activated locally in a solid tumor by visible light.

**Ключові слова:** PIN1, інгібітор, пептидоміметик, канцерогенез, нейродегенеративні захворювання, макроцикли, фотофармакологія

Таргетні препарати змінили лікування раку, але часто є неефективними проти пухлин через активацію гетерогенних онкогенних шляхів. Центральний механізм сигналінгу у багатьох цих шляхах спрямований на фосфорилування залишків серину і треоніну, що регулюється великою кількістю кіназ і фосфатаз. Структура та функції

фосфорильованих білків додатково контролюються однією з ізомераз – PIN1. Також відомо, що ензим PIN1 є надактивним при ракових захворюваннях, він сприяє раку і раковим стовбуровим клітинам, руйнуючи баланс онкогенів та супресорів пухлини.

В даній роботі були проаналізовані відомі інгібітори, їх переваги і недоліки, а також синтезовано нові макроциклічні інгібітори PIN1 для майбутніх досліджень активації світлом. Ізомер, що генерується видимим світлом демонструє набагато сильнішу токсичність проти пухлинних клітин, ніж ізомер, що утворюється під ультрафіолетом. Тому пептидоміметик можна вводити в менш токсичній формі і після цього локально активувати в пухлині видимим світлом.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ .....</b>	<b>6</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>9</b>
<b>1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Пептидил-проліл <i>цис-транс</i>-ізомераза PIN1 .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Відкриття PIN1 .....	13
1.1.2 Функції PIN1 .....	15
1.1.2.1 Як PIN1 каталізує <i>цис-транс</i> ізомеризацію pThr/pSer-Pro мотивів ? Чому саме їх? .....	16
1.1.3 Вплив активності PIN1 на розвиток нейродегенеративних хвороб. 18	
1.1.3.1 PIN1 та хвороба Альцгеймера .....	19
1.1.3.2 PIN1 і тау-білок.....	20
1.1.3.3 PIN1 і хвороба Паркінсона .....	21
1.1.4 Роль PIN1 в регуляції клітинного циклу .....	21
1.1.5 Вплив активності PIN1 на утворення/розвиток раку .....	23
1.1.6 Будова PIN1 .....	25
1.1.7 Проблеми при дослідженні PIN1 .....	31
<b>1.2 Інгібітори PIN1 .....</b>	<b>32</b>
1.2.1 Невеликі молекули-інгібітори .....	32
1.2.2 Лінійні пептиди-інгібітори .....	36
1.2.3 Циклічні пептиди-інгібітори .....	39
1.2.4 Біциклічні пептиди-інгібітори.....	41
1.2.5 Проблеми існуючих інгібіторів.....	42

<b>1.3. Лікарські засоби на основі пептидів та їх дія на організм.....</b>	<b>44</b>
1.3.1 Чому пептиди є цікавими для медичної хімії ? .....	44
1.3.2 Фотодинамічна терапія .....	46
1.3.3 Фотофармакологія.....	49
1.3.4 Побудова фотофармакологічного лікарського засобу.....	53
1.3.5 Фотоперемикаючі матеріали.....	54
<b>2 РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>59</b>
2.1 Створення циклопептидів з високою біологічною активністю – нових потенційних інгібіторів .....	59
2.2 Синтез макроциклів – інгібіторів.....	60
2.3 Аналіз отриманих сполук .....	63
2.4 Синтез пептидів з фотосвіч-елементом.....	66
<b>3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 Методики експерименту .....</b>	<b>68</b>
3.1.1 Методика етерифікації першої амінокислоти на смолу .....	68
3.1.2 Методика зняття захисної групи Fmoc.....	69
3.1.3 Методика активації та конденсації амінокислот.....	69
3.1.4 Методика моніторингу каплінгу амінокислот.....	70
3.1.5 Методика процедури зняття пептидів зі смол («cleavage») .....	70
3.1.6 Методика циклізації пептидів.....	71
3.1.7 Методика депротекції циклічного пептиду .....	71
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>72</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>73</b>
<b>ДОДАТКИ .....</b>	<b>80</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

AD - (з англ. *Alzheimer's disease*) – хвороба Альцгеймера

ADME – аббревіатура у фармакокінетиці та фармакології, основні літери якої означають “absorption – всмоктування, distribution - розподіл, metabolism - метаболізм, elimination- виведення”

Ala - аланін

Arg – аргінін

АЦ - активний центр білка

APP - аберрантний білок-попередник амілоїду

BT-474 - лінія клітин, яка отримана з пухлини раку молочної залози

Bis-Phe-Ala – бісфеніл-аланін

Cdc25 - білок, подвійна специфічна фосфатаза, дефектний мутант клітинного циклу

Cys - цистеїн

DAE - диарилетилен

DCM - дихлорметан

DIPEA - диізопропілетиламін

DMF - диметилформамід

FDT – фотодинамічна терапія

Fmoc - 9 –флуоренілметоксикарбоніл

FKPB (FK506 binding protein) – родина білків, що мають активність проліл ізомерази та пов’язані з циклофілінами

HBTU–N-[(1H-бензотриазол-1-іл)(диметиламіно)метилен]-N-метилметанамініум гексафлуорофосфат N-оксид

HD - (з англ. *Huntington's disease*) – хвороба Хантінгтона

HeLa - лінія «безсмертних» клітин, що використовується в наукових дослідженнях, отримана з ракової пухлини шийки матки.

His - гістидин

NOBt - 1-гідроксибензотріазол

HPLC - високопродуктивна рідинна хроматографія (рідинна хроматографія високого тиску)

HSQC NMR - двовимірна ядерна магнітно-резонансна спектроскопія ефективності ліганду при інгібуючій біохімічній або біологічній взаємодії

IC<sub>50</sub> - концентрація напівмаксимального інгібування, показник

K<sub>D</sub> – константа дисоціації комплексу мішень-інгібітор

K<sub>i</sub> - константа інгібування біологічно-активної речовини

LCMS - рідинна хроматографія — мас-спектрометрія

Leu - лейцин

Lys - лізин

NFT - внутрішньоклітинні нейрофібрилярні клубочки

Trp - триптофан

Tau - білок, належить до групи білків, асоційованих з мікротрубочками

TFA - трифтороцтова кислота

TFE - трифторетанол

TIS - триізопропілсілан

Thr - треонін

ТФПС - твердофазовий пептидний синтез

Ser - серин

PD - (з англ. *Parkinson's disease*) – хвороба Паркінсона

PyBOP - (бензотріазол-1-локсі) трипірролідінофосфоніум гексафлуорофосфат

Pro - пролін

PIN1 - пептидил-проліл цис-транс-ізомераза, кодується геном Pin1 PPI-аза - пептидил-проліл цис-транс-ізомераза

PyMOL - комп'ютерне програмне забезпечення, система молекулярної візуалізації

Orn - орнітин

Циклін D1 - білок, що кодується однойменним геном, задіяний у процесах транскрипції, регуляція транскрипції, клітинний цикл, пошкодження ДНК

ЛЗ – лікарський засіб

## ВСТУП

Основна ідея медичної хімії була сформульована ще на початку ХХ століття Полом Ерліхом, котру він тоді назвав «магічною кулею». Так вчений охарактеризував мрію-препарат, який при введенні у організм хворого сам знайде мішень та знешкодить збудника хвороби, при цьому не завдаючи шкоди пацієнту. Саме пошук нетоксичних для людини препаратів, які могли б ефективно боротися з хворобою, ставить перед собою сучасна медична хімія.

Сьогодні все більше людей стикаються з раком та нейродегенеративними хворобами. Згідно із статистичними даними, більше 54 млн людей страждають на хвороби Альцгеймера та Паркінсона. Але ці дані не враховують тих, у кого їх не виявили через обмеженість методів діагностування на ранніх стадіях захворювання. Якщо говорити про ракові хвороби, то цифра зростає в рази, адже щороку в світі понад 10 млн людей помирає, а 14,1 млн дізнаються про наявність цієї страшної недуги. Щодо України, то в 2019 році смертність складала 99217 осіб, що складає 14,1% від загальної кількості смертей. Найпоширенішими (з точки зору нових випадків) були рак молочної залози, легенів, товстої та прямої кишки, простати, шкіри, шлунка. При цьому найбільше смертей в 2020-му році було зафіксовано внаслідок захворювання на рак легенів. Для вирішення цих проблем в світі виділяються колосальні кошти, але ліків, що допоможуть у боротьбі з даними хворобами ще не було знайдено. За прогнозами ВООЗ, число випадків захворювання у найближчі 70 років може зрости до 70%, тому потрібно діяти.

На сьогодні іноваційним методом у лікуванні раку є фотофармакологія. Основним її завданням є введення до організму пацієнта діючої речовини в неактивному стані. На наступному етапі, в результаті опромінення пухлини світлом певної довжини хвилі введений препарат переходить з однієї конформаційної форми в іншу, при цьому

активується як лікарський засіб. Даний метод боротьби є більш м'яким, адже не потребує жорсткої хіміотерапії та є локалізованим на ураження певної ділянки, а не всього організму. Серед його вагомих переваг також є те, що не утворюються побічні продукти, на відміну від введення ЛЗ традиційним шляхом.

Об'єктом дослідження є PIN1 - це пептидил-проліл *цис-транс*-ізомераз (PPI-аза), котра ізомеризує Pro-Ser/Thr фрагменти. Підвищена активність PIN1 пов'язана з різними формами раку, а зниження цієї функції призводить до нейродегенеративних хвороб.

На сьогоднішні пошук та створення нових речовин, котрі будуть майбутніми лікарськими засобами є дуже актуальними. Існуючі інгібітори PIN1 мають ряд недоліків: токсичність, непроникність у клітини, нестабільність, складність синтезу, неекономічність, неселективність, а також неоптимальні фізико-хімічні властивості (великий об'єм та маса, низький або високий LogP, погана розчинність). Саме тому нами було вирішено отримати нові молекули-інгібітори, які будуть потенційними інгібіторами PIN1, окрім того мати кращі амфифільні (завдяки цьому - кращі клітинопроникні) властивості, ніж вже існуючі.

Основною ідеєю даної роботи є оптимізація синтезованих раніше циклопептидів з метою визначення сполуки-лідера, подальша модифікація якої стане основою для створення нового покоління ліків для фотофармакології. У попередніх дослідженнях перед нами стояла задача перевірки впливу заміни залишків Ser/Thr, Arg/Orn у основі молекул відомих пептидних лігандів на ефективність інгібування. Результати показали, що наявність позитивно зарядженого Arg значно покращує інгібуючу здатність синтезованих та протестованих макроциклів. Дослідження також показали, що ліганд із Thr має кращі амфифільні результати.

В рамках цієї роботи ми поставили собі за мету порівняти

інгібуючу дію макроциклів з Pro та залишком піпеколінової кислоти, а також іншими амінокислотними залишками, що дозволить на основі цього зробити висновки про механізм та вплив цієї структурної одиниці на зв'язування інгібіторів з PIN1.

У результаті дослідження було отримано нові циклічні пептиди, цикло-D-Pro-Leu-Arg-Bip-Pip/Pro-D-Ser/Thr-Phe-Arg/Orn-Val-Pro. Після аналізу отриманих даних до сполук-лідерів ми плануємо ввести фоточутливий фрагмент для подальших досліджень.

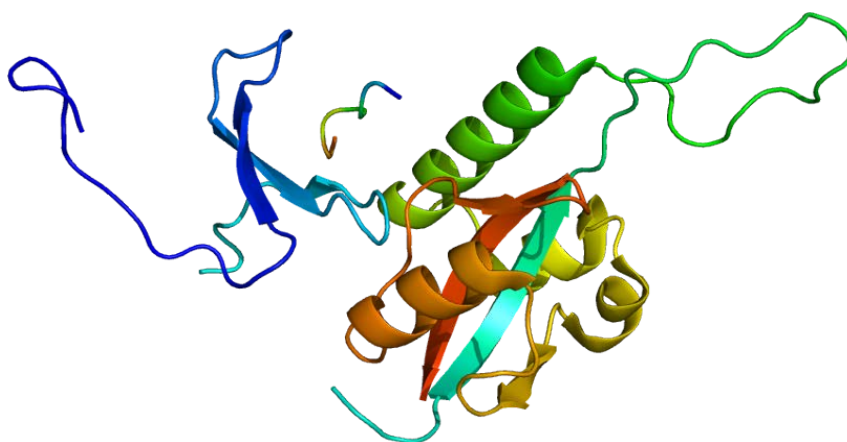
На наступному етапі була визначена модель для лідер-активних сполук, а саме - фармакофор, що включає в себе залишки піпеколінової кислоти, біс-фенілаланіну, треоніну, класичний бета-складчатий лист та аргініну. Ці складові є важливими для того, щоб інгібітори PIN1 мали властивості, що є необхідними для хороших лікарських засобів. Зокрема, такі як біодоступність, транспорт у клітину, висока активність, стабільність, низька токсичність, специфічність та фотокерованість (в майбутньому).

Отримані результати слугують продовженням дослідження ензиму PIN1, історія якого продовжує творитися зараз.

## 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1 Пептидил-проліл *цис-транс*-ізомераза PIN1

PIN1 - це пептидил-проліл *цис-транс*-ізомераза (PPI-аза). Даний ензим (структура зображена на рис. 1.1) кодується однойменним геном, розташованим у людей на короткому плечі 19-ї хромосоми [1, 2]



*Рис. 1.1. Структура білка Pin1. Зображення отримано з файлу PDB 1F8A в програмі PyMOL.*

Дослідження показали, що цей білок працює як регулятор процесу фосфорилування/дефосфорилування, який каталізує перетворення специфічних фосфорильованих мотивів між двома цілком різними конформаціями білків. Також дана ізомераза регулює різні клітинні процеси, зокрема: відповідь на сигнал росту, прогресія клітинного циклу, відповідь клітини на стрес, імунні відповіді, розвиток статевих клітин, диференціацію нейронів, старіння [3].

Окрім різноманітних фізіологічних ролей, PIN1 також пов'язана з рядом захворювань, таких як рак, нейродегенеративні захворювання (хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона), астма та мікробні інфекції [4, 5].

При хворобі Альцгеймера утворюється аберрантний білок-попередник амілоїду та відбувається процес фосфорилування тау-білка, що призводить до утворення позаклітинних амілоїдних бляшок та внутрішньоклітинних нейрофібрилярних клубочків з токсичних амілоїд-*бета*-пептидів та гіперфосфорильованого тау-білка відповідно. Нагромадження цих відкладень викликає синаптичну дисфункцію та втрату нейронів. Більше того, при хворобі Паркінсона змінюється фосфорилування  $\alpha$ -синуклеїну ( $\alpha$ -syn), що призводить до нерозчинних та фібрилярних включень  $\alpha$ -syn, що спричиняють смерть нейронів. Також при хворобі Хантінгтона фосфорилування білка відіграє вирішальну роль у апоптозі нейронів, впливаючи на ген, що супресорує пухлину p53 [4, 6].

Дерегуляція PIN1 відіграє значну роль в розвитку та лікуванні онкологічних захворювань [2, 6]. Показано, що PIN1 надекспресована при великій кількості ракових захворювань. Слід відмітити, що надекспресія PIN1 корелює з поганим клінічним прогнозом. PIN1 може бути використаний як маркер в діагностиці та оцінці прогнозу для хворих на рак простати та рак молочної залози.

### 1.1.1 Відкриття PIN1

Ген, що кодує PIN1, був ідентифікований в 1996 році професором Лу та його колегами в результаті генетичного/біохімічного скринінгу білків, які беруть участь у процесі ділення клітин ссавців [7].

Даними дослідниками була виявлена взаємодія цього пептиду з мітотичною кіназою NIMA, що безпосередньо причетна до розвитку ракових захворювань. Через здатність PIN1 пригнічувати її активність, дана кіназа була обрана для дослідження в ролі нового молекулярного перемикача, здатного конформаційно модифікувати фосфорильований білок з *цис*-ізомеру в *транс*- (рис.1.2)

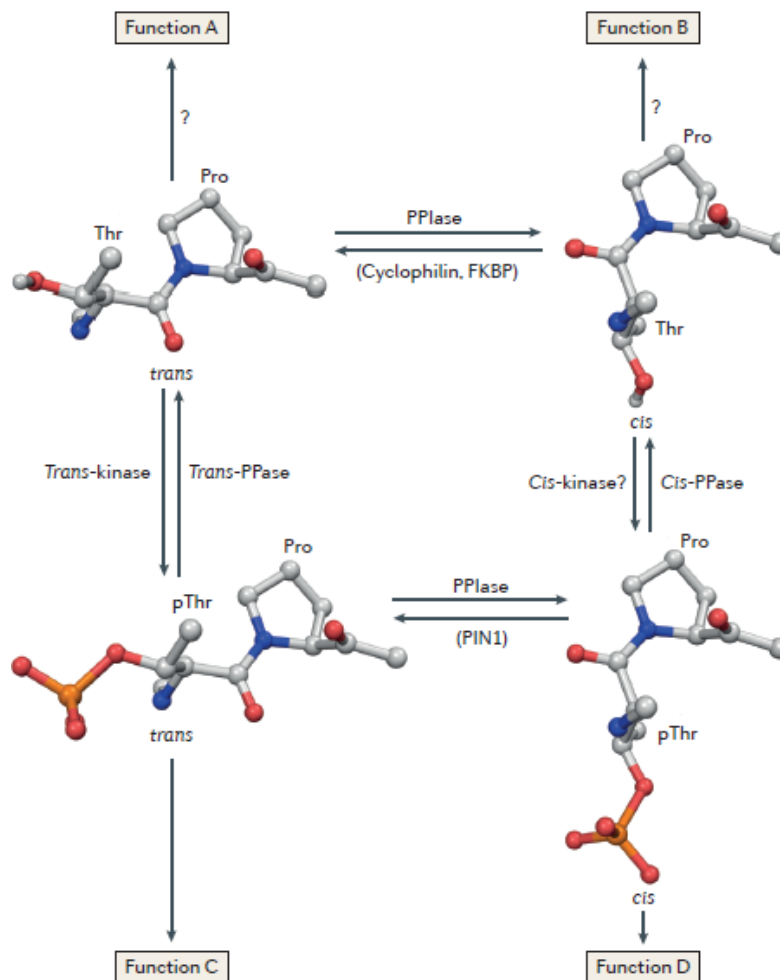


Рис.1.2 Схema, що відображає принцип роботи ізомерази Pin1.

Подальші дослідження пізніше виявили, що PIN1 регулює ділення клітини через активацію/деактивацію циклін-залежних кіназ. Наприклад, етап мітозу, що викликає пролін-спрямоване фосфорилування кількох сотень білків починається з активації цикліна В-CDC2 [3]. Крім того, PIN1 зв'язується з фосфорильованим p53, що є важливим для його стабілізації, трансактивації p21 та складових клітинного циклу у відповідь на пошкодження ДНК [8, 9]. Отже, PIN1-залежна регуляція багатьох мітотичних білків забезпечує їх злагоджену та синхронну роботу. Інгібування, надактивація або ж видалення PIN1 приведе до мітотичної катастрофи.

## 1.1.2 Функції PIN1

Процес оборотного фосфорилювання білків, що спрямований на Pro-Ser/Thr фрагменти є центральним механізмом сигналізації в різноманітних клітинних процесах. Показано, що дерегуляція процесу фосфорилювання відіграє важливу роль у патогенезі хвороб людини. Тому PIN1, як ензим, має величезний ареал функцій. Через різні механізми, такі як контроль каталітичної активності, деградації, фосфорилювання, взаємодії з ДНК, РНК або іншими протеїнами дана ізомераза регулює функції своїх субстратів шляхом конформаційної ізомеризації лише Pro-Ser/Thr у їх фрагментах. Цікаво, що пептидний зв'язок проліну є унікальним, оскільки може стабільно перебувати як в *цис*-, так і *транс*- формі, а перехід від однієї до іншої відбувається природним шляхом з переважання долі транс-форми, що є більш енергетично вигідною (70-90%) (рис. 1.3) [10].

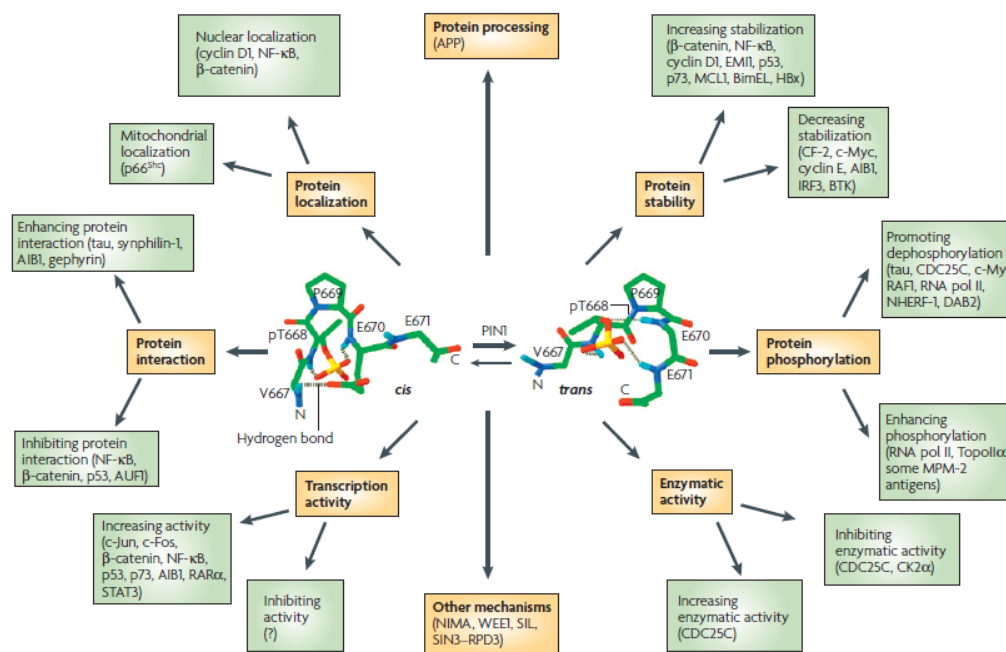


Рис.1.3. Схема, що показує всеосяжний вплив ізомеразі PIN1 на протікання процесів у організмі людини.

Також PIN1 бере участь у діленні та виживанні клітин, регулюючи дію пролін-специфічних кіназ та впливає на стабільність цикліну D1, ключового регулятора фазового переносу G1-S. З іншого боку, PIN1 дестабілізує транскрипційний фактор c-Myc та циклін E, що є важливими для цього ж переносу в інший проміжок часу [1].

Даний ензим також виступає каталізатором реакції ізомеризації між двома конформаціями білків (рис. 1.3), та дозволяє понизити енергетичний бар'єр вільної енергії для *транс*-форми настільки (в певних випадках), що реакція може бути майже безбар'єрною [8]. Хоча точний каталітичний механізм, за допомогою якого це відбувається є досі детально невідомим. Існують лиш гіпотези, про які буде згадано нижче.

Надлишок PIN1 в клітинах спостерігається при найбільш розповсюджених ракових захворюваннях, таких як рак простати, легенів, грудей та деяких інших типах раку [4] (рис.1.3).

Pin1 часто виступає як молекулярний таймер, який регулює амплітуду та тривалість певних клітинних процесів [8, 11, 12]. В огляді *Kun Ping Lu* 2016 року спробували надати основу для розуміння функції Pin1, висловивши гіпотезу про те, що PIN1 діє як молекулярний таймер. Пояснюється це впливом субстратів PIN1 на різні мітотичні події або їх розподіленням під час мітозу. [13, 8].

### **1.1.2.1 Як PIN1 каталізує цис-транс ізомеризацію pThr/pSer-Pro мотивів ? Чому саме їх?**

У білках пептидні зв'язки між амідним атомом азоту та карбонільним атомом вуглецю зазвичай знаходяться у *транс*-конфігурації. Окремим випадком є пептидний зв'язок, що передує залишку проліну, де *цис*-конформація стає можливою внаслідок стеричної взаємодії між C<sub>δ</sub>-атомом проліну бічного ланцюга та атомами остова, що дестабілізують *транс*-ізомер. *Цис-транс* ізомеризація таких пептидів є досить повільним процесом за кімнатної

температури, а її швидкість є критичною та регуляторною для багатьох білків, включаючи кінази і фосфатази через великий енергетичний бар'єр реакції (рис.1.4).

Суворий контроль за *цис-транс* ізомеризацією pThr/pSer-Pro мотивів є необхідними для забезпечення належної регуляції клітинної передачі сигналів [14]. У цьому контексті пептидил-проліл ізомераза PIN1 стала критичним регулятором [15]. PIN1 специфічно каталізує *цис-транс*-ізомеризацію pThr/pSer-Pro-амідних зв'язків з селективністю, що відповідає 1300-кратній в порівнянні з нефосфорильованими фрагментами [16].

В літературі наявні кілька експериментальних досліджень, які повідомляють про механізм каталізу процесу *цис-транс* ізомеризації за допомогою PIN1, але кожен з них є предметом суперечок і до сьогодні. Мова йде про 2 механізми: ковалентний та нековалентний. Відповідно до ковалентного механізму, заснованого на оригінальній статті з описом кристалографічних даних для PIN1, каталіз спочатку відбувається через перенесення протону з тїолової групи Cys-113 до His-59 з наступною нуклеофільною атакою атома сірки Cys-113 на карбонільну групу.

Механізм нековалентного каталізу припускає, що Cys-113 відіграє ключову роль у підтримці загального електронегативного середовища, що може дестабілізувати характер пролільного амідного зв'язку. Задля підтвердження чи спростування цієї ідеї планували провести експериментальне визначення значення pKa цього залишку, але поки цього зробити не вдалось.

Для перевірки наявності негативного заряду в атома сірки залишку цистеїну, що сприяє каталізу, група вчених на чолі з *Duarte (2012)* вирішили вивчити систему, в якій протон від Cys-113 через His-59 передається до His-157 з використанням методів молекулярної динаміки [17]. Проте під час моделювання пептид почав виходити з порожнини. Було проведено моделювання молекулярної динаміки QM/MM для реакції в двох різних

середовищах. Результати дослідження показали, що ферментативний каталіз пов'язаний з конформаційними змінами у самому ензимі [17].

Спираючись на найбільш цитовану в літературі гіпотезу, можемо говорити, що мотив pThr дозволяє закріплювати субстрат на PIN1, тоді як залишки Cys-113 та Ser-154 в ензимі впливають на реакцію ізомеризації відповідно *цис*- та *транс*-форм.

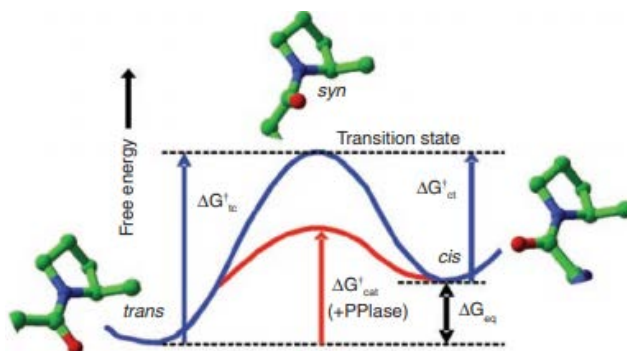


Рис.1.4 Енергетична діаграма для *цис*-*транс*-ізомеризації.

Також встановлено, що ізомеризація відбувається через скручений високо-енергетичний перехідний стан (рис.1.4: синя крива – без наявності, червона крива - в присутності каталізатора PPIase ).

Як бачимо гіпотез існує доволі багато і серед різних вчених є багато суперечок, але це лиш підтверджує актуальність досліджень ензиму PIN1 та його роль у різних клітинних процесах.

### 1.1.3 Вплив активності PIN1 на розвиток нейродегенеративних хвороб

Накопичення неправильно складених і агрегованих білків є загальною ознакою декількох нейродегенеративних захворювань. Дійсно, амілоїдні бляшки та NFT накопичуються в AD, тілах Льюї в PD, включеннях, що містять Htt у HD, та пріонних бляшках при пріонних хворобах [6]. Ці амілоїдні білкові відкладення знаходяться в динамічній рівновазі з розчинними видами вже наявних у організмі ензимів, що призводить до зміни їх розчинності,

стабільності та розміру. Запропоновано гіпотези щодо їх нейротоксичності [6]. Однак, сучасні дані свідчать, що ці нерозчинні включення можуть мати нейрозахисний механізм, а нейротоксичність зумовлюється виділенням токсичних неправильно складених проміжних продуктів. На сьогодні питання токсичності залишається невирішеним, тож зараз докладаються значні зусилля для вивчення механізмів, що регулюють утворення та поширення білкових агрегатів. Було показано [6], що агрегація білка може регулюватися внутрішньоклітинними процесами, які включають в себе ковалентні модифікації, такі як нітрування та фосфорилування. Важливо, що фосфорилування може впливати на конформацію білка, його функціонування, а також локалізацію.

### **1.1.3.1 PIN1 та хвороба Альцгеймера**

На сьогодні хвороба Альцгеймера (AD) - це найпоширеніший нейродегенеративний розлад серед людей, що мають вік за 65 років. Він характеризується прогресуючою втратою нейронів та синаптичною дисфункцією, які призводять до погіршення когнітивних функцій та зміни особистості. Дедалі більше даних підтверджують концепцію того, що AD є багатofакторним розладом, отже, є кілька патогенних факторів, що сприяють захворюванню. Хоча на сьогоднішній день патогенез AD не є повністю зрозумілим, скупчення внутрішньоклітинних NFT та позаклітинних амілоїдних бляшок загалом вважається основними патогенними детермінантами захворювання [6].

Загалом, зменшення рівня експресії PIN1 сильно впливає на ізомеризацію фосфорильованого тау-білка, NFT та APP, зміщуючи рівновагу між *цис*- та *транс*-конфігураціями. Патогенний *цис*-ізомер призводить до зміни функції тау-білка і APP, що, в свою чергу, призводить до появи NFT і амілоїдних бляшок [18].

У огляді Pastorino, L., Sun, A., Lu, P.-J., Zhou, X. Z. 2006 року [**Ошибка! Закладка не определена.**], доведено гіпотезу про каталізовану PIN1 ізомеризацію фосфорильованого мотиву Thr 668-Pro в APP. Даний процес прискорює ізомеризацію більш ніж у 1000 разів, регулюючи домен APP між двома конформаціями, що було візуалізовано даними ЯМР. Тоді як надекспресія Pin1 знижує секрецію Ab з клітинних культур, інгібування Pin1 збільшує його секрецію (рис. 1.5)

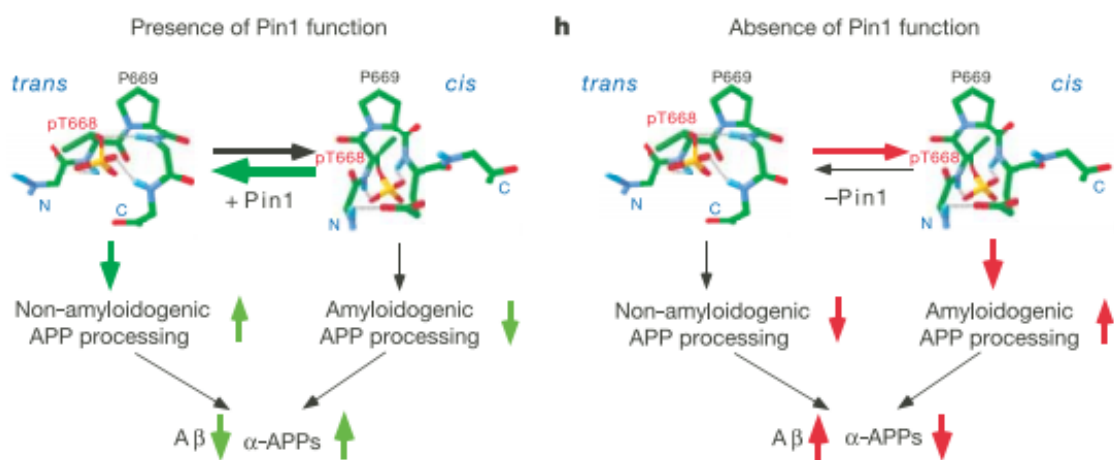


Рис. 1.5 Порівняння функціональних властивостей ізомеризи Pin1 у нормальному стані та за наявності патології (на прикладі хвороби Альцгеймера).

### 1.1.3.2 PIN1 і тау-білок

Тау-білок пов'язаний з мікротрубочками (MAP) і відіграє ключову роль у стабілізації мікротрубочкових структур, необхідних для з'єднання нейрональних клітин і синапсу. Чітко регульований баланс між фосфорилуванням і дефосфорилуванням контролює зв'язування з мікротрубочками, сприяючи росту аксонів та пластичності нейронів. Коли цей баланс порушений, тау-білок стає гіперфосфорильованим. Що в свою чергу призводить до відмежування від мікротрубочок та самонакопичування. Це

утворює NFT, які дестабілізують цитоскелет, що призводить до смерті нейронів [6].

Цікаво, що тау-гіперфосфорилювання виникає здебільшого на ділянках Ser/Thr-Pro, націлених на особливо активні протеїнкінази при AD, такі як GSK3 $\beta$  та Cdk5. Відповідно, пов'язаний з AD дефіцит PIN1 інгібує дефосфорилювання на сайтах, опосередкованих Cdk5, протеїновою фосфатазою 2A (PP2A), яка є регульованою в AD. Ці дані свідчать про нейропротекторну роль Pin1 в AD, яка була додатково досліджена шляхом аналізу здатності Pin1 зв'язувати pSer / Thr-Pro-тау [6].

### **1.1.3.3 PIN1 і хвороба Паркінсона**

Хвороба Паркінсона (PD) – хронічний, прогресуючий нейродегенеративний розлад, що в основному виникає у людей віком старше 60 років, але може проявлятися і значно раніше [6].

Дане захворювання пов'язане не лише з порушенням рухового контролю, а також з немоторними симптомами, таким як когнітивний дефіцит, нервово-поведінкові розлади та вегетативна дисфункція.

На сьогодні не існує чіткого лікування PD, а доступні лише фармакологічні підходи до лікування видимих симптомів. Їх поява є наслідком зміни фосфорилювання  $\alpha$ -синуклеїну, що призводить до утворення нерозчинних фібрилярних включень, що називають «тілами Льюї», переродження дофамінергічних нейронів у середньому мозку та їх подальша загибель. [6]

### **1.1.4 Роль PIN1 в регуляції клітинного циклу**

PIN1 каталізована ізомеризація проліну регулює функції субстратів PIN1 через різні механізми такі як: контроль каталітичної активності, деградації,

фосфорилування, взаємодії з ДНК, РНК чи іншими протеїнами, їх локалізацію у клітинах. Також PIN1 часто виступає як молекулярний таймер, який регулює амплітуду та тривалість певних клітинних процесів [19,20].

Субстратами PIN1 є ферменти, які беруть участь у переходах між різними етапами клітинного циклу, що дозволяє PIN1 опосередковано контролювати тривалість мітозу та відігравати ключову роль у його регуляції [21,22]. Перехід від однієї стадії клітинного циклу до іншої регулюється пролін-спрямованими циклін залежними кіназами (CDKs – cyclin-dependent kinases). Наприклад, одна з причин початку мітозу – активація цикліну B-CDC2, що призводить до пролін-спрямованого фосфорилування більш ніж сотні протеїнів. PIN1 в свою чергу регулює мітотичний поділ через стабілізацію CDC25C та WEE1, які є активуючою фосфатазою та інгібуючою кіназою цикліну B-CDC2 відповідно [29, 23].

PIN1 також регулює активність підгрупи мітотичних та ядерних білків, функції яких прямо залежать від фосфорилування. Дослідження показали, що неправильна активація мітотичних подій у клітинному циклі може сприяти гіперфосфорилуванню тау-білка, тим самим відіграючи важливу роль у прогресуванні AD. Шляхом подальшої ізомеризації та дефосфорилування PIN1 здатний відновлювати функцію та конформацію фосфорильованого тау-білка, таким чином регулюючи мітотичні події. Також доведено, що його активність необхідна для контролю реплікації ДНК [24].

Гіперфосфорилування тау в NFT є помітною патологічною ознакою при хворобі Альцгеймера. Відомо, що PIN1-індукована ізомеризація пролілу полегшує дефосфорилування тау-білка за допомогою фізіологічної тау-фосфатази. Отже, наш ензим може опосередковано відновлювати функцію фосфорильованого тау, сприяючи його дефосфорилуванню. І навпаки, було показано, що окислювальна дисфункція PIN1 призведе до втрати контролю над таким дефосфорилуванням, з подальшою дисфункцією гормонів.

### 1.1.5 Вплив активності PIN1 на утворення/розвиток раку

Важливою стороною функціювання PIN1 є вплив на появу та розвиток ракових захворювань (рис. 1.6, 1.7). Дослідниками було виявлено [25, 26] надмірну активність ензиму PIN1 у тканинах деяких видів раку людини. Це спостереження було підтверджено і розширено широкомасштабними дослідженнями порівняльної експресії даної ізомерази у 60 різних типах пухлин людини та відповідних їм нормальним тканинах.

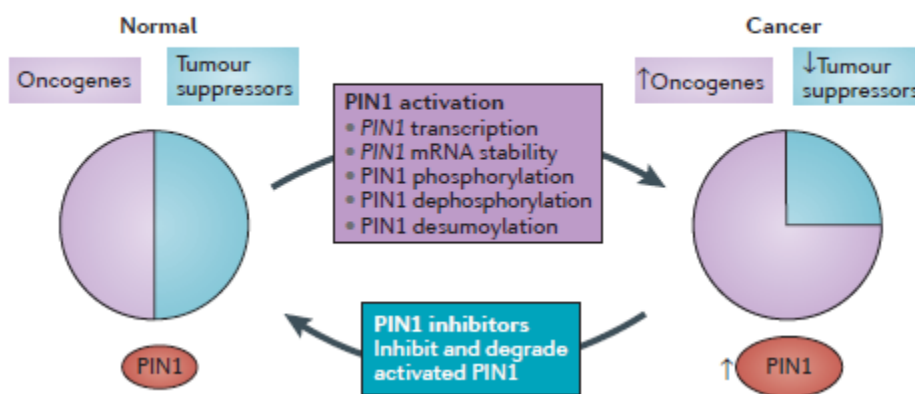


Рис 1.6. Схема, що показує баланс між здоровим організмом та ураженим раком організмом, роль ензиму PIN1 в цьому процесі.

Надекспресія PIN1 спостерігається у більшості онкогенних тканин [27]. Серед них: рак молочної залози, шийки матки, яєчників, головного мозку, товстої та прямої кишок, печінки, стравоходу та легень. Також повідомляється, що прогноз розвитку раку передміхурової залози пов'язаний з вираженою кількістю рівню PIN1 в ракових клітинах [28]. Ці результати дозволяють припустити, що надактивність PIN1 прямо пов'язана з раковими захворюваннями.

Як бачимо, мішенями PIN1 є велика група протеїнів, що бере участь у регулюванні клітинного циклу на різних його етапах. Його надмірна експресія також корелює з численними маркерами раку, такими як циклін D1, β-катенін,

тощо. Одним із перших відкритих молекулярних механізмів участі даного ензиму у розвитку пухлин є корельоване збільшення рівнів експресії цикліну D1 (кодованого геном CCND1) та PIN1.

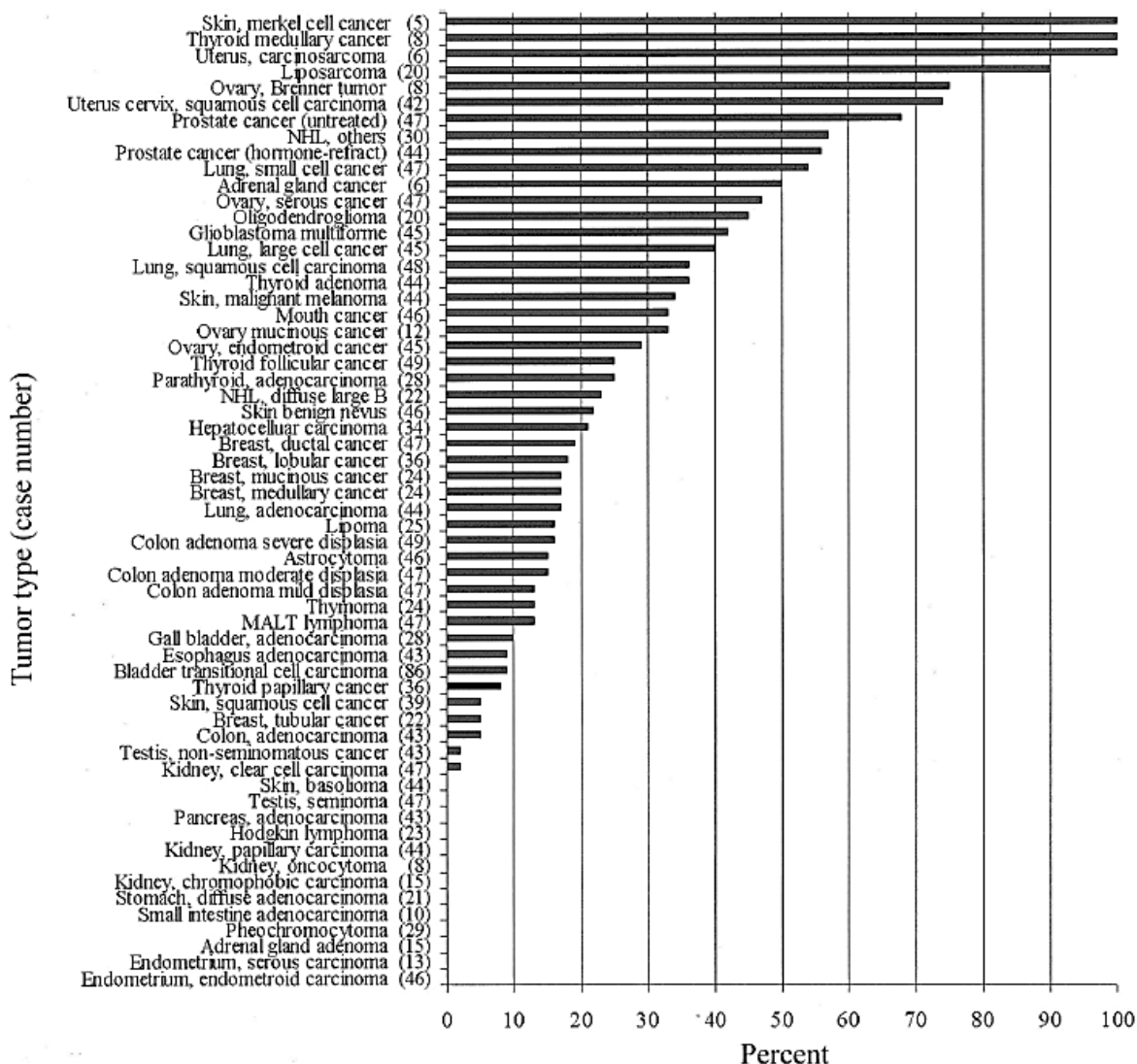


Рис.1.7 Надекспресія Pin1 прямо зв'язана з різними типами онкологічних захворювань.

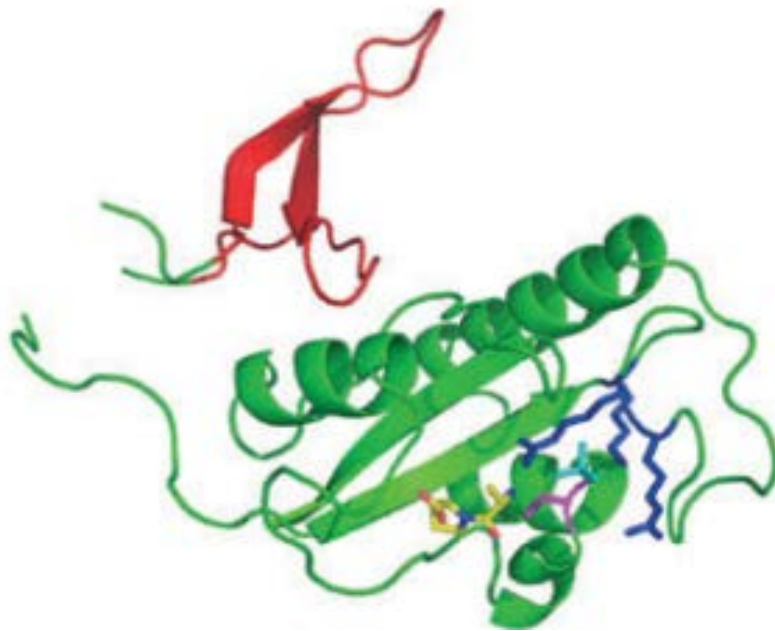
Судячи з літературних даних [25, 2618, **Ошибка! Закладка не определена.**], визначення експресії PIN1 може допомогти відрізнити ракові клітини від нормальних, а також ідентифікувати можливих онкохворих на ранніх стадіях. Крім того, визначення активності PIN1 може мати важливе прогностичне значення для лікування онкохворих [29].

Також було показано, що при перебігу хвороби раку шлунка часто спостерігається підвищена експресія  $\beta$ -катеніну. Саме це послугувало ідеєю для ведення нових досліджень, які мали підтвердити чи спростувати причетність ізомерази PIN1 до розвитку раку даного виду. Шляхом аналізу 95 зразків клітин пухлин було виявлено мутацію гену, що відповідає за надекспресію даного білка, але його причетність до розвитку онкологій виявлено не було. Дослідження, проведені шляхом імунофарбування ракових клітин також продемонстрували, що PIN1 специфічно стабілізує  $\beta$ -катенін, інгібуючи його взаємодію з білком APC, що активує амінокислотні залишки та допомагає їх взаємодії з надважливою в організмі тРНК [30].

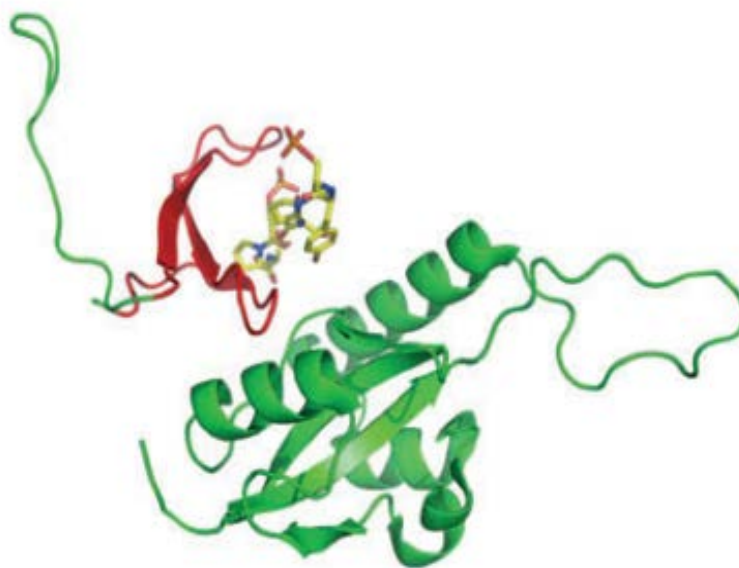
### 1.1.6 Будова PIN1

PIN1 – це білок масою в 18 кДа та сумарною кількістю амінокислотних залишків 163, що складається з двох доменів: N-термінального WW і C-термінального парвулін-каталітичного, які з'єднані між собою гнучким лінкером (рис 1.8) [31]. Позитивно заряджені залишки циклу активного сайту (Lys63, Arg68 і Arg69) зображені на рисунку синім кольором, каталітичний Cys113 - рожевого кольору. Пептид Ala-Pro в активному центрі зображено стрижневою моделлю, сульфат-іон зображено світло-синім кольором (а) Приклад зв'язування Pin1 з CTD Pol II фосфопептидом (б)

a)



б)

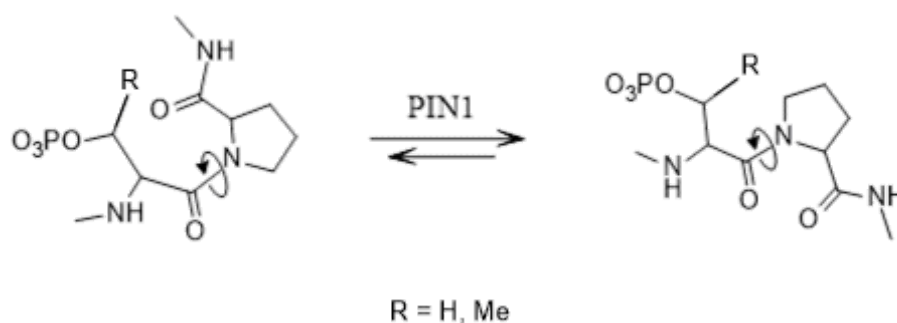


*Рис.1.8. Молекулярна структура PIN1 Каталітичний домен зображено (зеленим кольором), домен WW (червоним) та область лінкера (жовтим).*

N-термінальний WW домен складається з двох антипаралельних  $\beta$ -шарів. Цей домен - посередник білок-білкових взаємодій, що залежать від фосфорилування [32]. WW-домен рекрутує субстрати [13].

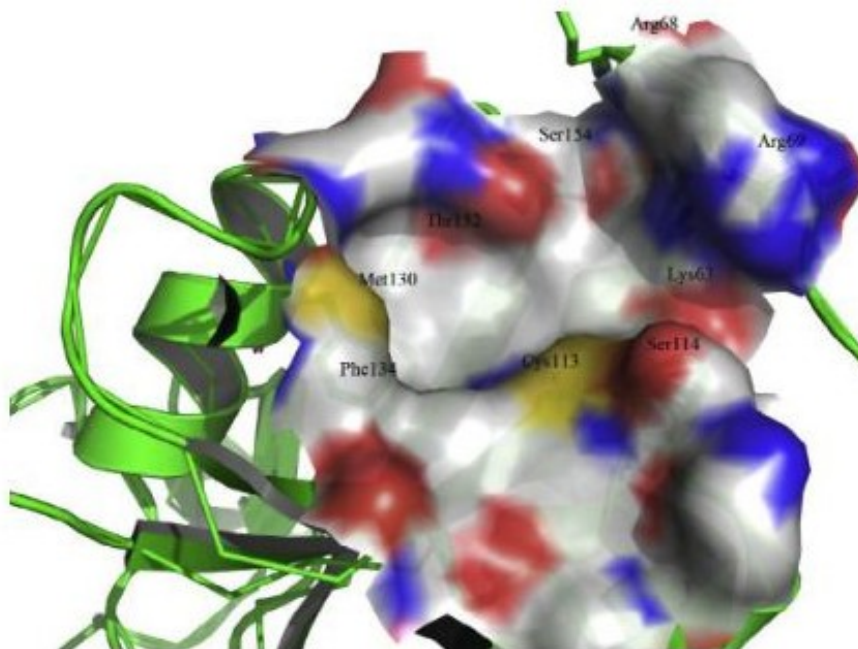
C-термінальний парвулін-каталітичний домен складається з двох

антипаралельних  $\beta$ -шарів та чотирьох  $\alpha$ -спіралей. Цей домен містить активний центр, що розпізнає та зв'язується з фосфосерин/треонін-проліновим фрагментом (p.Ser/p.Thr-Pro) та каталізує ізомеризацію пролін-пептидного зв'язку, що приводить до ізомеризації пептидного зв'язку даного фрагменту (рис. 1.9).[32]



*Рис. 1.9. Конформаційні перетворення пролінвмісного пептидного зв'язку p-Ser/p-Thr-Pro під дією PIN1*

Будова активного центру PIN1 представлена на рисунку 1.10.



*Рис. 1.10. Зображення активного центру С-кінцевого домену PIN1, ключових амінокислот, важливих для його функціонування.*

PIN1 PPIase домен визначає ферментативну активність даного ензиму. Одна його частина містить в собі нейтральні залишки (Phe134, Met130, Cys113), вона зв'язується з пролільним залишком субстрату. В іншій частині активного центру містяться полярні амінокислотні залишки (Ser114, Lys63, Agr69, Arg68, Ser154, Thr152). Амінокислоти Lys63, Agr69, Arg69 за рахунок електростатичного ефекту зв'язуються із фосфатною групою [13,**Ошибка! Закладка не определена.**].

У огляді *Lippens, G., Landrieu, I., & Smet, C. (2007)*, спробували відтворити взаємодію даної ізомерази з CDC25-похідною фосфопептиду, з метою знаходження тих амінокислот у складі PIN1, чиї параметри найбільш різко змінюються під час їх взаємодії. В результаті даних досліджень, вони виявили, що це амінокислотні залишки Arg12 і Trp29 для домену WW та Arg30, Gln78 та Trp82 для p13 (рис 1.11) [31]. Кольорове кодування на рисунку зроблене відповідно до хімічних змін, що спостерігаються при зв'язуванні CDC25- похідної фосфопептиду. Залишки, в яких хімічний зсув найбільше змінюється в результаті взаємодії з пептидними зв'язками (червоні) - це Arg12 і Trp29 для домену WW та Arg30, Gln78 та Trp82 для p13. Синій колір вказує на відсутність змін хімічного зсуву.

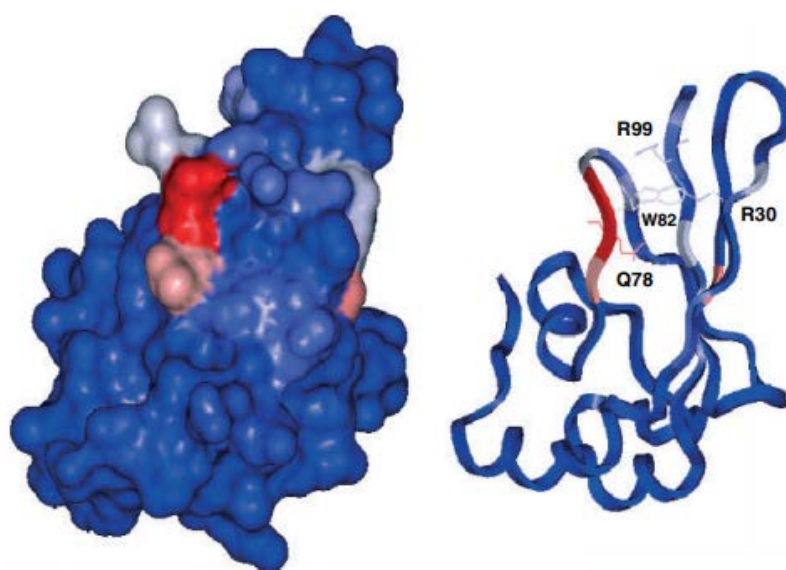


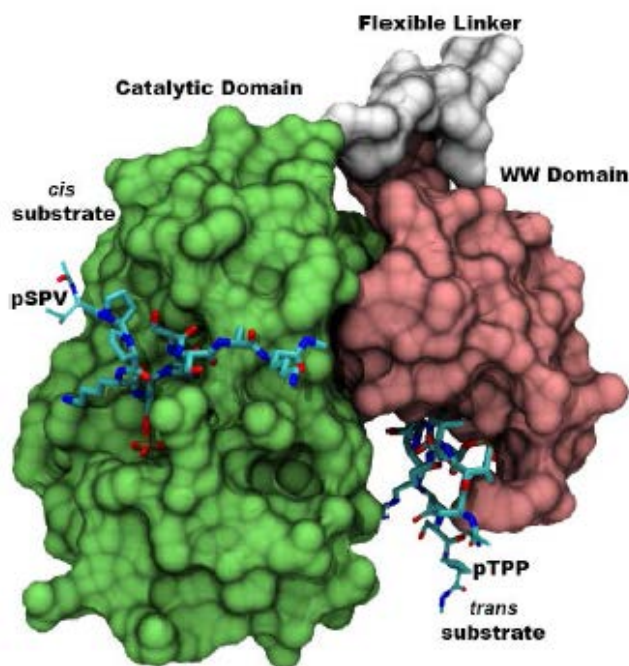
Рис.1.11 Молекулярна поверхня (зліва) та стрічкова діаграма (праворуч)

*WW-домену Pin1, що зв'язаний із CDC25-похідною фосфопептиду.*

Насправді, до сьогодні повний механізм зв'язування PIN1 з відомими інгібіторами не є достеменно відомим. Існує декілька гіпотез, що намагаються його пояснити. Одною з ключових є ідея [13], в якій Met130 виступає в ролі нуклеофіла, що атакує карбонільну групу пептиду. Під час такого зв'язування відбувається не лише утворення нового зв'язку, а й перетворення конформації пептиду PIN1 в таку, що буде вмещувати в собі достатню кількість водневих зв'язків, які в свою чергу стабілізуватимуть утворену структуру.

Також має місце ідея алостеричного зв'язування WW домену, що прямо залежить від будови пептидного інгібітора (рис. 1.12). Група вчених на чолі з *Motin, Yao (2018)* [33] за допомогою методів молекулярної динаміки спробувала це змоделювати. Для цього вони взяли досліджений ними раніше субстрат (pSPR), що в результаті проведеного експерименту показав позитивний алостеричний ефект. В рамках дослідження вони намагались детально окреслити механізми, які лежать в основі залежності алостеричного впливу від послідовності пептиду.

Такі інгібітори є цікавими насамперед тому, що можуть переважно зв'язуватись з WW доменом та перешкоджають зв'язуванню субстрату в каталітичному домені ензиму. Тому синтез хімічних речовин, що імітують специфічну геометрію мотиву pSer/Thr-Pro, вважається перспективним методом для пошуку хороших кандидатів для алостеричних інгібіторів PIN1.



*Рис.1.12 PIN1 з фосфорильованими субстратами, зв'язаними як в каталітичному домені, так і в WW домені. PIN1 представлений у вигляді молекулярної поверхні, субстрат у каталітичному домені (зелений) знаходиться у цис-конформації, тоді як субстрат у WW домені (рожевий) знаходиться у транс конформації, гнучкий лінкер пофарбований у білий колір.*

Наступна гіпотеза зв'язування [13] ґрунтується на ідеї просторової кишені (складається з Lys63, Arg68 та Arg69), яка вміщує в себе фосфатну групу під час реакції ізомеризації, що полегшує просторові перешкоди. Також гідроксильна група Ser154 формує водневий зв'язок з карбонільним киснем P<sub>ip</sub>. В рамках даної ідеї виявлено, що шестичленний цикл P<sub>ip</sub> у порівнянні з п'ятичленним циклом Pro повніше займає гідрофобну кишеню, сформовану залишками Leu122, Met130, та Phe134 (рис. 1.13), оскільки має більшу гідрофобну поверхню, можливо, таким чином збільшуючи афінність інгібітору до PPI-азного домену. Також була підтверджена наявність P<sub>ip</sub> в інгібіторах інших PPI-аз, FKPB та ін. Але з приводу останньої дискусії тривають і до тепер [34].



гомологів PIN1, а специфічні для фосфорилування PPI-ази можуть бути виявлені в клітинах навіть з дефіцитом PIN1. Це може відкрити PIN1-подібні ферменти, які ще не були виявлені [13].

## **1.2 Інгібітори PIN1**

### **1.2.1 Невеликі молекули-інгібітори**

Дія інгібіторів спрямована на один з доменів PIN1. Розглянемо кожен з випадків на прикладах існуючих інгібіторів.

Спочатку були розроблені інгібітори, які зв'язуються з С-кінцевим парвулін-каталітичним доменом. Перший інгібітор PIN1 - невелика молекула нафтохінонвмісний юглон (схема 1.14(1)[13]), що дезактивує PIN1, реагуючи з Lys63 активного центру за реакцією Міхаеля [35].

Після юглону було синтезовано ще багато малих молекул-інгібіторів PIN1: РіВ ( $IC_{50} \sim 1.5 \mu M$ ) (2), діпентаметилен тіурам моносульфід (3) ( $IC_{50} \sim 4 \mu M$ ), галогеновий феніл-ізотіазолінон TME-001 (4) ( $IC_{50} 6,1 \mu M$ ), індолієва кислота ( $IC_{50} 16 \mu M$ ) (рис 1.14 (5)) [13].

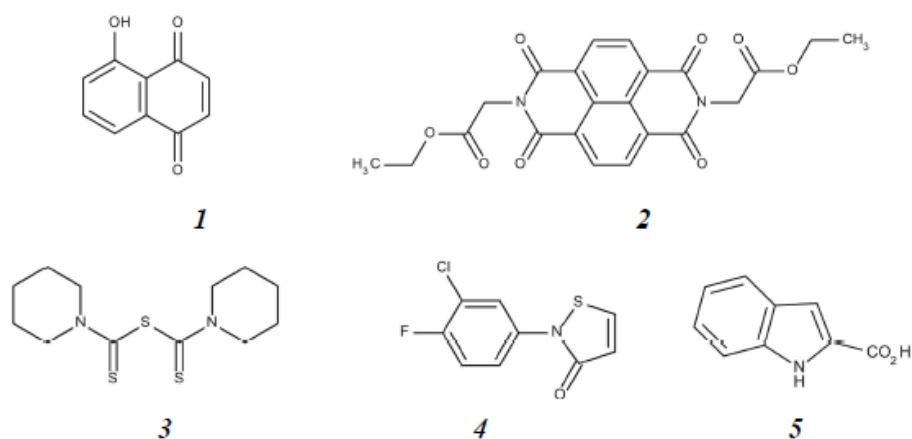


Рис. 1.14. Приклади існуючих малих молекул-інгібіторів PIN1, які взаємодіють з C-термінальним каталітичним доменом: 1) юглон; 2) PiB; 3) дїпентаметилєн тїурам моносулфїд; 4) TME-001; 5) індолїєва кислота.

Не було доведено, що дані молекули специфічні та високоефективні у клітинах. Проте ці молекули-інгібітори допомогли вивчати механізм інгібування PIN1 і послужили основою для створення більш складних інгібіторів [13].

Пізніше були розроблені інгібітори, що діють на два домени: парвулін-каталітичний і WW домени.

Знизити активність PIN1 можна за допомогою фосфорилування Ser16, що перешкоджає WW-домєну пов'язувати білок з його субстратом [13].

Інгібітор WW-домєну **6** з  $K_d = 15 \mu\text{M}$  (рис 1.13.(6)) ідентифікували шляхом введення гїдробобних фрагментів до дипептиду p.Thr-Pro та відстеження зв'язування з  $^{15}\text{N}$ -міченим WW-домєном PIN1, використовуючи  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR [13].

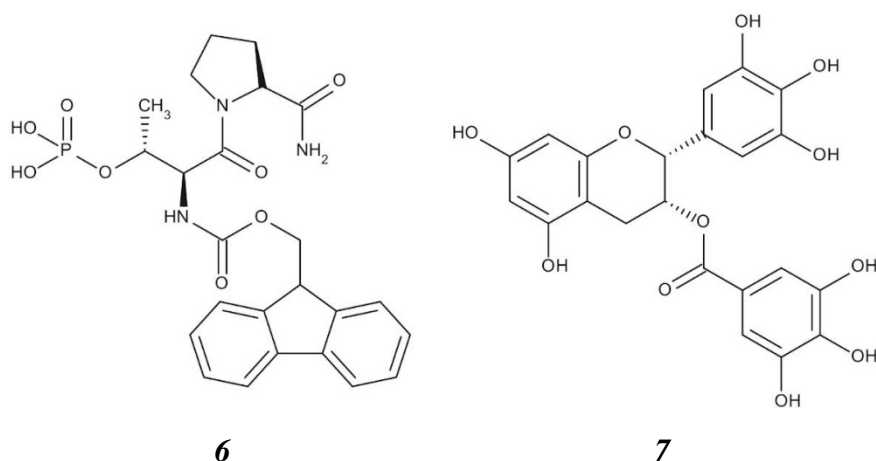


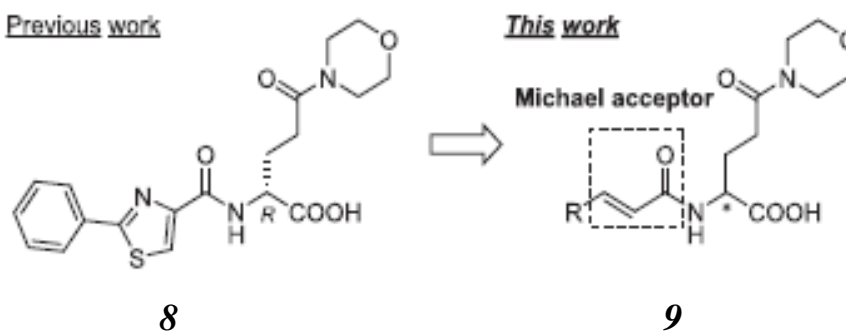
Рис. 1.14. Приклади існуючих малих молекул-інгібіторів PIN1, що взаємодіють з WW доменом.

Також було отримано інгібітор EGCG (Рис. 1.14 (7)). Рентгено-структурний аналіз його комплексів вказує на те, що інгібітор EGCG може зв'язуватися як з WW-доменом, так і з каталітичним доменом. На повній довжині ланцюга PIN1 в протеазо-сполученому аналізі знайдене значення  $IC_{50} = 20 \mu M$  [12]. Проте, повідомлень про здатність EGCG інгібувати ізольований каталітичний домен PIN1 немає. Таким чином, припускається, що основним сайтом інгібування PIN1 сполукою EGCG є WW-домен [13].

Взаємодія EGCG з WW-доменом проходить через амінокислотні залишки, що залучені до зв'язування пептидів. Цей процес повинний перешкоджати подальшому зв'язуванню субстрату з даним доменом. Однак, сайт зв'язування даної сполуки для домену PPIase знаходиться близько до кишені між Arg68 та Ser114, що відрізняє його від активного сайту.

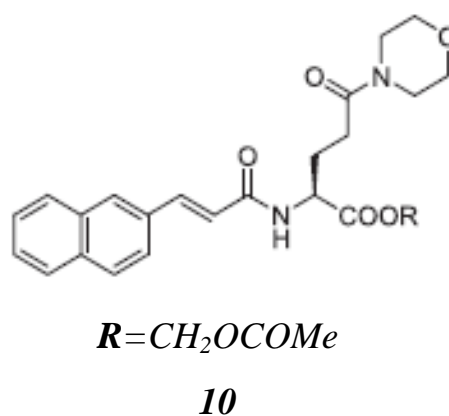
У 2019 році група дослідників на чолі з Naoya Ieda створила новий необоротний інгібітор PIN1 на основі інгібіторів амінокислотного типу (рис.1.14 (9)) [Ошибка! Закладка не определена.]. Його попередником є сполука 8 (рис. 1.14), синтез та дослідження якої було предметом їх минулої роботи та також розглядалась як можливий інгібітор PIN1, але в клінічних дослідженнях отримала занадто низькі результати. Тож вони вирішили зробити її

модифікацію шляхом заміни тіазольного циклу на більш лабільний вінільний фрагмент та перевірити інгібуючу силу отриманої сполуки..



*Рис.1.14 Дизайн нового ковалентного інгібітора PIN1*

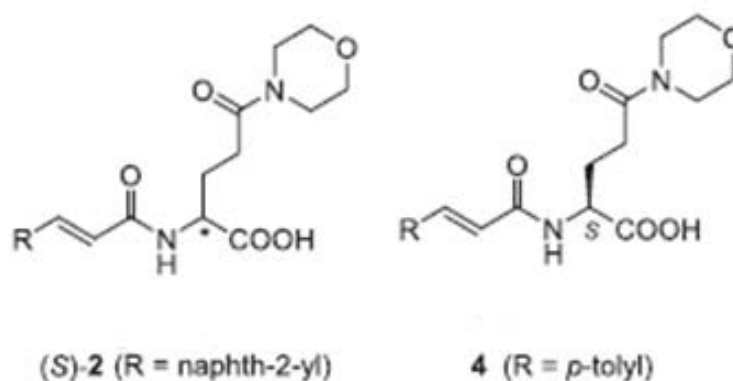
Очікувалось, що він буде ковалентно зв'язуватись з Cys113, одним із залишків активного центру ензиму PIN1. Цікавою є ідея дослідників синтезувати мембранопроникну форму (рис. 1.14 (**10**)), що після проникнення в клітину розщепиться до активної форми (**9**).



*Рис.1.14 Синтезований мембрано проникний інгібітор PIN1*

Форма **10** пригнічує експресію цикліну D1, який стабілізується PIN1 в клітинах раку простати людини (PC3), а також пригнічував ріст цих клітин. Ці результати вказують на те, що після успішного проникнення у клітину похідної **10**, відбувається її гідроліз до сполуки **9**, яка в свою чергу вибірково інгібує PIN1, стабілізуючи циклін D1 та пригнічуючи зростання онкоклітин.

Значення  $IC_{50}$  сполуки **10** для клітин PC3-PIN1 становило 83 мкМ, що не є достатньо високим показником інгібування та показує його помірну токсичність у клітинах. Після цього було синтезовано новий ковалентний необоротний інгібітор PIN1 – **11** (рис.1.14) – ацетоксиметилловий ефір сполуки **10**, що показав пригнічення експресії цикліну D1 в клітинах PC-3 та помірну цитотоксичність.



## 11

*Рис.1.14 Синтезована (S)-2 похідна мембрано проникний інгібітор PIN1*

Можливо основною клітинною мішенню сполуки **10** був не наш ензим, про нові результати дослідження група вчених ще не повідомила назагал.

Чим дане дослідження є цікавим для нас? Перш за все, воно не є типовим адже інгібітором PIN1 виступає не вихідна сполука, а та, що утворюється в клітині під дією клітинного середовища. Вони показали, що раціонально сконструйований інгібітор на основі відомих у літературі та елементарних хімічних реакцій може мати шанси на успіх [28].

### 1.2.2 Лінійні пептиди-інгібітори

Стратегія отримання перших лінійних пептидних інгібіторів: ідентифікувати оптимальний субстрат, а потім замінити амінокислоту, яка

передувала проліну з L до D-ізомеру. Така стратегія з'явилась через особливість PPI-аз: вони можуть зв'язувати, але не ізомеризувати олігопептиди зі зміненою стереохімією при C $\alpha$  амінокислоти, що передуює пептидил-проліловому зв'язку.

За цією стратегією було отримано ізомери інгібітору Ас-Phe-DThr(PO $_3$ H $_2$ )-Pip-Nal-Gln-NH $_2$  (Рис. 1.14 (**12**, **13**). Заміна L-ізомеру на D-ізомер привела до інгібіторного пептиду (IC $_{50}$   $\sim$  1  $\mu$ M). Цей інгібітор стійкий до дефосфорилування в присутності клітинних фосфатаз, що підвищує ймовірність використання цього інгібітору як терапевтичного засобу.

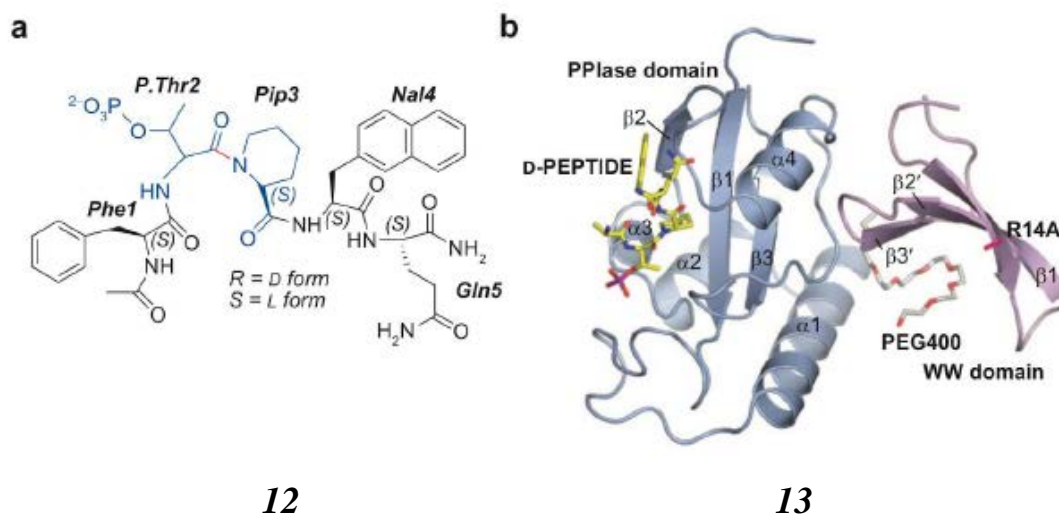


Рис. 1.14. L-peptide (**12**) і D-peptide (**13**) - інгібітори PIN1:  
а) хімічна структура пептидів; б) структура комплексу PIN1 і D-peptide

На рисунку 1.14 (**12** - L-peptide) фрагмент p.Thr2-Pip3 імітує p.Thr/Pro – фрагмент розпізнавання субстрату (синього кольору); пептидний зв'язок, аналогічний тому, що піддається каталітичній ізомеризації на субстратах відмічений червоним кольором.

Кожен пептид синтезували в розчині, щоб кількісно оцінити активність пептидних інгібіторів до PPI-ази PIN1. D-peptide (K $i$  = 20,4  $\mu$  M) виявився більш

високоафінним ніж L-peptide ( $K_i = 507 \mu\text{M}$ ). Крім того, D-peptide не інгібує Par14, FKBP12, Сур18 або будь-який з протеїнкіназ. А також він продемонстрував відмінну стабільність в клітинах HeLa. D-peptide пов'язаний з каталітичним доменом PPI-ази, як зображено на рисунку 1.14 (**13**), де наведені дані рентгеноструктурного аналізу. Можна бачити, що залишки Lys63 і Arg69 взаємодіють із фосфатним залишком. Залишок проліну пов'язаний з гідрофобним фрагментом активного центра, що містить бічні ланцюги Leu122, Phe125, Met130 та Phe134. На цьому ж рисунку зображена молекула PEG400, що пов'язана з WW доменом (кольорові зв'язки з вуглецем (жовті), киснем (червоні), нітрогеном (сині) та фосфором (пурпурні)), а також мутація R14A PIN1, яка покращує ріст кристалів для рентгеноструктурного аналізу, їх розмір і стабільність. Через високу спорідненість та селективність D-peptide входить в кількість найбільш перспективних інгібіторів малих молекул, для дослідження *in vivo* сигнальних шляхів, опосередкованих PIN1 [36].

Також достатньо ефективно PIN1 інгібували за допомогою лінійних пептидів із послідовностями Ac-Lys(N-biotinoyl)-Ala-Ala-BthD-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pip-Nal-Gln- $\text{NH}_2$  та Ac-Phe-D-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pip-Nal-Gln- $\text{NH}_2$  що показали значення  $K_i$  1.2 та 18.3 nM [37]. Треба також відзначити, що серед усіх протестованих під час зазначеного дослідження інгібіторів лише ці два інгібували PIN1 зворотно. Задля перевірки специфічності зазначених пептидів-інгібіторів були проведені дослідження з іншими PPI-азами (Par14, FKBP12, Сур18), різноманітними кіназами (ERK2, PKA, PKC) та білковими фосфатазами (PP2A, PP2B, PP1). В присутності 500  $\mu\text{M}$  інгібітора активність жодної з них не досягла 10%. Також було зазначено, що ефект Ac-Phe-D-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pip-Nal-Gln- $\text{NH}_2$  (рис. 1.14 (**12**, **13**)) залежить від дози, що дає змогу регулювати кількість інгібованої PIN1 [13,32].

### 1.2.3 Циклічні пептиди-інгібітори

Технічні досягнення дозволяють синтезувати циклічні пептиди швидко, а також використовувати методи скринінгу на великих бібліотеках циклічних пептидів.

Спираючись на отримані результати для сполук L- та D- peptide (рис. 1.14 (12, 13)), Liu [13], не покинув намагання знайти клітинопроникний пептид. Один з отриманих ефективних пептидів на основі D-peptide є цикло-(D-Ala-Sar-D-p.Thr-Pip-Nal-Tyr-Gln)-Lys-SH, (рис. 1.14 (14)). Він міцно зв'язується з PIN1 ( $IC_{50}$  32 nM), але не проявляє активності проти клітин.

Похідна цього циклопептиду (рис. 1.14 (15)), може інгібувати розмноження клітин раку молочної залози BT-474. Припускається, що це відбувається через вивільнення активної складової 15 після внутрішньоклітинного розщеплення дисульфідного зв'язку.

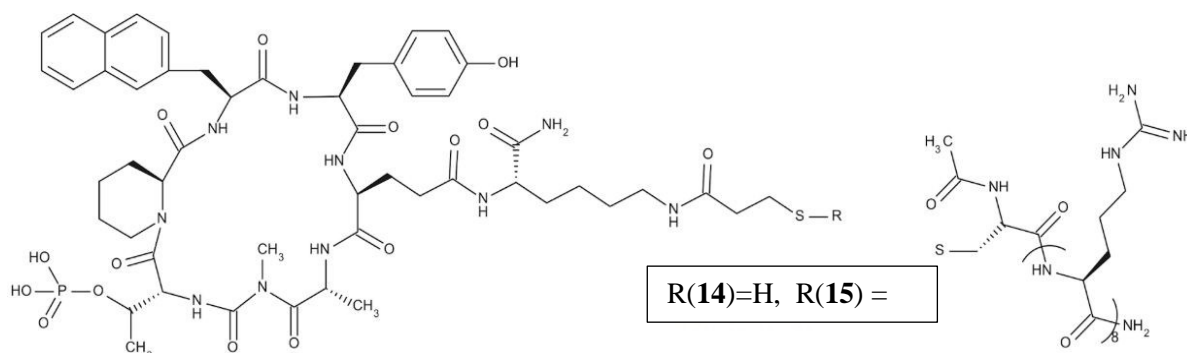
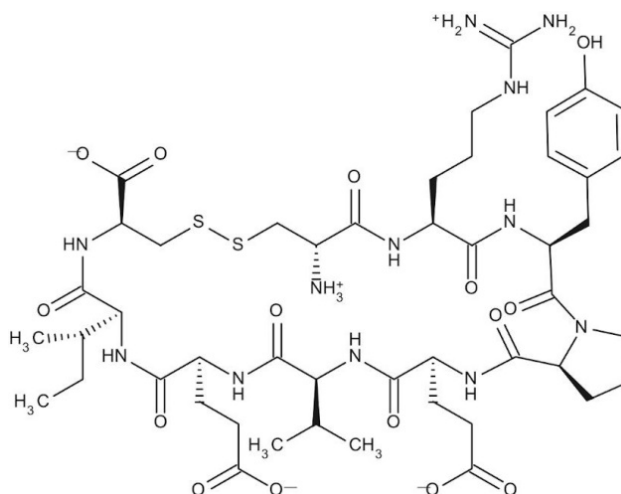


Рис. 1.14. Структура циклопептидних інгібіторів PIN1: цикло-(D-Ala-Sar-D-p.Thr-Pip-Nal-Tyr-Gln)-Lys-SH (14) його похідна(15)

Методом скринінгу мільярдної бібліотеки гептамерних пептидів групою дослідників на чолі з *Dunkan* з було виявлено інші ефективні циклічні інгібітори PIN1. Більшість виявлених потенційних інгібіторів містили фрагмент Tyr/Phe-Pro-Glu/Asp-Val, включаючи інгібітор цикло-Cys-Arg-Tyr-Pro-Glu-Val-Glu-Ile-Cys ( $IC_{50}$  500 nM) (рис 1.14 (16)) [1312].



16

Рис.1.14. Структура циклічного пептидного інгібітору PIN1 цикло-Cys-Arg-Tyr-Pro-Glu-Val-Glu-Ile-Cys

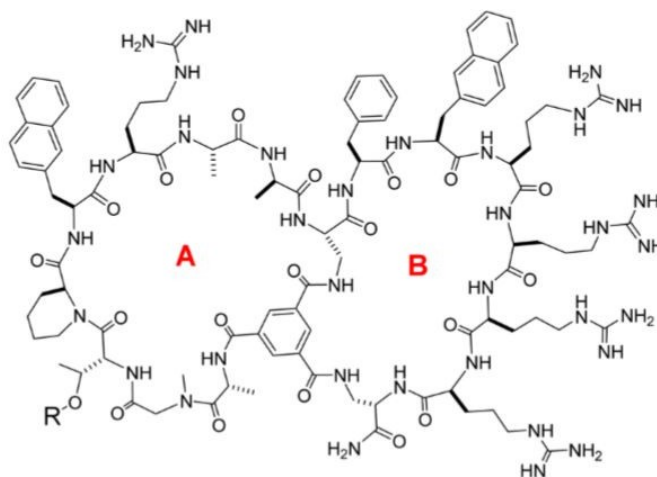
Пептид **16** взаємодіє виключно з активним центром PIN1, але без зв'язування з Lys63, Arg68 та Arg69, які координують фосфатну частку лінійного пептиду **12**. Ці дані свідчать, що нефосфорильовані пептиди можуть зв'язуватися з досить високою спорідненістю з PIN1 [38, 39].

Перші спроби розробки альтернативного циклічного пептидного інгібітора PIN1, який може зберігати свій циклічний характер всередині клітин, не були успішними. Циклічний інгібітор **5** у клітинах недостатньо стійкий і перетворюється у лінійний [13]. Отримані дані настановлюють до нових досліджень у цьому напрямку, бо ж перший лінійний інгібітор Ac-Phe-DThr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pip-Nal-Gln-NH<sub>2</sub> (рис. 1.14 (**12**)) не виправдав очікувань через низьку проникність у мембрани клітини, яка викликана великим зарядом фосфатної групи [3639]. Серед недоліків також слід відмітити низьку селективність та високу цитотоксичність. Пептидні інгібітори показують хороші результати на білкових моделях та діють в наномолярному діапазоні, але абсолютно неактивні на клітинних лініях, тим більше в живих організмах.

### 1.2.4 Біциклічні пептиди-інгібітори.

У якості вирішення проблеми проникності крізь клітинну мембрану групою на чолі з *Pei, D. & Jiang, B.* [38] було створено біциклічний пептидний інгібітор PIN1, в якому одне кільце (А-кільце) містить PIN1-зв'язуючий фосфопептидний мотив (D-pThr-Pip-Nal, де Pip і Nal являють собою (R) - піперидин-2-карбовону кислоту та L-нафтілаланін відповідно), тоді як друге кільце (В-кільце) містить клітинно-проникний фрагмент (Phe-Nal-Arg-Arg-Arg-Arg), в якому основну роль відіграють залишки Arg (рисунок 1.14 (17)).

Вирішення проблеми проникності не закрило питання створення інгібіторів для PIN1, а тільки сформувало вектор їх досліджень. Хоча біциклічний інгібітор є активний в клітинних тестах, його фрагмент D-p.Thr може бути метаболічно лабільним через гідроліз в присутності неспецифічних фосфатаз. Негативно заряджена фосфатна група може протидіяти позитивному заряду CPP і зменшувати активність інгібітора.



$$17 K_D = 72 \text{ nM}$$

Рис.1.14 Структура клітинно-проникного біциклічного пептиду інгібітору PIN1.

Шляхом скринінгу бібліотеки пептидів [37] (рис. 1.14 (18)) та подальшої оптимізації (рис. 1.14 (19)) було виявлено новий нефосфорильований

біциклічний пептидний інгібітор PIN1 [37].

Отриманий біциклічний інгібітор є селективним, метаболічно стабільним та проникним у клітини, як продемонстрували тести на інгібування PIN1 *in vitro* [37].

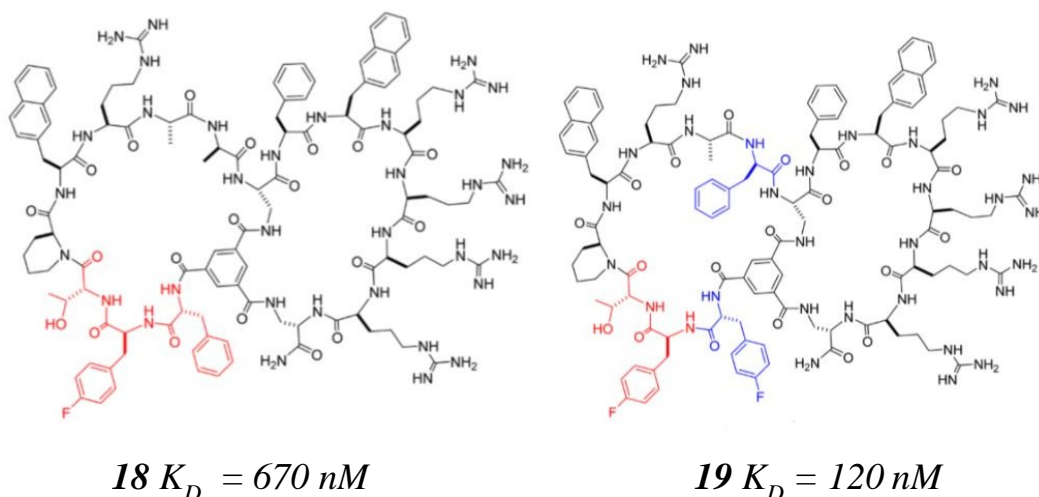


Рис. 1.14. Структура клітинно-проникного біциклічного інгібітору PIN1 після скринінгу (**18**) та подальшої оптимізації (**19**)

### 1.2.5 Проблеми існуючих інгібіторів

Проблеми застосування існуючих інгібіторів: неселективність, токсичність, непроникність у клітини, нестабільність, великий об'єм/маса, складність синтезу, неекономічність, обмежена вибірковість у доставленні до таргетної клітини [40].

Неселективність, висока токсичність характерні для малих молекул-інгібіторів. Через неселективність у цих інгібіторах є додаткові мішені, тому вони мають низьку ефективність інгібування у клітинах. Наприклад, тубулін - додаткова мішень для юглону, протеасома - для EGCG [13].

Для існуючих лінійних і циклічних пептидів-інгібіторів характерна нездатність проникнути у клітини і, як наслідок, низька ефективність у клітинах [38].

Проникність пептидів у клітини збільшується завдяки:

- утворенню внутрішньомолекулярних водневих зв'язків;
- N<sup>α</sup>-метилуванню пептидного ланцюга, що усуває донорну здатність його водневих зв'язків та збільшує імовірність утворення якомога більшої кількості утворення внутрішньомолекулярних стабілізуючих зв'язків (Surrogate Approach for Stabilization of Short Peptide Sequences)
  - Поліпшення транспорту в клітину за рахунок введення амінокислот, що сприятимуть цьому (н-д, Arg)
  - Зменшення полярної площі поверхні макроциклу.

Більшість циклічних пептидів не утворюють стабільні внутрішньомолекулярні водневі зв'язки, а N<sup>α</sup>-метилування може перешкоджати зв'язуванню мішені і генерує суміш стереоізомерів, деякі з яких можуть мати небажані наслідки біологічної активності [41].

Деякі циклічні пептиди нестабільні, як приклад можна навести сполуку **16** (рис. 1.14). Попадаючи всередину клітини, циклічний пептид **16** розщеплюється і має лінійну форму, на це можуть впливати різниці рН на його шляху до таргетної клітини та інші фактори. Тому такі циклопептиди не можуть використовуватися для інгібування внутрішньоклітинної активності PIN1 [13]. Також деякі пептиди показують чудові результати на білкових моделях та діють в наномолярному діапазоні, але абсолютно неактивні на клітинних лініях, тим більше в живих організмах.

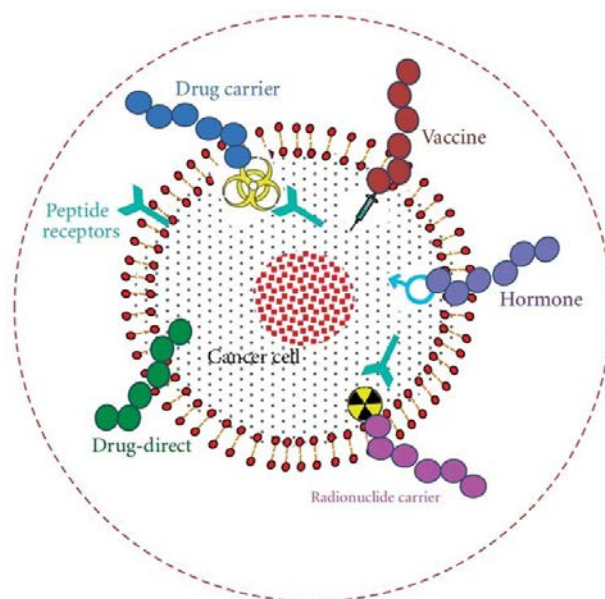
Великі молекули, такі як біциклічні пептиди-інгібітори, мають велику молекулярну масу та об'єм, на додаток до цього, вони не всі відповідають правилу Ліпінського. Через це їх важко застосувати у лікарських препаратах. Крім того, синтез таких молекул потребує значно більше часу та реагентів ніж для невеликих молекул, що є економічно не вигідним.

### 1.3. Лікарські засоби на основі пептидів та їх дія на організм

#### 1.3.1 Чому пептиди є цікавими для медичної хімії ?

Науковий та комерційний інтерес до біоактивних пептидів в останні роки невпинно зростає, особливо до розробок мембрано активних пептидів після серії невдач наприкінці 1990-х та початку XXI ст. Пов'язано це насамперед з розширенням ареалу досліджень пептидів як кандидатів для нових ЛЗ, змінами у їх розробці, а також з новими протоколами лікування тих чи інших захворювань [42].

Для такого «відродження» існує декілька причин. По-перше, проблеми, спричинені несприятливими фармакологічними характеристиками пептидів, такими як низький рівень *in vivo* стабільності та низький рівень біодоступності при оральному введенні були вирішені, також були знайдені раціональні принципи дизайну, що дозволяють оптимізувати параметри ADME. По-друге, прогрес у синтетичній методології та масштабування синтетичних процедур дали змогу виробляти пептиди за достатньо конкурентними цінами, що відкриває шлях до проведення економічно вигідних клінічних випробувань кандидатів на пептидні препарати та виготовлення ліків. По-третє, швидке поширення стійких до антибіотиків бактеріальних інфекцій, підйом у комерційній розробці антибіотиків, а також хіміотерапія, спричинена стійкістю розвинених пухлин до хемотерапії спонукали фармакологів до продовження досліджень у напрямку мембрано-активних пептидів як лікарських засобів [43] (рис.1.15). Згідно літературних даних затвердження кількості препаратів на основі пептидів різко зросло. Однак не дивлячись на очевидний прогрес, залишається ряд невирішених питань, що будуть розглянуті нижче.



*Рис.1.15 Різні можливі варіанти використання пептидів як лікарських засобів на прикладі лікування раку.*

Актуальними на сьогодні питаннями є:

- стабільність лікарського препарату при проходженні довгого шляху з різкими змінами рН та іншими різноманітними біологічними параметрами в організмі до місця призначення;
- обмежена вибірковість у доставці пептиду
- високий рівень токсичності циклопептидів.

Для вирішення вищезазначених проблем був запропонований кардинально новий підхід та стратегія до дизайну пептидних препаратів. Основною ідеєю даного підходу є перетворення лікарського засобу на світло-контрольований аналог та використання його як фотофармакологічного агенту (рис. 1.16).

Контрольовані світлом препарати можна вводити в організм у неактивній, менш токсичній формі, а потім активувати світлом лише тоді і в тому місці, де це є необхідним для лікування. Активація світлом може бути здійснена з дуже високою просторово-часовою точністю. Використання фотоконтрольованих препаратів, що мають сприятливі фармакологічні властивості, допомагає в рази

підвищити вибірковість місцевої терапевтичної дії та знизити загальну токсичність [43].

### 1.3.2 Фотодинамічна терапія

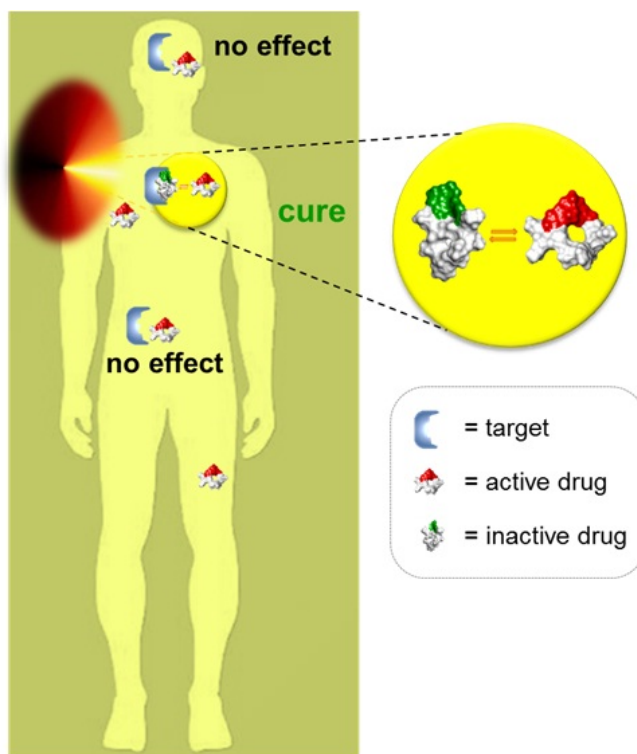
Згідно літературних даних ліки-кандидати для лікування раку, як правило, мають низький показник успіху [43]. Статистично було показано, що шанси на схвалення нового протипухлинного хіміопрепарату після вступу кандидату в І клінічну фазу випробувань були одними з найнижчих серед усіх перевірених сполук-лідерів протягом останніх 10 років [44]. За даними Food and Drug Administration (FDA) 2017 року через високу токсичність було відкинуто більш ніж 90% сполук-кандидатів на лікарські засоби (ЛЗ).

Така ситуація прямо пов'язана з основною проблемою хіміотерапії раку - неселективністю, в результаті чого страждають як здорові, так і уражені тканини. Тому таргетна доставка протипухлинних препаратів є рішенням даної проблеми, адже дозволяє точково впливати на онкоклітини.

Селективність дії ЛЗ може бути підвищена шляхом прийому та доставки відносно безпечної речовини до місця ураження з її подальшою локальною активацією. Починаючи з початку минулого століття вчені почали досліджувати кардинально інший підхід пухлинно-селективного та малоінвазивного лікування раку, що носить назву «фотодинамічна терапія» (PDT) [45]. Перевагами даного методу є застосування ЛЗ, який прямо чи опосередковано активується світлом, таким чином гарантуючи локальність дії.

Слід відмітити, що вже тоді термін «фотодинаміка» був одним з найуживаніших у фотобіології, а сам процес був детально описаний *Spikes* для того часу [46]. Дослівний переклад опису методу є таким: «У цьому фотохіміотерапевтичному методі пацієнт приймає фотосенсибілізуючий препарат, що вибірково затримується у пухлинах. Після відповідного періоду пухлинна область освітлюється, як правило, лазером, що призводить до

руйнування пухлини з відносно невеликим пошкодженням навколишніх «здорових» клітин» [47, 48] (рис.1.16) .



*Рис.1.16 Загальна схема ,що описує дію фотофармакологічного агенту в організмі людини.*

Згідно літературних даних, перші препарати PDT, що викликають загибель ракових клітин при опроміненні пухлин *in vivo* вводили в клініку вже у II половині минулого століття. На початку 1970-х років вчені почали досліджувати вплив такого лікування на злоякісні пухлини щурів [49]. Пізніше у 1984 році, згадується використання FDT у польових умовах, після цього термін «фотопротенева терапія» ввійшов у загальне використання [50].

На сьогодні FDT препарати не є цитотоксичними. Вони діють як фотосенсибілізатори, що переносять енергію від фотонів до молекулярного кисню, який після цього активується до високореакційноздатного синглетного

стану. Реакційні каскади, ініційовані синглетним киснем руйнують навколишні клітини, що викликає терапевтичний ефект [51] (рис.1.17).

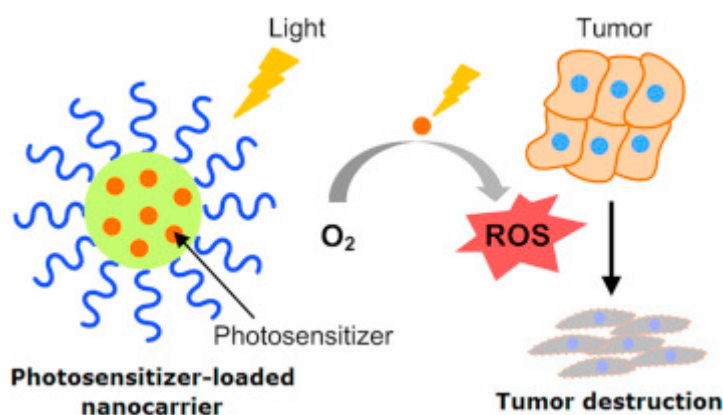


Рис.1.17 Схематичне зображення основного процесу FDT

Для даного розділу можна зробити ряд висновків, окреслюючи основні терміни та процеси методу:

- Фотодинамічна терапія (FDT) – це варіант лікування, при якому активація фотосенсибілізаторів ЛЗ за певної довжини хвилі світла призводить до передачі енергії молекулам кисню та подальшої генерації цитотоксичних високореакційноздатних форм кисню (ROS), що викликає апоптоз чи некротичну загибель клітини.
- За відсутності зовнішнього фотоактивуючого світла препарати мають мінімальну токсичність.
- FDT забезпечує безпечний та ефективний спосіб селективного знищення цільових клітин/тканин, уникаючи виклику системної токсичності та побічних ефектів на здорові тканини.
- Лікування раку на основі FDT значно зменшує побічні ефекти.
- Має високоспецифічну дію, оскільки піддається лікуванню лише після світлового опромінення.

Незважаючи на численні переваги даної терапії над класичними методами лікування раку, FDT все ще не повністю клінічно адаптований через ряд особливостей препаратів фотосенсибілізуючої дії:

- Основна частина представників активних сполук є гідрофобними та погано розчинними у воді. Вони легко агрегуються у фізіологічних умовах, різко знижуючи квантові виходи утворення синглетного кисню. Також слід відмітити, що у деяких модифікованих препаратів їх об'єм накопичення в тканинах/клітинах-мішенях залишається недостатнім для успішного клінічного використання [52].

- Одним із варіантів систем перенесення ліків на основі фотосенсибілізаторів є поєднання наноматеріалів чи ліпосом з препаратами FDT [52], що в свою чергу ускладнює процес отримання та використання готових субстанцій.

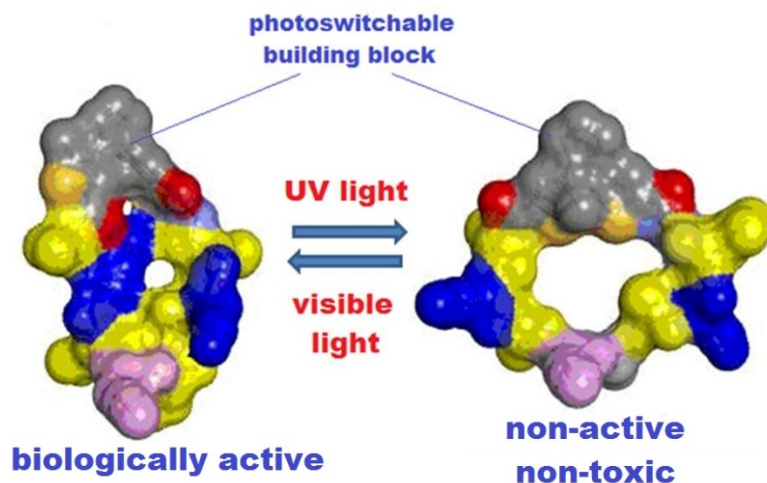
- Сучасні протипухлинні препарати для FDT є кисневозалежними. Вони потребують достатньої кількості молекулярного кисню в пухлинах. Однак, тверді злоякісні новоутворення ростуть і проліферують дуже швидко, відповідно і споживають кисень, в результаті чого виникає недостатня кількість його постачання. Таке середовище всередині тканини може індукувати інвазивність та стійкість, що несуть високий ризик утворення нових метастаз та рецидивів [53].

Отже, як бачимо, даний метод має велику кількість як переваг, так і недоліків. Тому знайти вирішення цих питань стало завданням номер один для вчених.

### **1.3.3 Фотофармакологія**

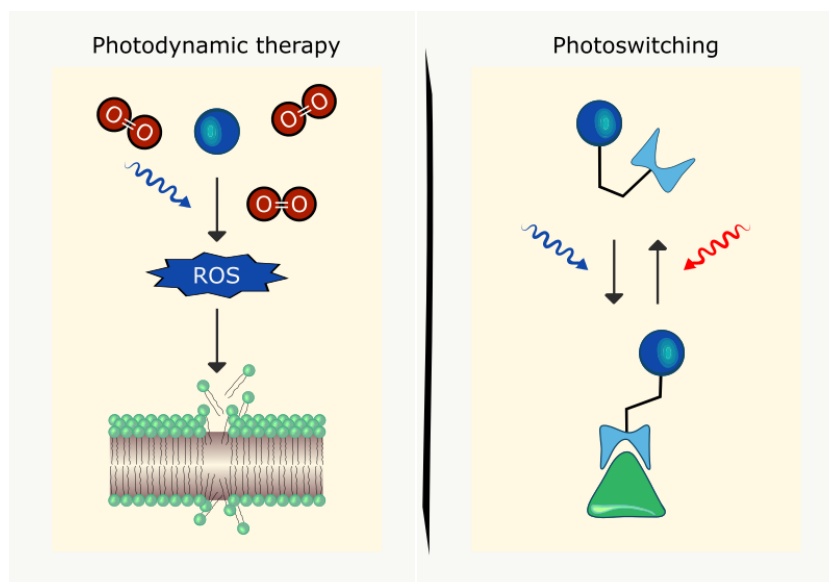
Фотофармакологія – це відносно новий підхід у медицині, який базується на оборотній активації/деактивації фотосвіч-молекул при опроміненні світлом. Під процесом перемикання слід розуміти зміни просторової будови та хімічних

властивостей діючих речовин ЛЗ, що в свою чергу призводить до появи нової біологічної активності (рис. 1.18) [55].



*Рис.1.18 Головна ідея методу фотофармакології*

Кінцевою метою фотофармакології є розробка сполук, які можна застосовувати у живих системах у неактивній формі, а потім конвертувати їх у активну форму за допомогою світла з високою просторово-часовою роздільною здатністю. При цьому не утворюються небажані побічні продукти, на відміну від доставки ЛЗ традиційним шляхом. Очікується, що ліки з оборотним світловим контролем покажуть сприятливі фармакологічні характеристики, серед яких: висока селективність терапевтичної дії, зниження загальної токсичності для організму, а також підвищення безпеки ЛЗ, що може підвищити його успіх у клінічному застосуванні. Крім цього, оборотно фотоконтрольовані біоактивні сполуки у фармакології набирають оберти як цінні інструменти для досліджень в галузі біохімії, структурної та хімічної біології, біофізиці, матеріалознавстві та інших галузях, де вони можуть допомогти отримати фундаментальні знання про біологічні системи [55].



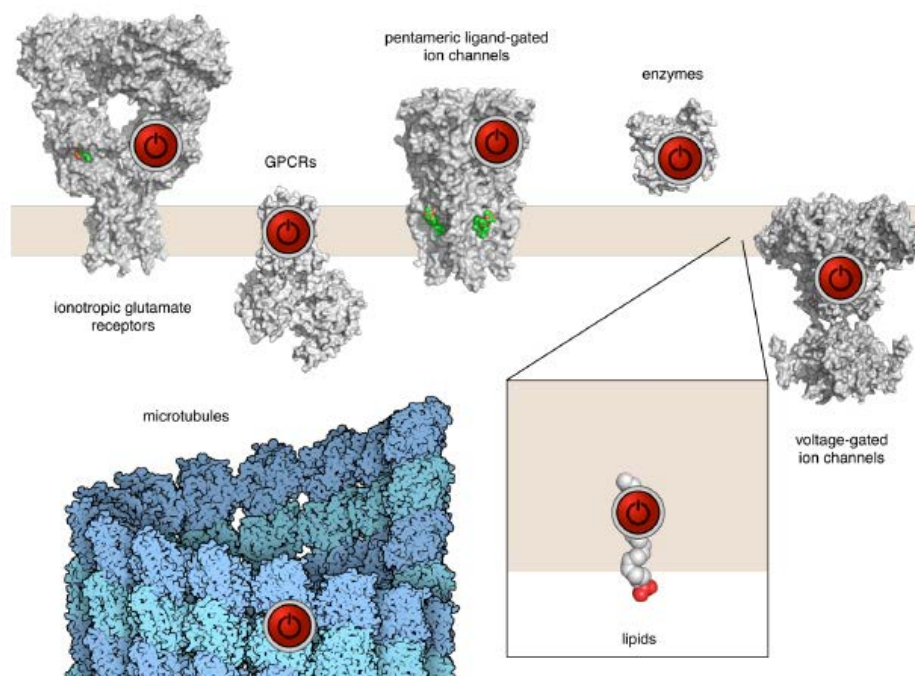
*Рис.1.19 Порівняння механізму дії фотодинамічної терапії та фотофармакології [54]*

На рис.1.19 ми бачимо схематичне порівняння основного механізму FDT та фотофармакології. З першого погляду можна зробити висновки, що вони є схожими та кардинальної різниці немає. Це пов'язано з тим, що фотофармакологія – це загальний термін, що описує ідею доставки та активації ЛЗ в необхідне місце за стандартно описаним протоколом, а FDT – це один з методів фотофармакології, але механізм дії інший. Основними відмінностями даних механізмів (підходів) є:

- у FDT використовуються фотосенсибілізатори, за участі яких, при опроміненні генерується синглетний кисень, а його дія призводить до апоптозу сусідніх ракових клітин;
- у фотофармакології використовуються речовини, котрі можуть змінювати свій конформаційний стан під дією світла. Обидва стани мають різну просторову будову, котра в свою чергу впливає на активність препарату.

Згідно літературних даних, фотоперемикачі можуть бути ковалентно приєднані до лігандів, як у більшості природних фоторецепторів або ж бути тісно зв'язаними через нековалентні взаємодії. Такі структури називають «фотоперемикаючими лігандами» чи «фотофармакологічними препаратами»,

обидва терміни застосовуються до широкого спектру біологічних цілей. Сьогодні до них належать іонні канали, GPCR (рецептори, пов'язані з G-білком), транспортери, ферменти, елементи цитоскелету, ліпіди (рис.1.20) [55].



**Figure 1.** Targets of photopharmacology. Ion channels, GPCRs, transporters, enzymes, components of the cytoskeleton, and lipids have been placed under optical control with photoswitchable ligands.

*Рис.1.20 Мішені фотофармакології: іонні канали, GPSR, транспортери, ензими, компоненти цитоскелету, ліпіди*

Дослідниками було наведений такий алгоритм фотофармакологічного підходу до лікування:

1. Спочатку в організм людини вводиться лікарський засіб з активною речовиною (фотокерований засіб), після чого він всмоктується/накопичується клітинами організму.

2. Обов'язковою властивістю препарату повинна бути більша абсорбція в пухлині, ніж в здорових тканинах. Через певний проміжок часу препарат в максимально можливій кількості накопичується в потрібному місці.

3. Наступним кроком є проведення локалізованого опромінення ураженої частини тіла людини, при якому фотосвіч змінює свою конформацію

та активує лікарський препарат.

Даний метод боротьби з раковим захворюванням є більш м'яким, оскільки не потребує жорсткої хіміотерапії та є локалізованим у певній ділянці, а не у всьому організмі.

#### 1.3.4 Побудова фотофармакологічного лікарського засобу

Для того, щоб фотокерований ЛЗ спрацював, необхідно достатньо багато часу приділити проектуванню його діючої сполуки. Основні вимоги до фотоперемикаючого агенту мають наступний вигляд:

- Обрати оптимальний фрагмент (молекулу), здатний до фотоізомеризації (фотосвіч).

Бажаною умовою для ізомерів є стабільність після опромінення, тобто ізомери повинні бути стабільними в умовах дії інших чинників, наприклад, температури. Ідеальним варіантом для цього є дизайн такої структурної одиниці, що буде повністю перемикатися між 2 різними фотоізомерними станами у різних світлових діапазонах.

- Необхідною умовою є вибір ліганда, ефективність якого після фотоперемикання буде суттєво змінюватись.

- Обрані біотести мають бути сумісними з опроміненням.

Після вибору фотоперемикача його вбудовують у молекулу таким чином, щоб ефективність новоутвореного ліганду була кардинально іншою після опромінення. В ідеалі отриманий ліганд має бути активним як агоніст, антагоніст, тощо в одній конфігурації та повністю неактивним у іншій.

Отриману молекулу перевіряють на розчинність та стабільність в середовищі її дії. Якщо мішень є внутрішньоклітинною варто на це особливо звернути увагу, бо ж перш ніж потрапити до мішені ЛЗ необхідно пройти крізь мембрану. Для вирішення цієї проблеми вже знайдені певні рішення, наприклад, можна використати ліпосоми – як транспортери-контейнери тощо.

Важливим етапом планування синтезу є те, що він має допускати хімічно просте молекулярне урізноманення корової структури бажано на пізніх етапах синтезу. Ці модифікації дозволять дослідити нові специфічні взаємодії, які дозволять покращити зв'язування з мішенню. Також варто враховувати економічні витрати, що забезпечать можливість виготовлення фотофармацевтичних препаратів у реальні терміни та за виправдані витрати.

Процес проектування в даному випадку є одним із ключових та включає багато нюансів. Тому варто не лише вивчати літературу, а й проводити іншого роду дослідження для пошуку та моделювання кращих фотоперемикаючих сполук для подальшого дослідження їх клініки [55].

### **1.3.5 Фотоперемикаючі матеріали**

Протягом останніх років досить швидко популярність набирають флуоресцентні фотоперемикаючі матеріали. Вони є перспективними у застосуванні в різних галузях знань: молекулярних базах зберігання та обробки даних, хімічному зондуванні та мікроскопічних методах на основі флуоресценції з високою роздільною здатністю [56]. Ці матеріали завжди базуються на фотохромності молекули. Серед найвідоміших їх представників: азобензен [57], спіропіран [58], діарилетен [59], тощо (рис.1.21). При дії на них зовнішнім подразником – світлом, вони зазнають оборотних змін у хімічній структурі, геометрії чи розподілі заряду, що в свою чергу призводить до зміни просторових змін.

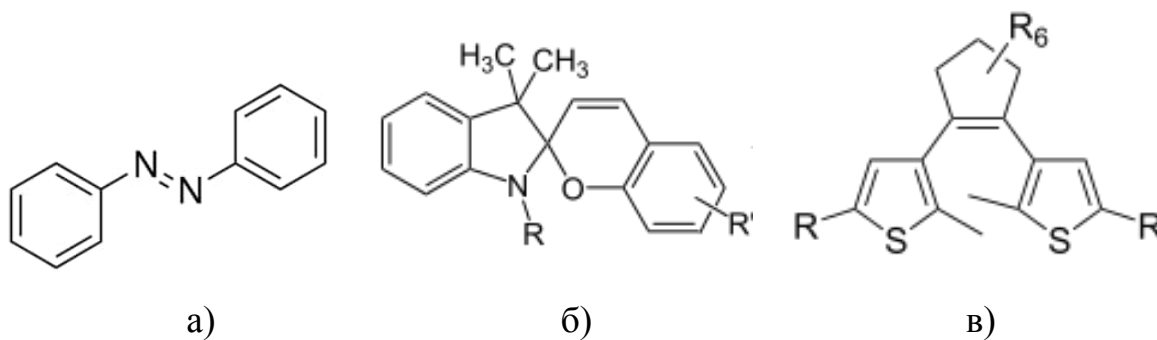


Рис.1.21 Найвідоміші фотохромні сполуки, що мають інтерес для фотофармакології: а) азобензол, б) спіропіран, в) діарилетен

Історично першим фотосвічем був азобензен (рис. 1.22). Здатність використовувати світло для взаємоперетворення однієї ізомерної форми до іншої відкрили в 1930-х роках. Його характеристики як фотоперемикаючого елементу були досить глибоко досліджені. Так, було виявлено, що бар'єр між двома його конфігураціями є дуже великий (22 Kcal/mol). Даний фотосвіч характеризують легкість синтезу та високий вихід фотоізомеризації, а також її швидкість. Можна сказати, *цис*- та *транс*-конфігурації суттєво відрізняються за будовою, і саме це є ключовим фактором вибору багатьох дослідників у галузі фотофармакології саме цього фотосвіча.

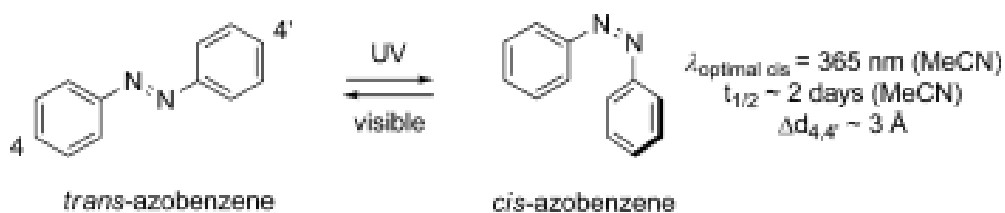


Рис.1.22 Історично перший photoswitch – азобензен та процес його фотоперемикання.

Згідно роботи *Fuchter*, азобензен є ефективним фотоперемикачем, що демонструє високі коефіцієнти екстинції та квантові виходи. Дані особливості дозволяють йому перемикається за світла низької інтенсивності, також він є стійким до багаторазового перемикання протягом багатьох циклів [60].

Але даний фотосвіч також має свої недоліки. Перш за все, він є забарвленим та здатним до фотодеградації. Останній фактор заважає при проведенні тестів на біологічну активність азобензенвмісних пептидів (скринінг-аналізи на основі флуоресценсії), адже дані можуть бути хибними, що не дозволяє побачити повну картину досліджень, а також нестабільність та потенційну токсичність діазофрагменту [55].

Наступною описаною генерацією фотоперемикачів є діарилетен та його похідні. Вони вважаються одними із найбільш перспективних кандидатів для фотоперемикання через набір таких переваг (рис.1.23):

- Термостабільність обох ізомерів
- Стійкість до деградації
- Швидка відповідь на дію світла
- Висока чутливість
- Відсутність оборотної ізомеризації за фізіологічних умов [61]

При опроміненні УФ- та видимим світлом такі блоки можуть піддаватись конформаційній ізомеризації між безбарвною кільцезакритою формою та кольоровою кільцезакритою формою. Після відповідної структурної модифікації діарилетеном, похідні цільової сполуки набувають флуоресцентних властивостей, можливості перемикання та фотоізомеризації під дією світла. Стабільність обох фотоформ забезпечує точність дозування, що є надважливим для прийняття препарату у фазу клінічних досліджень (рис. 1.23) [62]. Наявність цих характеристик може застосовуватись для відстеження однієї молекули в мікроскопії з надвисокою роздільною здатністю.

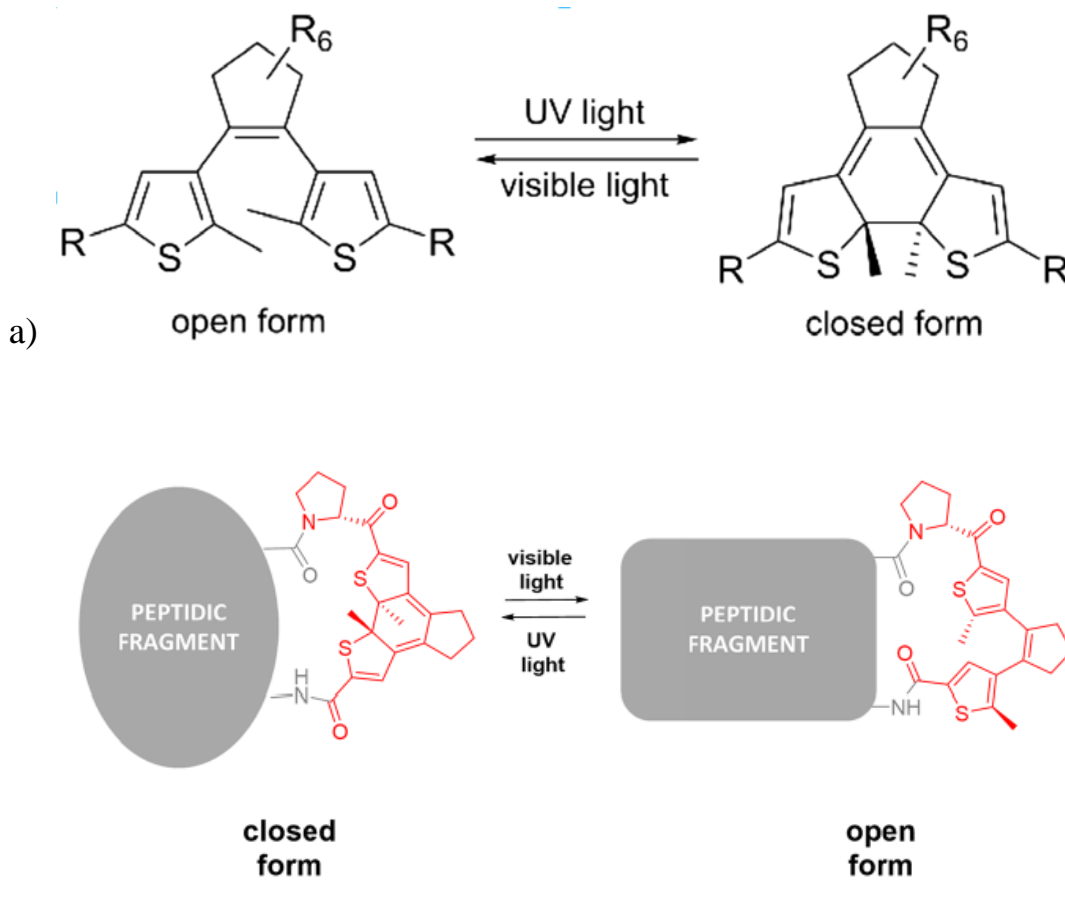


Рис. 1.23. Схематичне зображення DAE та його оборотного взаємоперетворення між двома термічно стійкими фотоформами (а). Фрагмент фотоперемикання, що містить DAE зображений червоним кольором (b)

Такі сполуки також можна використовувати як молекулярні перемикачі для зручної модуляції випромінювання люмінесцентних матеріалів [63].

Цікавим є факт, що DAE у замкненому стані може гасити флуоресценцію сусідніх флуорофорів, а кільце у розкритій формі не впливає на флуорофори розміщені поблизу. Тож виходячи з цього можемо сказати, що люмінісцентні властивості складної системи можуть фотохімічно перемикатись під дією фотоізомеризації DAE-фрагменту, що в свою чергу індукується зовнішнім світлом.

З іншого ж боку, спряжені полімери мають дальність дії за рахунок  $\pi$ -кон'югації у скелеті, що наділяє молекулу додатковими властивостями,

наприклад, високими квантовими виходами флуоресценції, хорошим світло поглинанням, а також гарним випромінюванням [64]. Таким чином способи отримання ефективної DAE-вмісної сполуки з  $\pi$ -спряженою системою для отримання ефективного фотоперемикача є актуальним завданням і на сьогодні. Саме тому через велику кількість переваг таких сполук нами було вирішено дослідити потенціал диарилетенвмісних пептидоміметиків для лікування раку.

## 2 РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

### 2.1 Створення циклопептидів з високою біологічною активністю – нових потенційних інгібіторів

Нами було змодельовано та синтезовано нові циклічні пептиди-інгібітори PIN1 (рис.1.24)

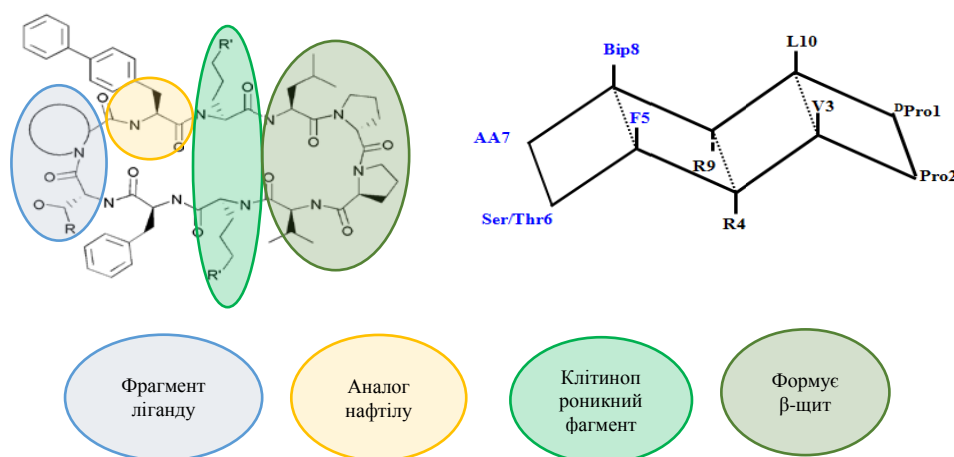


Рис.1.24. Структура нових циклічних пептидних інгібіторів PIN1

Ми припускаємо, що дані макроцикли будуть зв'язуватись з С-кінцевим доменом PIN1. Активний центр розпізнає Ser/Thr-Pro фрагмент циклопептиду. Ми припустили, що фрагмент з бісфенілаланіновою амінокислотою та Pro-залишком буде зв'язуватись з гідрофобною частиною активного центру, що містить Leu122, Phe125, Met130 та Phe134. А Ser/Thr-Phe фрагмент зв'язуватиметься з полярною частиною кишені активного центру, що містить позитивно заряджені амінокислотні залишки Lys63, Agr69, Arg69. Введена амінокислотна послідовність Val-L-Pro-D-Pro-Leu є класичним початком β-складчатого щита та відповідно ідеально підтримує необхідну структуру, як показали модельні дослідження. Також припускається, що завдяки доданим двом аргініновим залишкам, інгібітор матиме кращу проникність у клітини та

виходячи з цього, біодоступність майбутнього лікарського засобу буде достатньою.

Для тестування інгібуючої дії та майбутнього втілення ідеї створення фотоперемикаючих макроциклів, що стануть інгібіторами ізомерази PIN1 нами було синтезовано 6 циклопептидів з класичним  $\beta$ -складчатим листом. Після очистки їх було передано на дослідження їх як інгібіторів. Отримані результати послугували вихідною точкою для встановлення необхідної макроциклічної платформи.

Аналізуючи всі результати, ми визначили лідер-сполуку з вибірки пептидоміметиків та її складові частини. Після цього до її складу було введено фотосвіч-елемент та проведені наступні дослідження на інгібуючу дію. Детально кожен з цих етапів описано далі.

## 2.2 Синтез макроциклів – інгібіторів

Для синтезу макроциклів був застосований метод твердофазного пептидного синтезу (ТФПС). Його загальна схема представлена на схемі 1.1.

ТФПС – це процес, в якому пептид збирають шляхом послідовного додавання захищених амінокислот, що складають його послідовність (схема 1.1). Пептид закріплений до нерозчинного полімеру С-кінцевою амінокислотою через лінкер [65].

Продукт виділяють простим фільтруванням, оскільки зростаючий ланцюг пов'язаний з нерозчинним полімером. Для повного очищення проводять промивання з відповідними розчинниками. Це забезпечує повне видалення продуктів розщеплення після етапу зняття захисної групи, а також усуває надлишок реагентів та побічних продуктів, які утворились в результаті стадії каплінгу.

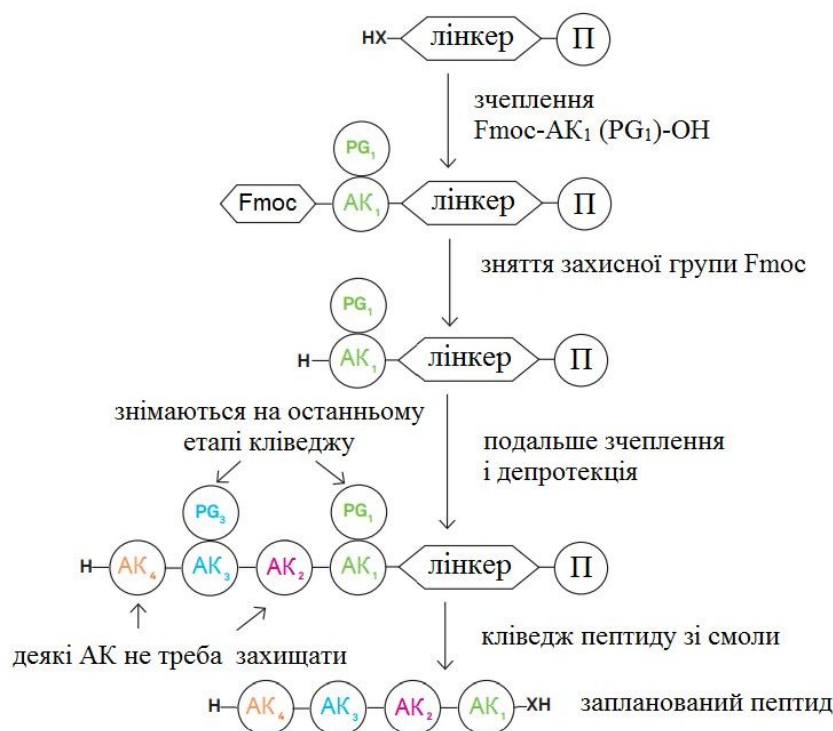


Схема 1.1 Загальна схема твердофазового пептидного синтезу.  $X = O$ ,  $NH$ ,  $AK$  - амінокислота,  $PG$  - захисна група,  $\Pi$  - смоли.

Для ТФПС було обрано Fmoc стратегію (див. стандартний протокол Fmoc). Використали полімерну основу полістерол, лінкер - 2-хлортритилхлорид Novabiochem® (завантаження - 0.7 ммоль/г смоли). При виборі стратегії ми опирались на економічність, доступність реагентів, селективність та швидкість проведення синтезу.

Перша стадія у стратегії Fmoc - каплінг першої амінокислоти зі смолою через лінкер. Цей етап проводиться за *стандартним протоколом 1* (див. 2.1.1).

Зняття Fmoc проводиться за *стандартним протоколом 2* (дивись 2.1.2).

Подальше нарощування пептидного ланцюга відбувається за рахунок введення  $N_\alpha$ -захиснених амінокислот у ТФПС. Цей процес включає активацію нової амінокислоти та подальшу конденсацію амінокислот. Цей етап проводиться за *стандартним протоколом 3* (див. 2.1.3).

Для моніторингу каплінгу проводили нінгідриновий тест Кайзера за *стандартним протоколом 4* (див. 2.1.4). Це - метод контролю повноти реакції

пептидоутворення.

Подальші стадії синтезу сполук представлені на схемі 1.2

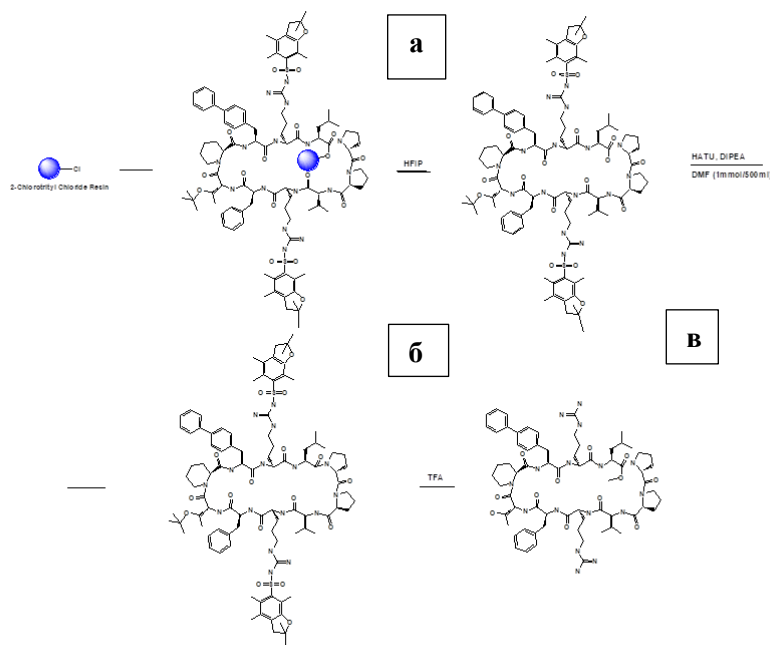


Схема 1.2 Схема синтезу нових макроциклічних інгібіторів

а) зняття нарощених пептидів з полімерної підложки

б) циклізація, в) зняття захисних груп

Зняття нарощених пептидів з полімерної підложки проводиться за стандартним протоколом 5 (див. 2.1.5) (схема 1.2а).

Після висушування отриманий лінійний пептид циклізують за стандартним протоколом 6 (див. 2.1.6) (схема 1.2б). Циклізації пептидів сприяє те, що з С-кінцевої сторони пептиду утворюється кислота, з іншої - основа.

Фінальна стадія зняття захисних груп та очистка проводиться за стандартним протоколом 7 (див. 2.1.7) (схема 1.2в).

## 2.3 Аналіз отриманих сполук

В рамках цього дослідження було синтезовано 6 макроциклів, а також для порівняння - два циклопептиди з попередньої роботи, що показали достатню інгібуючу дію на ензим PIN1. Отримані дані були використані для виконання поставлених перед нами задач, а саме перевірки впливу варіацій структури у основній макроциклічній платформі (рис. 1.25).

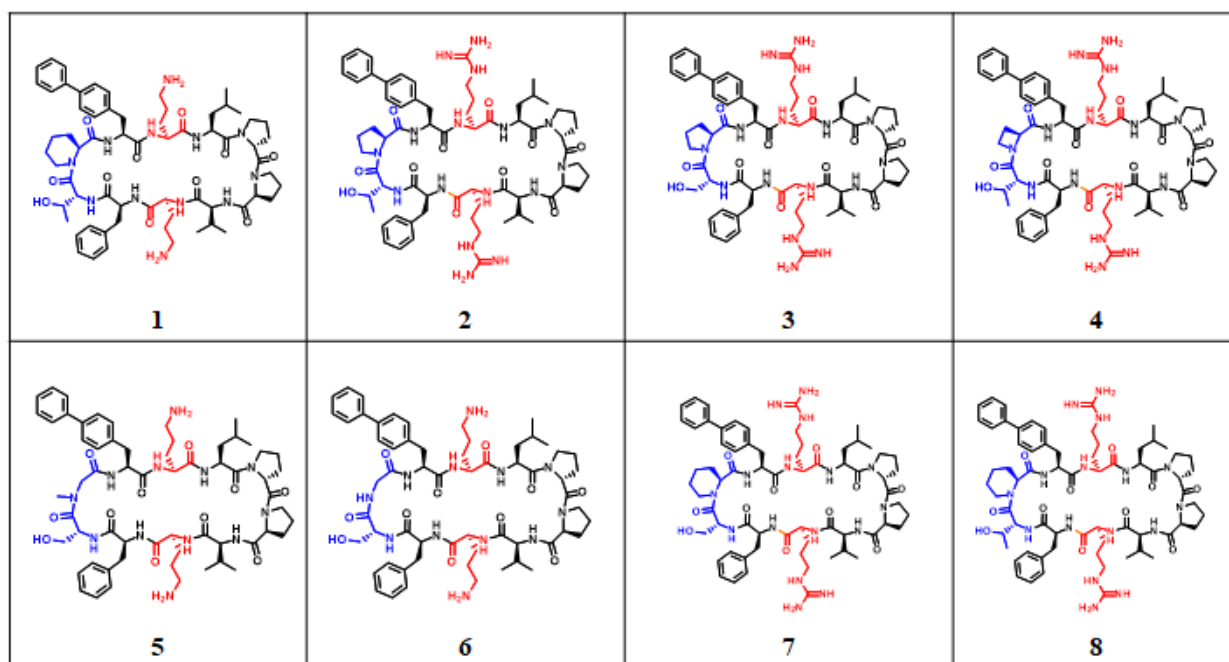


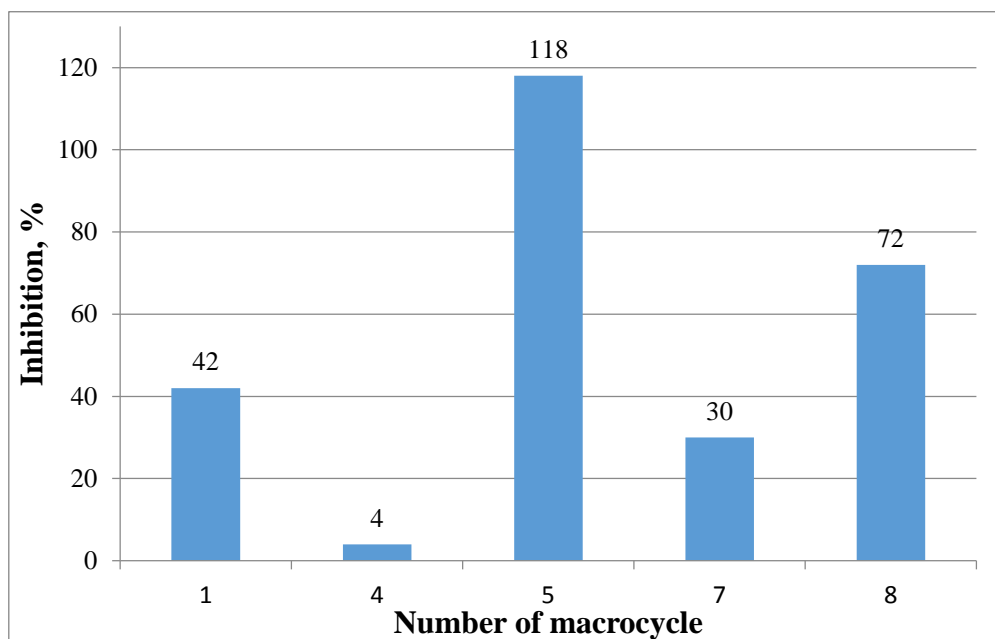
Рис. 1.25 Синтезовані макроцикли-інгібітори PIN1

Відповідність структур **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7** формулам підтвердили за результатами LCMS методу у поєднанні з мас-спектрометрією (Додаток ). Молекулярні маси сполук **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7** дорівнюють 1216,7, 1286,57, 1272,71, 1271,71, 1162,65, 1148,64, 1287,57, 1301,61 Ці значення співвідносяться з даними мас-спектрометрії:  $[M+1]_1= 1218$ ,  $[M+1]_2= 1287$ ,  $[M+1]_3= 1273$ ,  $[M+1]_4= 1272$ ,  $[M+1]_5= 1164$ ,  $[M+1]_6= 1150$ ,  $[M+1]_7= 1289$ ,  $[M+1]_8= 1303$ . Чистота отриманих сполук складає 100%.

Попередньо вони були очищені методом HPLC (Колонка SunFire 18; елюент А – вода, елюент Б – ацетонітрил (градієнт: 0-20-100%); 10-хвилинний

метод), а після цього частина була передана компанії 'Bienta' для перевірки на інгібуючу дію, в результаті чого отримано перші результати.

Під час скринінгу ми планували перевірити структурну заміну проліну на інші циклічні амінокислоти, а також менші за об'ємом саркозин та гліцин. Перші результати досліджень наведені на рис. 1.28.



*Рис. 1.28. Результати інгібування циклопептидами з попередньо синтезованої бібліотеки, оцінка заміни Pro на інші аліфатичні АК*

Дослідження показало, що серед циклічних амінокислот найвищу інгібуючу дію має сполука **5** з саркозином та орнітином у структурі. Такий результат дещо спантеличив нас, адже зовсім не був очікуваним. Найбільш повне та цитоване вище дослідження [34] стверджує, що механізм зв'язування циклопептидів з PIN1 побудований на гіпотезі «гідрофобної кишені», яка вміщує в собі циклічний пролін і таким чином сприяє підвищенню інгібуючої сили, а N-метильний фрагмент не зможе її заповнити. Після обговорення отриманого результату та аналізу літератури ми вирішили, що в даному випадку мають місце й інші взаємодії між пептидом та PIN1, тому сполука **5**, на сьогодні, не є кращим інгібітором з дослідженого ряду макроциклів та потребує

часу для аналізу літератури та пошуку причин такої аномально сильної взаємодії.

Сполукою-лідером серед нашої бібліотеки став циклопептид **8**, що підтвердив встановлені в попередньому дослідженні характеристики для *core* структури. Другою за інгібуванням є сполука **1**. Її результат не суттєво відрізняється від результату сполуки **7** і це лиш доводить вищеописану гіпотезу зв'язування [34]. Сполука **4** має найнижчий показник інгібування. З чого можемо зробити висновок, що за зменшення величини циклу в остові циклопептиду сила їх взаємодії помітно падає.

На жаль, для сполук **2, 3, 6** ми не встигли отримати результати, але після отримання певної закономірності із нашого експерименту можемо прогнозувати, що пептид **6** буде мати низький параметр інгібування (якщо не враховувати можливі конкуруючі взаємодії), а **2, 3** – середні показники.

Отримані результати доводять описану в літературі інформацію взаємодії PIN1 та її інгібітора, а також підтверджують створену раніше нами модель-фармакофор для сполуки-лідера. Вона включає в себе піпеколінову кислоту, біс-фенілаланін, треонін, класичний бета-складчатий щит та 2 аргініни. (рис. 1.27)

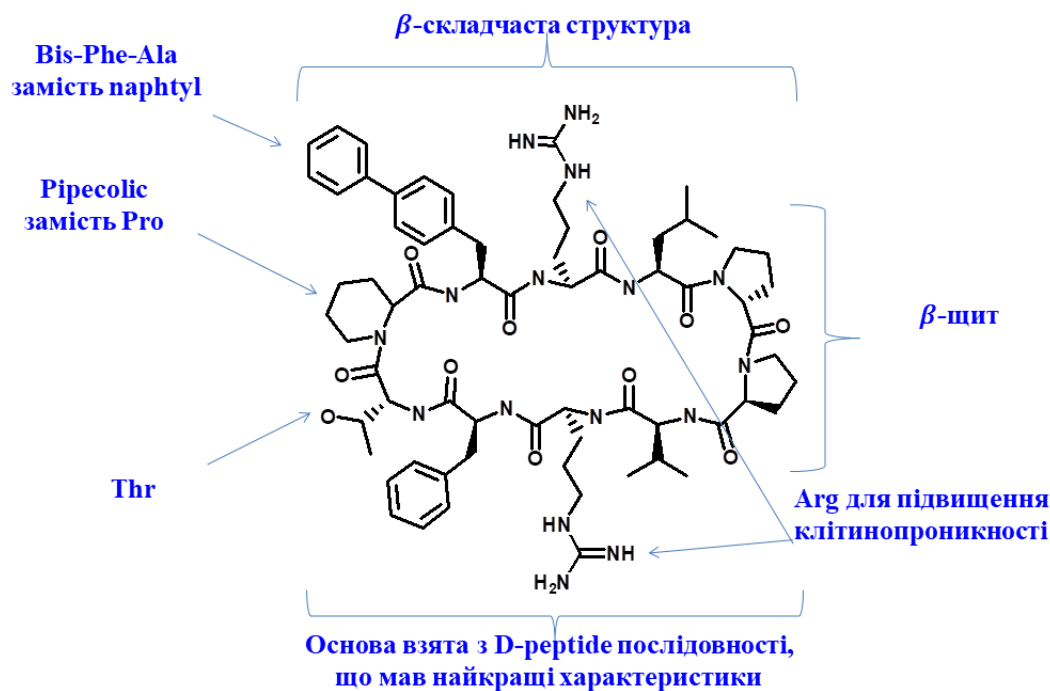


Рис.1.27 Повна модель потенційних інгібіторів PIN1

## 2.4 Синтез пептидів з фотосвіч-елементом

Фотосвіч-аналог сполуки **8** був вже синтезований в рамках нашої попередньої роботи, але через те, що і в даному дослідженні така послідовність проявила повторно високу біологічну активність ми ресинтезували її додатково. Даний процес було здійснено методом ТФПС (схема 1.3). Після чого отриманий макроцикл був відправлений на біологічні дослідження в компанію «Bienta».

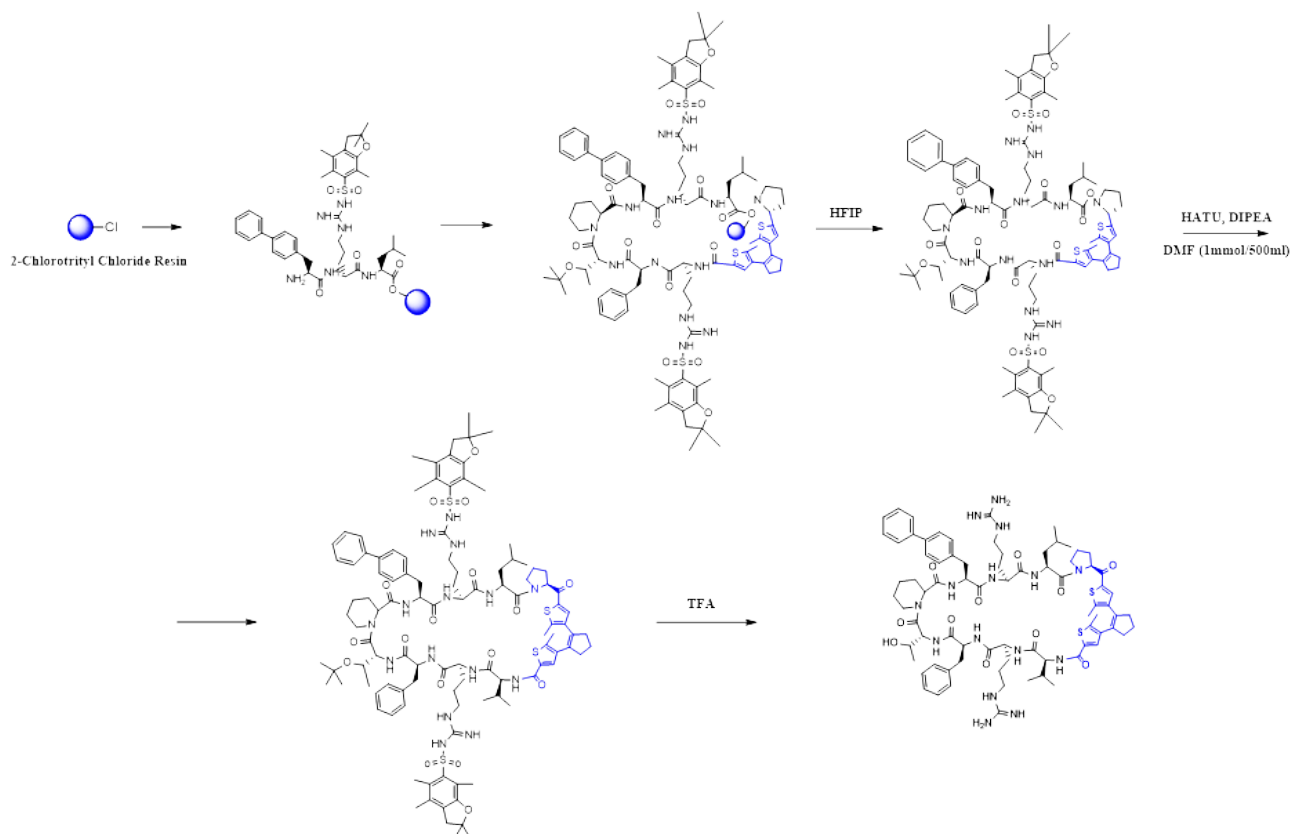


Схема 1.3. Синтез циклопептиду з фотосвіч-елементом

Тож, сумуючи ці та попередні результати ми виявили та підтвердили сполуку-лідер, синтезували її фотоконтрольований аналог та передали для дослідження інгібування при опроміненні за різних довжин хвиль. Надалі ми плануємо перевірити інші структурні заміни *core* структури, що дозволять приблизити нас ще ближче до ідеального інгібітора ізомерази PIN1.

## 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 3.1 Методики експерименту

Усі методики для проведення експерименту були взяті з книги W. C. Chan, P. D. White «Fmoc solid phase peptide synthesis» 2000 року від видавництва Оксфорду [66]. Ця книга - практичне керівництво, повністю присвячене стратегії Fmoc/tBu твердофазного пептидного синтезу (ТФПС).

#### 3.1.1 Методика естерифікації першої амінокислоти на смолу

*Стандартний протокол 1.* Естерифікація першої амінокислоти на 2-хлоротритил хлоридній смолі.

Обладнання та реагенти:

- ✓ Твердофазовий реактор
- ✓ Fmoc-амінокислота, DCM, DMF, Гексан, 2-Хлоротритил хлоридна смола, DIPEA, MeOH, Піперидин, Ізопропанол.

Методика:

1. В твердофазному реакторі суспендували 0,142 г 2-хлортитрил хлоридної смоли (0.1 ммоль) у 0,8 мл DCM протягом 5 хв, і фільтрували смолу.
2. Додали до смоли розчин з 0,2 ммоль Fmoc-Leu та 0,5 ммоль DIPEA, розчиненого в 0,8 мл DCM. Збовтали протягом 30 хвилин при кімнатній температурі і відфільтрували смолу.
3. Промили смолу DMF, збовтуючі протягом 2 хвилин (2 рази).
4. Додали до смоли 5 мл суміші DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5), збовтали протягом 10 хвилин та відфільтрувати (2 рази).
5. Промили смолу 3 мл DMF (3 рази). Відфільтрували смолу.
6. Додали 1 мл 25%-го піперидину в DMF, збовтали протягом 3 хвилин і відфільтрували. Повторили протягом 20 хвилин.

7. Промили смолу 3 мл DMF протягом 2 хвилин (6 разів). Відфільтрували смолу.

### 3.1.2 Методика зняття захисної групи Fmoc

*Стандартний протокол 2.* Зняття захисної групи Fmoc.

Реагенти:

✓ 20% піперидин в DMF (v/v)

Метод:

1. Помістили пептидилову смолу в реактор для ТФПС.
2. Промили полімерну підложку 10 мл DMF (2 рази).
3. Додати приготовлений розчин реагенту. Збовтувати протягом 5 хвилин (повторити на 20 хвилин).
4. Промили полімер DMF (5 разів).

### 3.1.3 Методика активації та конденсації амінокислот

*Стандартний протокол 3.* TBTU активація та подальша конденсація амінокислот.

Реагенти:

✓ Fmoc-амінокислота, HOBT, DMF, TBTU, DIPEA

Методика:

1. У скляну пробірку помістили Fmoc-амінокислоту (5 екв.), HOBTc (5 екв.) та TBTU (4,9 екв.).
2. Додали мінімальний об'єм DMF до повного розчинення. Додали DIPEA (10 екв.), ретельно перемішали.
3. Додали розчин до смоли з N-деблокованим пептидом.
4. Агрегували смолу, збовтуючи протягом 1 години.
5. Провели нінгідриновий тест Кайзера (протокол 4, дивись нижче) на наявність вільного аміну у розчині. Якщо тест був позитивний, то повторили пункти 2-4.

### 3.1.4 Методика моніторингу каплінгу амінокислот

*Стандартний протокол 4.* Нінгідриновий тест Кайзера [67].

Реагенти:

✓ 5% нінгідрин в етанолі (w/v), 80% фенолу в етанолі (w/v), KCN у піридині (2 мл 0.001 М KCN у 98 мл піридину)

Методика:

1. Промили етанолом зразок смоли з пептидом.
2. Перемістили аліквоту смоли у пробірку, додали кілька крапель кожного з приготовлених розчинів.
3. Перемішали і нагріли пробірку до 120° С протягом 4-6 хвилин.
4. Якщо гранули смоли залишились безбарвними, а розчин - жовтим, це негативний тест на наявність вільного аміну. Фарбування частинок смоли в блакитний колір, а розчину - в слабкий зелений оцінюють як слабку позитивну реакцію. Темно-синій колір смоли і розчину свідчить про позитивну реакцію.

### 3.1.5 Методика процедури зняття пептидів зі смол («cleavage»)

*Стандартний протокол 5.* Зняття пептидів зі смол та захисних груп для пептидів, що містять усі амінокислоти, окрім Arg(Mar), Cys(Trt), Met і незахищений Trp.

Методика:

1. Помістили смолу в колбу, пропустили аргон.
2. Додали розщеплюючий реагент TFE/DCM (1:3), збовтали при кімнатній температурі протягом 4 годин.
3. Відфільтрували смолу. Промили смолу двічі чистим TFE.
4. Об'єднали фільтрат та перенесли до круглодонної колби.
5. Упарили суміш до стану склоподібної плівки.
6. Повільно додали холодний ефір, обережно, щоб не порушувати плівку пептиду на стінках колби.

7. Промили пептидну плівку, обережно обертаючи ефір навколо колби.
8. Декантували ефір і повторили пункти 7, 8 чотири рази.
9. Додали води і ліофілізували.
10. Очистили HPLC.

### 3.1.6 Методика циклізації пептидів

*Стандартний протокол 6.* Методика циклізації пептидів

Методика:

1. До висушеного пептиду додали суміш 1л DMFA, 0.125 ммоль РуВОР, 0,4 ммоль (4 екв.) DIPEA, змішували протягом 48 годин.
2. Об'єднали фільтрат та ізолювали пептид (повторили пункти 5-9 протоколу 5 (дивись вище)).

### 3.1.7 Методика депротекції циклічного пептиду

*Стандартний протокол 7.* Методика зняття захисних груп відбувається за стандартним протоколом для пептидів, що містять усі амінокислоти, окрім Arg(Mar), Cys(Trt), Met і незахищений Trp.

Методика:

1. Помістити смолу в колбу, пропустити аргон.
2. Додати розщеплюючий реагент TFA/TIS/water (95:2,5:2,5), збовтувати при кімнатній температурі протягом 3-4 годин.
3. Відфільтрувати смолу. Промити смолу двічі чистою TFA.
4. Об'єднали фільтрат та ізолювали пептид (повторили пункти 5-9 протоколу 5 (див. вище))
5. Очистили HPLC.

## ВИСНОВКИ

1. Зібрані та проаналізовані літературні дані про вже існуючі інгібітори PIN1. Встановлено, що їх основні проблеми – неселективність та токсичність (для малих молекул), низька ефективність та нестабільність в умовах організму (для лінійних і циклічних пептидів).
2. Запропоновано та синтезовано нові структури інгібіторів, виходячи з будови лінійних пептидів, що проявили високу біологічну активність та результатів попередніх досліджень. Найвищу інгібуючу активність з досліджених нами сполук проявив циклопептид **8** (з піпеколіновою кислотою у складі).
3. Перевірено вплив структурних заміन проліну на інші циклічні аналоги та проведено експерименти на їх інгібуючу активність. Отримані дані підтвердили основну літературну гіпотезу «гідрофобної кишені», в яку вміщується залишок проліну, а в нашому випадку й інші амінокислоти у структурі запропонованих циклопептидів. Встановлено, що залишок циклічної амінокислоти є критично важливим при зв'язуванні PIN1 з потенційним інгібітором. Виходячи з отриманих результатів, знайдено лідер-сполуки.
4. Ресинтезовано фотоконтрольований аналог циклічного макроциклу-лідера та передано його на дослідження сили інгібування. Показано, що синтез можна масштабувати до 26 мг.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

---

- 1 Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, et al. (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 281: 29739-29752
- 2 Lu K. P., Zhou X. Z. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2007. – Т. 8. – №. 11. – С. 904-916.
- 3 Liou, Y.-C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X. Z., Yu, Z.-X., Huang, H.-K., ... Lu, K. P. (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*, 424(6948), 556–561.
- 4 Lu, K. P., & Zhou, X. Z. (2007). The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 904–916.
- 5 Kruiswijk, F., Hasenfuss, S. C., Sivapatham, R., Baar, M. P., Putavet, D., Naipal, K. A. T., ... de Keizer, P. L. J. (2015). Targeted inhibition of metastatic melanoma through interference with Pin1-FOXO1 signaling. *Oncogene*, 35(17), 2166–2177.
- 6 Elisa Isopi, Giuseppe Legname. Pin1 and neurodegeneration: a new player for prion disorders?. *AIMS Molecular Science*, 2015, 2(3): 311-323.
- 7 Lu KP, Hanes SD, Hunter T (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380: 544-547
- 8 Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H., & Nicholson, L. K. (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nature Chemical Biology*, 3(10), 619–629.
- 9 Mayfield, J. E. et al. Chemical tools to decipher regulation of phosphatases by proline isomerization on eukaryotic RNA polymerase II. *ACS Chem. Biol.* 10, 2405–2414 (2015).
- 10 Lu, KP, Suizu, F., Zhou, XZ, Finn, G., Lam, P., & Wulf, G. (2006). Targeting Carcinogenesis: A Role for the Prolyl Isomerase Pin1?

- 
- 11 Zhou, X. Z., & Lu, K. P. (2016). The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target. *Nature Reviews Cancer*, 16(7), 463–478.
- 12 Finn G., Lee T. H., Lu K. P., Nicholson L. K. (2007). "Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer". *Nature Chemical Biology*. 3 (10): 619–2.
- 13 Moore J. D., Potter A. (2013). "Pin1 inhibitors: Pitfalls, progress and cellular pharmacology". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 4283–4291.
- 14 Cohen, P. *Trends Biochem. Sci.* 2000, 25, 596–601.
- 15 Lu, K.; Hanes, S.; Hunter, T. *Nature* 1996, 380, 544–547.
- 16 Yaffe, M. *Science* 1997, 278, 1957–1960.
- 17 Vöhringer-Martinez, E., Duarte, F., & Toro-Labbé, A. (2012). How Does Pin1 Catalyze the Cis–Trans Prolyl Peptide Bond Isomerization? A QM/MM and Mean Reaction Force Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(43), 12972–12979.
- 18 Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356
- 19 Lu, K. P. & Zhou, X. Z. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 904–916 (2007). Lu, K. P. & Zhou, X. Z. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 904–916 (2007).
- 20 Liou, Y. C., Zhou, X. Z. & Lu, K. P. The prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 36, 501–514 (2011).
- 21 Lu, K. P., Finn, G., Lee, T. H. & Nicholson, L. K. Prolyl cis–trans isomerization as a molecular timer. *Nat. Chem. Biol.* 3, 619–629 (2007).
- 22 Mayfield, J. E. et al. Chemical tools to decipher regulation of phosphatases by proline isomerization on eukaryotic RNA polymerase II. *ACS Chem. Biol.* 10, 2405–2414 (2015).

- 
- 23 Yaffe, M. B. et al. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278, 1957–1960 (1997).
- 24 Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Opii, W., Newman, S. F., Joshi, G., Ansari, M. A., & Sultana, R. (2006). REVIEW: Pin1 in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 98(6), 1697–1706. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03995.x
- 25 Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Lu KP. Pin1 is overexpressed in breast cancer and potentiates the transcriptional activity of phosphorylated c-Jun towards the cyclin D1 gene. *EMBO J* 2001;20:3459–3472.
- 26 Ryo A, Nakamura N, Wulf G, Liou YC, Lu KP. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nature Cell Biol* 2001;3: 793–801
- 27 Bao L, Sauter G, Sowadski J, Lu KP, Wang D. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol* 2004;164:1727–1737.
- 28 Ieda, N., Itoh, K., Inoue, Y., Izumiya, Y., Kawaguchi, M., Miyata, N., & Nakagawa, H. (2018). An irreversible inhibitor of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 and evaluation of cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.
- 29 Lu, K. P., Suizu, F., Zhou, X. Z., Finn, G., Lam, P., & Wulf, G. (2006). Targeting carcinogenesis: A role for the prolyl isomerase Pin1? *Molecular Carcinogenesis*, 45(6), 397–402.
- 30 Kim, C. J., Song, J. H., Cho, Y. G., Chae, H. S., Nam, S. W., Yoo, N. J., ... PARK, W. S. (2006). Pin1 gene mutation is a rare event in gastric cancer. *APMIS*, 114(7-8), 518–522.
- 31 Lippens, G., Landrieu, I., & Smet, C. (2007). Molecular mechanisms of the phospho-dependent prolyl cis/trans isomerase Pin1. *FEBS Journal*, 274(20), 5211–5222.
- 32 Edlich F., Fischer G. (2006). "Pharmacological targeting of catalyzed protein folding: the example of peptide bond cis/trans isomerases". *Handb. Exp. Pharmacol.* 172, 359–404.

---

33 Momin, M., Yao, X.-Q., Thor, W., & Hamelberg, D. (2018). Substrate Sequence Determines Catalytic Activities, Domain-Binding Preferences, and Allosteric Mechanisms in Pin1. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(25), 6521–6527.

34 Zhang, Y., Daum, S., Wildemann, D., Zhou, X. Z., Verdecia, M. A., Bowman, M. E., ... Noel, J. P. (2007). Structural Basis for High-Affinity Peptide Inhibition of Human Pin1. *ACS Chemical Biology*, 2(5), 320–328.

35 Christner C., Fischer G., Grabley S., Hennig L., Kipping M., Kullertz G., Rucknagel K. P., Schelbert B. (1998). "Selective Inactivation of Parvulin-Like Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases by Juglone". *Biochemistry*. 37, 5953

36 Daum S., Wildemann D., Zhang Y., et al. (2007) . "Structural Basis for High-Affinity Peptide Inhibition of Human Pin1". *Chemical biology ACS*. 2 (5): 320-328.

37 Nanomolar Inhibitors of the Peptidyl Prolyl CisTrans Isomerase Pin1 from Combinatorial Peptide Libraries – NO

38 Jiang B., Lian W., Pei D., Qian Z. (2014). "Cell-permeable bicyclic peptide inhibitors against intracellular proteins". *J. Am. Chem. Soc.* 136: 9830 – 9833

39 Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy. O. Babii, S. Afonin, L.V. Garmanchuk, V.V. Nikulina, T.V. Nikolaienko, O.V. Storozhuk, D. V.Shelest, O.I. Dasyukevich, L.I.Ostapchenko, V. Iurchenko, S. Zozulya, A.S. Ulrich, I. V. Komarov. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016, 55(18), 5493-6.

40 Pastorino, L/, Sun, A., Lu, P.-J., Zhou, X. Z., Balastik, M., Finn, G., Lu, K. P. (2006). The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid- $\beta$  production. *Nature*, 440(7083), 528-534

41 Patgiri, A., Jochim, A. L., & Arora, P. S. (2008). A Hydrogen Bond Surrogate Approach for Stabilization of Short Peptide Sequences in  $\alpha$ -Helical Conformation. *Accounts of Chemical Research*, 41(10), 1289–1300.

---

42 Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), 2700–2707.

43 Babii, O., Afonin, S., Ishchenko, A. Y., Schober, T., Negelia, A. O., Tolstanova, G. M., ... Ulrich, A. S. (2018). Structure-Activity Relationships of Photoswitchable Diarylethene-Based  $\beta$ -Hairpin Peptides as Membranolytic Antimicrobial and Anticancer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*.

44 M. Hay, D. W. Thomas, J. L. Craighead, C. Economides, J. Rosenthal, *Nat. Biotechnol.* 2014, 32, 40–51.

45 a) J. K. Vasir, M. S. V. Labhasetwar, *Technol. Cancer Res. Treat.* 2005, 4, 363–374; b) D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* 2007, 2, 751–760; c) Y. Malam, M. Loizidou, A. M. Seifalian, *Trends Pharmacol. Sci.* 2009, 30, 592–599; d) S. C. Alley, N. M. Okeley, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010, 14, 529–537; e) L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2012, 64, 206–212.

46 Spikes, J. D. (1991). The origin and meaning of the term “photodynamic” (as used in “photodynamic therapy”, for example). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 9(3-4), 369–371. doi:10.1016/1011-1344(91)80172-e

47 T. J. Dougherty, Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors, *Photo&em. Photobiol.*, 45 (1987) 879-889.

48 C. J. Gomer, N. Rucker, A. Ferrario and S. Wong, Properties and applications of photodynamic therapy, *Rcuiiat. Res.*, 120 (1989) 1-18.

49 I. Diamond, S. Granelh, A. F. McDonagh, S. Nielsen, C. B. Wilson and R. Jaenicke, Photodynamic therapy of maliiant tumors, *Luncet*, 2 (1972) 1175-1177.

50 T. J. Dougherty, J. E. Kaufman, A. Goldfarb, K. S. Weishaupt, D. Boyle and A. Mittleman, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer Z&s.*, 38 (1978) 2628-2635.

51 G. Waris, H. Ahsan, *J. Carcinog.* 2006, 5, 14.

---

52 Hong, E. J., Choi, D. G., & Shim, M. S. (2016). Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 297–307. doi:10.1016/j.apsb.2016.01.007

53 M. Hockel, P. Vaupel, *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, 93, 266–276.

54 <https://optobiolabs.com/technology/photopharmacology>

55 Broichhagen, J., Frank, J. A., & Trauner, D. (2015). A Roadmap to Success in Photopharmacology. *Accounts of Chemical Research*, 48(7), 1947–1960. doi:10.1021/acs.accounts.5b00129

56 a) H.-Q. Peng, L.-Y. Niu, Y.-Z. Chen, L.-Z. Wu, C.-H. Tung, Q.-Z. Yang, *Chem. Rev.* 2015, 115, 7502–7542; b) S.-Z. Pu, Q. Sun, C.-B. Fan, R.-J. Wang, G. Liu, *J. Mater. Chem. C* 2016, 4, 3075–3093; c) V. Valderrey, A. Bonasera, S. Fredrich, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 1914 – 1918; *Angew. Chem.* 2017, 129, 1941–1945; d) M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, X. Zhuang, *Science* 2007, 317, 1749–1753; e) S. J. Lord, N. R. Conley, H.-I. D. Lee, R. Samuel, N. Liu, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 9204–9205; f) Q. Qi, C. Li, X. Liu, S. Jiang, Z. Xu, R. Lee, M. Zhu, B. Xu, W. Tian, *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 16036 –16039.

57 a) L. F. Kadem, K. G. Suana, M. Holz, W. Wang, H. Westerhaus, R. Herges, C. Selhuber-Unkel, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 55, 225–229; *Angew. Chem.* 2017, 129, 231–235; b) P. Li, G. Xie, X.-Y. Kong, Z. Zhang, K. Xiao, L. Wen, L. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 15637–15641; *Angew. Chem.* 2016, 128, 15866–15870; c) E. S. Pavlenko, M. Sander, S. Mitzscherling, J. Pudell, F. Zamponi, M. Rçssle, A. Bojahr, M. Bargheer, *Nanoscale* 2016, 8, 13297–13302.

58 a) M.-Q. Zhu, L. Zhu, J. J. Han, W. Wu, J. K. Hurst, A. D. Q. Li, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4303–4309; b) A. Juli-/Ljpez, J. Hernando, D. Ruiz-Molina, P. Gonz#lez-Monje, J. Sedj, C. Roscini, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 15044–15048; *Angew. Chem.* 2016, 128, 15268–15272; c) X. Li, J. Fei, Y. Xu, D. Li, T. Yuan, G. Li, C. Wang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 1903–1907; *Angew. Chem.* 2018, 130, 1921–1925.

---

59 a) Y. Arai, S. Ito, H. Fujita, Y. Yoneda, T. Kaji, S. Takei, R. Kashihara, M. Morimoto, M. Irie, H. Miyasaka, *Chem. Commun.* 2017, 53, 4066–4069; b) Z. Liu, H. I. Wang, A. Narita, Q. Chen, Z. Mics, D. Turchinovich, M. Kl-ui, M. Bonn, K. Mellen, *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 9443–9446.

60 Fuchter, M. J. (2020). On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist's Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(20), 11436–11447.

61 a) M. Irie, T. Fukaminato, K. Matsuda, S. Kobatake, *Chem. Rev.* 2014, 114, 12174–12277; b) J. Su, T. Fukaminato, J.-P. Placial, T. Onodera, R. Suzuki, H. Oikawa, A. Brosseau, F. Brisset, R. Pansu, K. Nakatani, R. M8tivier, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 3662–3666; *Angew. Chem.* 2016, 128, 3726–3730; c) E. Hatano, M. Morimoto, T. Imai, K. Hyodo, A. Fujimoto, R. Nishimura, A. Sekine, N. Yasuda, S. Yokojima, S. Nakamura, K. Uchida, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 12576–12580; *Angew. Chem.* 2017, 129, 12750–12754; d) H. Wu, Y. Chen, Y. Liu, *Adv. Mater.* 2017, 29, 1605271.

62 Komarov, I. V., Afonin, S., Babii, O., Schober, T., & Ulrich, A. S. (2018). Efficiently Photocontrollable or Not? Biological Activity of Photoisomerizable Diarylethenes. *Chemistry - A European Journal*, 24(44), 11245–11254. doi:10.1002/chem.201801205

63 a) S. A. D&az, L. Giordano, J. C. Azc#rate, T. M. Jovin, E. A. Jares-Erijman, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 3208–3217; b) T. Wu, D. Wilson, N. R. Branda, *Chem. Mater.* 2014, 26, 4313–4320.

64 a) S. W. Thomas, G. D. Joly, T. M. Swager, *Chem. Rev.* 2007, 107, 1339 – 1386; b) H. Jiang, P. Taranekar, J. R. Reynolds, K. S. Schanze, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 4300–4316; *Angew. Chem.* 2009, 121, 4364 – 4381; c) X. Feng, S. Wang, D. Zhu, *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 2411–2419; d) L. Feng, C. Zhu, H. Yuan, L. Liu, F. Lv, S. Wang, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 6620–6633; e) C. Wu, D. T. Chiu, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 3086–3109; *Angew. Chem.* 2013, 125, 3164–3190; f) A. Kaeser, A. P. H. J. Schenning, *Adv. Mater.* 2010, 22, 2985–2997; g) R. Liu, Q.

---

Cui, C. Wang, X. Wang, Y. Yang, L. Li, ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 3006–3015; h) Q. Cui, X. Wang, Y. Yang, S. Li, L. Li, S. Wang, Chem. Mater. 2016, 28, 4661–4669; i) X. Wang, S. Li, P. Zhang, F. Lv, L. Liu, L. Li, S. Wang, Adv. Mater. 2015, 27, 6040–6045.

65 Bachem A.G. "Solid phase peptide synthesis. Bachem pioneering partner for peptides". Published by Global Marketing, Bachem Group, 2018.

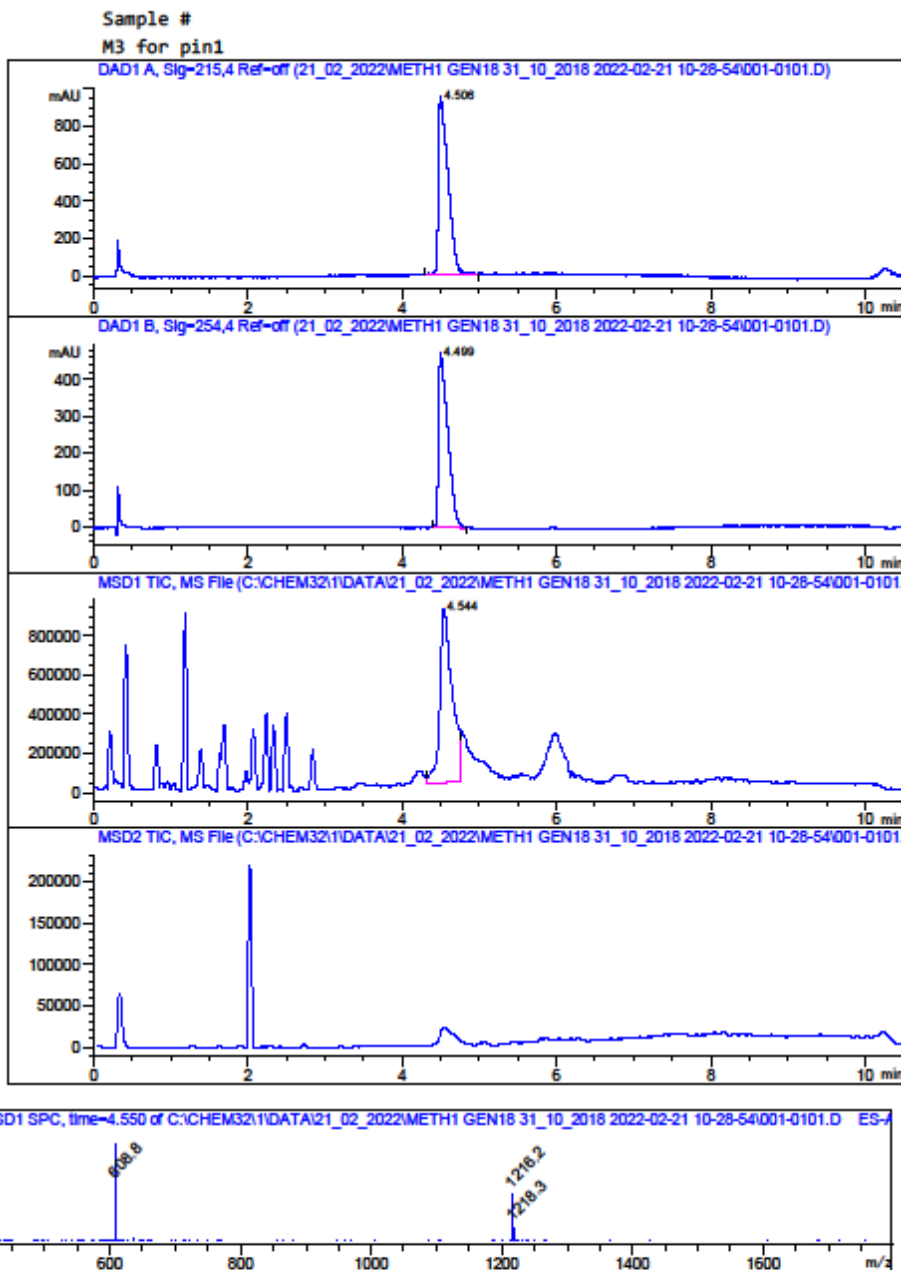
66 Chan W. C., White P. D. "Fmoc solid phase peptide synthesis". University Press, Oxford, 2000

67 Bossinger C.D., Colescott R.L., Cook P.I., Kaiser E. (1970) . "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides". Analytical Biochemistry. 34 (2): 595

## ДОДАТКИ

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.506 min

#	Time	Area%
1	4.506	100.00



Inj.Date 2/21/2022

E

Vial 1

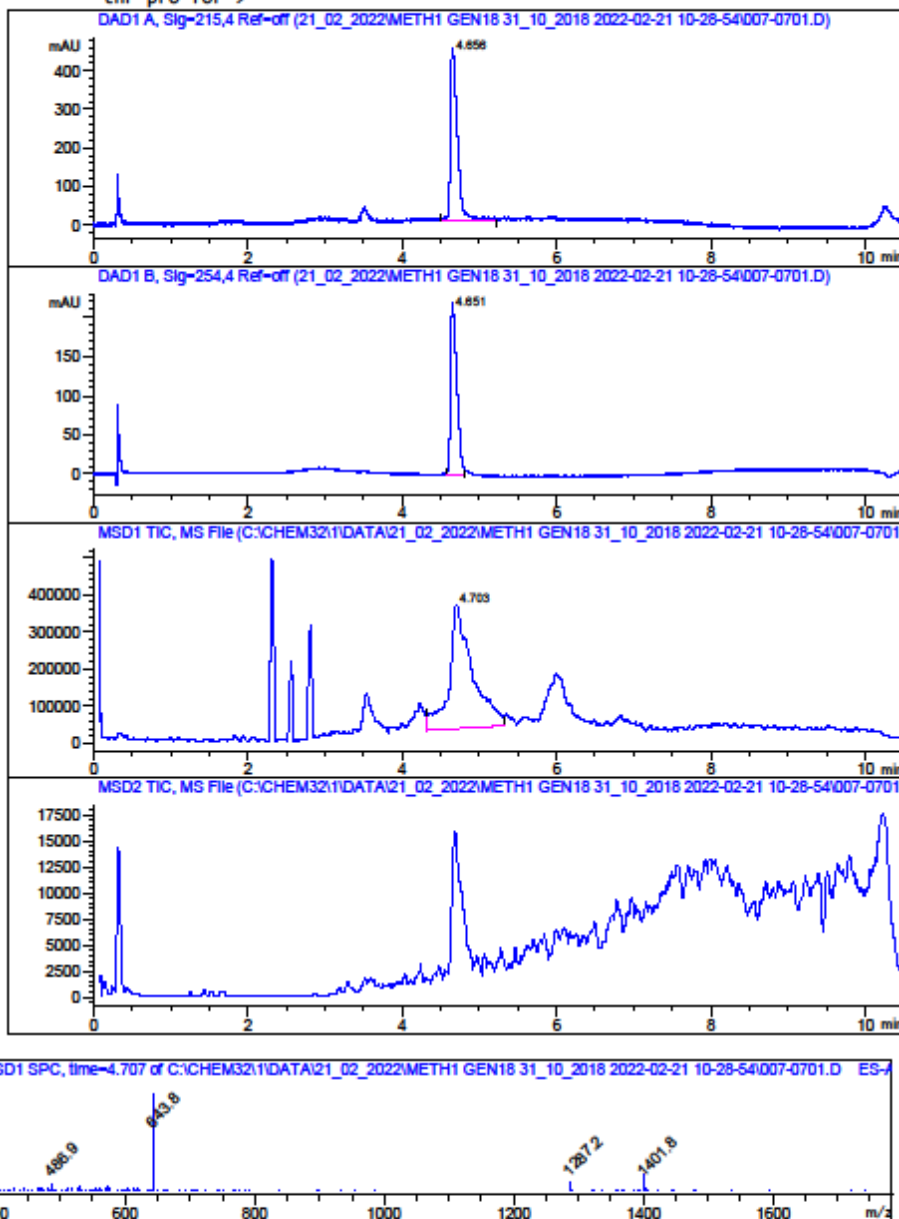
Acq. Method C:\Chem32\-&gt;

Рис.1.30 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 1

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.656 min

#	Time	Area%
1	4.656	100.00

Sample #  
thr-pro for->



Inj.Date 2/21/2022

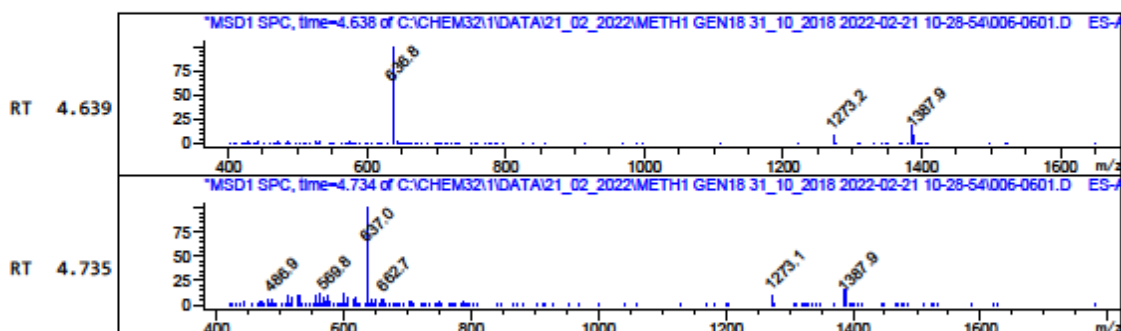
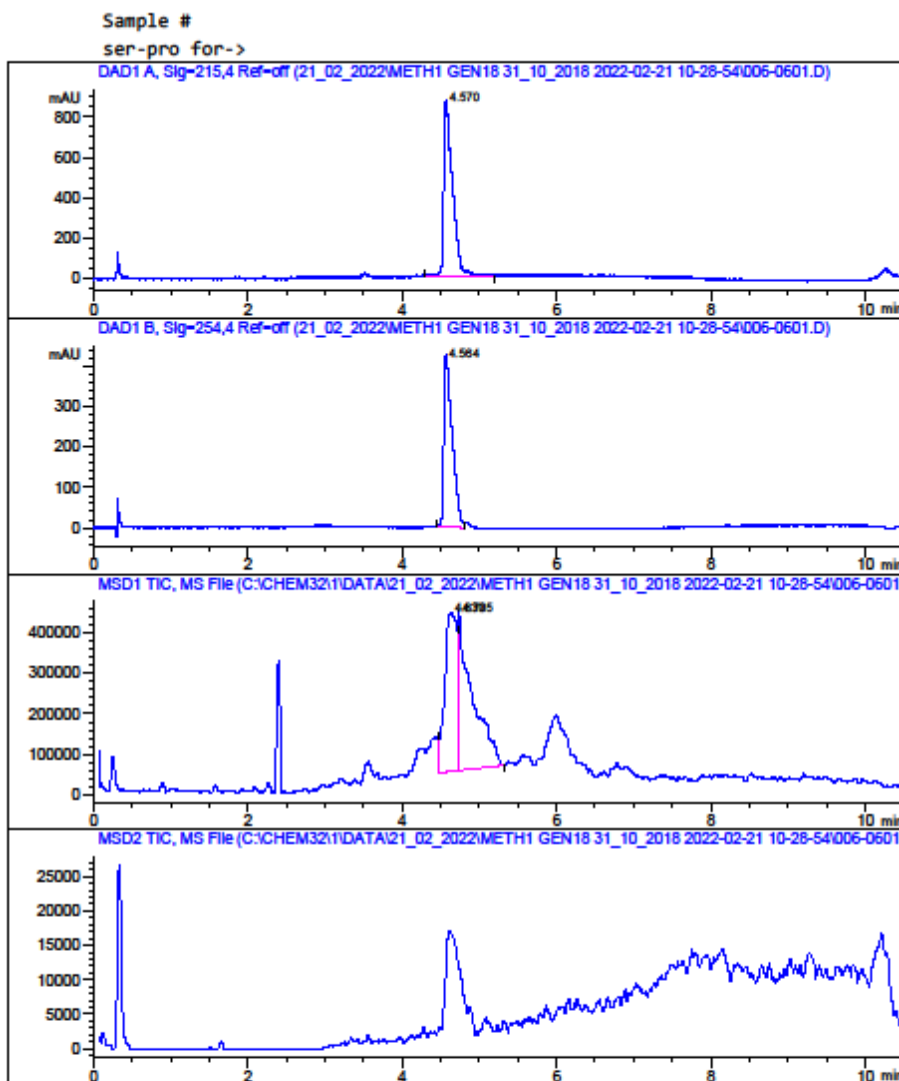
E Vial 7

Acq. Method C:\Chem32\-->

Рис.1.31 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 2

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.570 min

#	Time	Area%
1	4.570	100.00



Inj.Date 2/21/2022

E

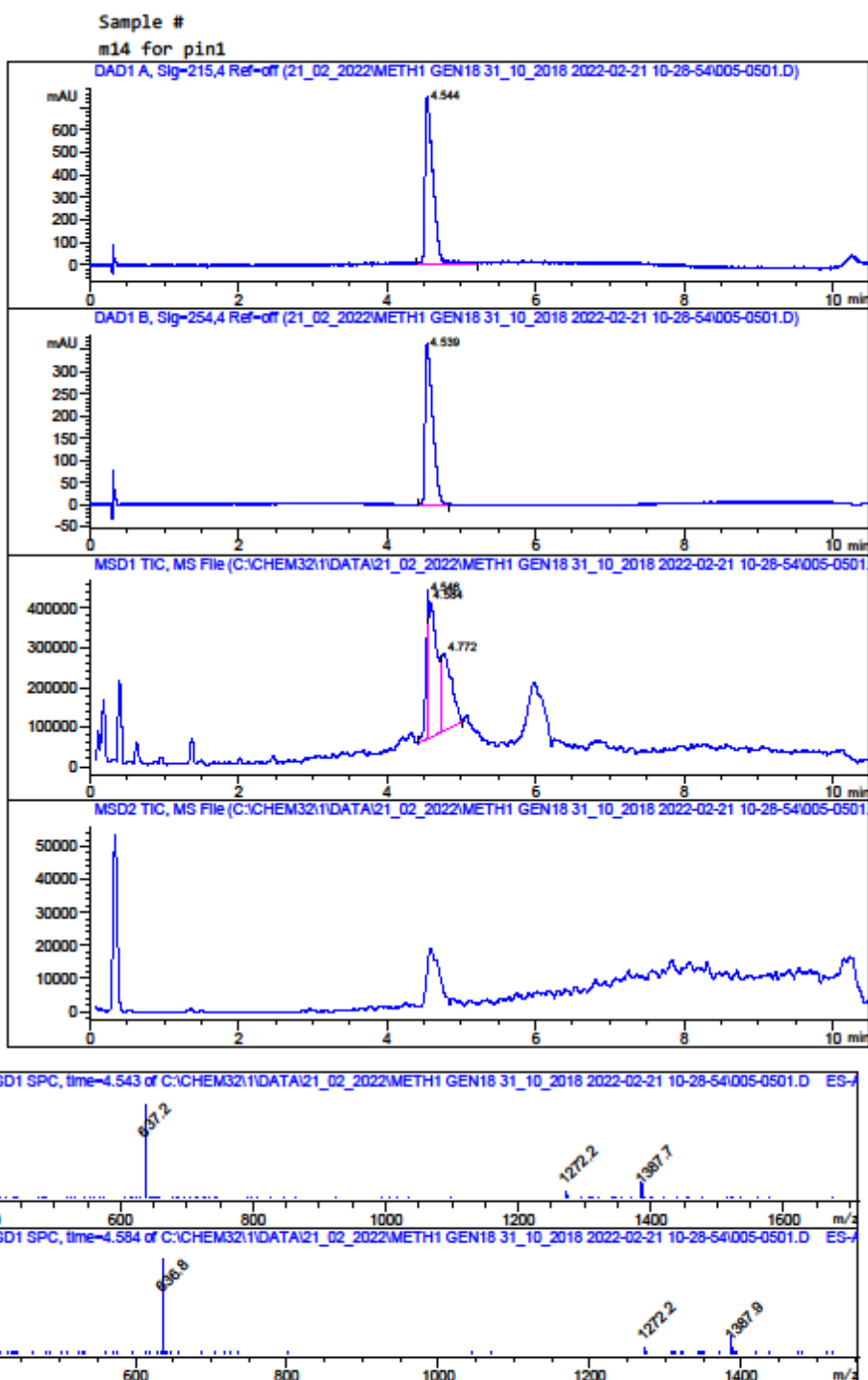
Vial 6

Acq. Method C:\Chem32\->

Рис.1.32 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 3

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.544 min

#	Time	Area%
1	4.544	100.00



Inj.Date 2/21/2022

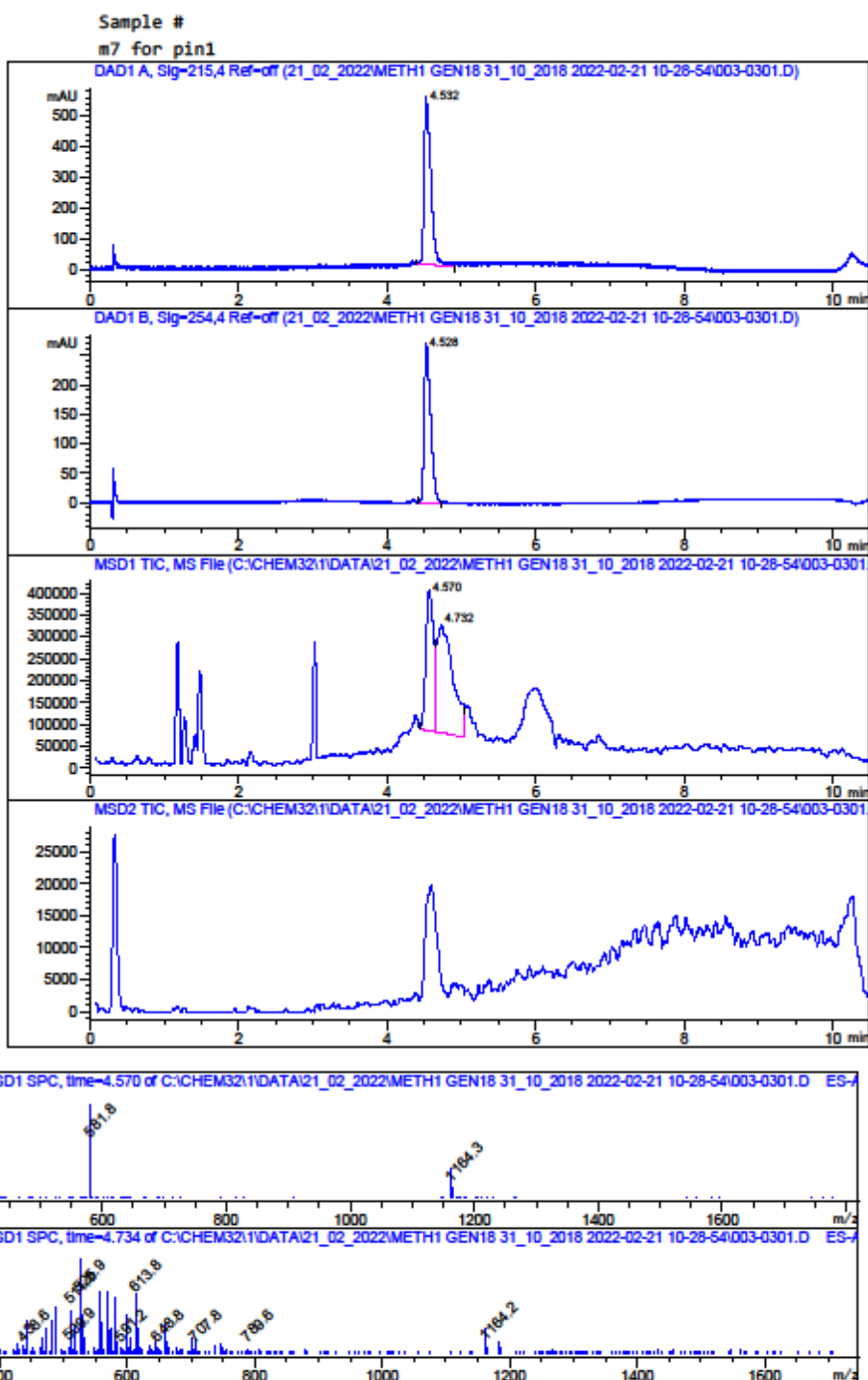
E Vial 5

Acq. Method C:\Chem32\>

Рис.1.33 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 4

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.532 min

#	Time	Area%
1	4.532	100.00



Inj.Date 2/21/2022

E

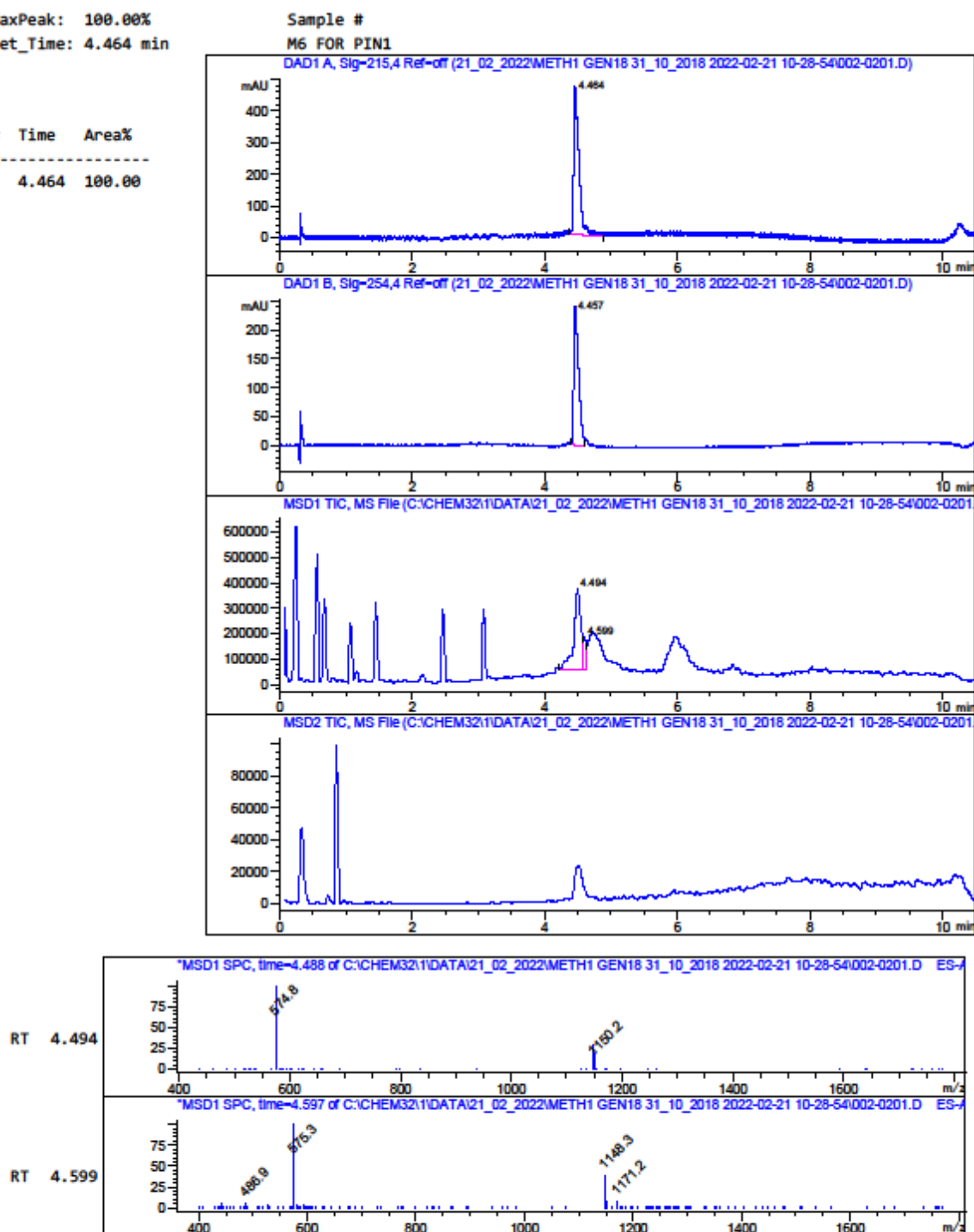
Vial 3

Acq. Method C:\Chem32\>

Рис.1.34 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 5

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 4.464 min

#	Time	Area%
1	4.464	100.00



Inj.Date 2/21/2022

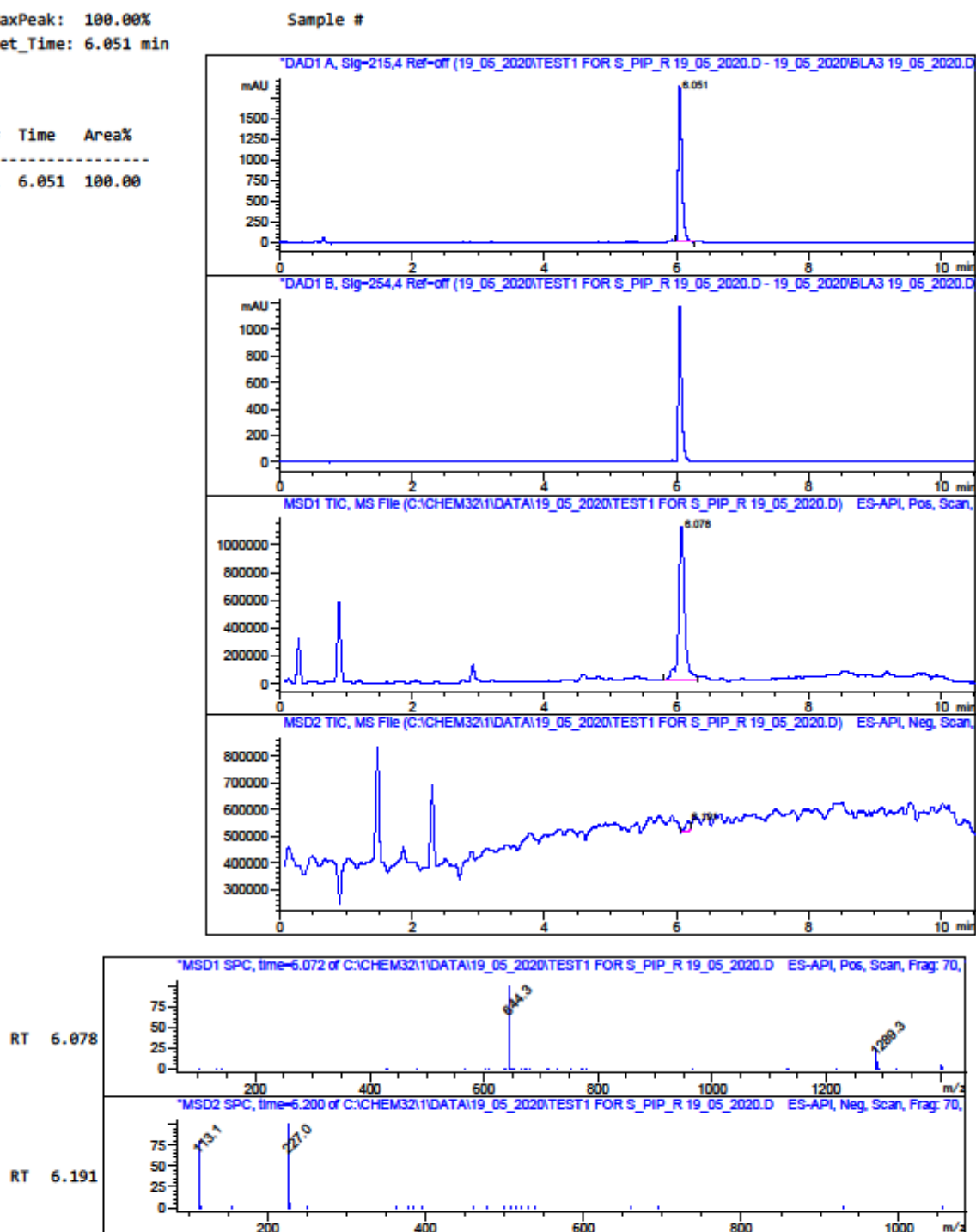
E Vial 2

Acq. Method C:\Chem32\>

Рис.1.35 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 6

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 6.051 min

#	Time	Area%
1	6.051	100.00



Inj.Date 5/19/2020

E

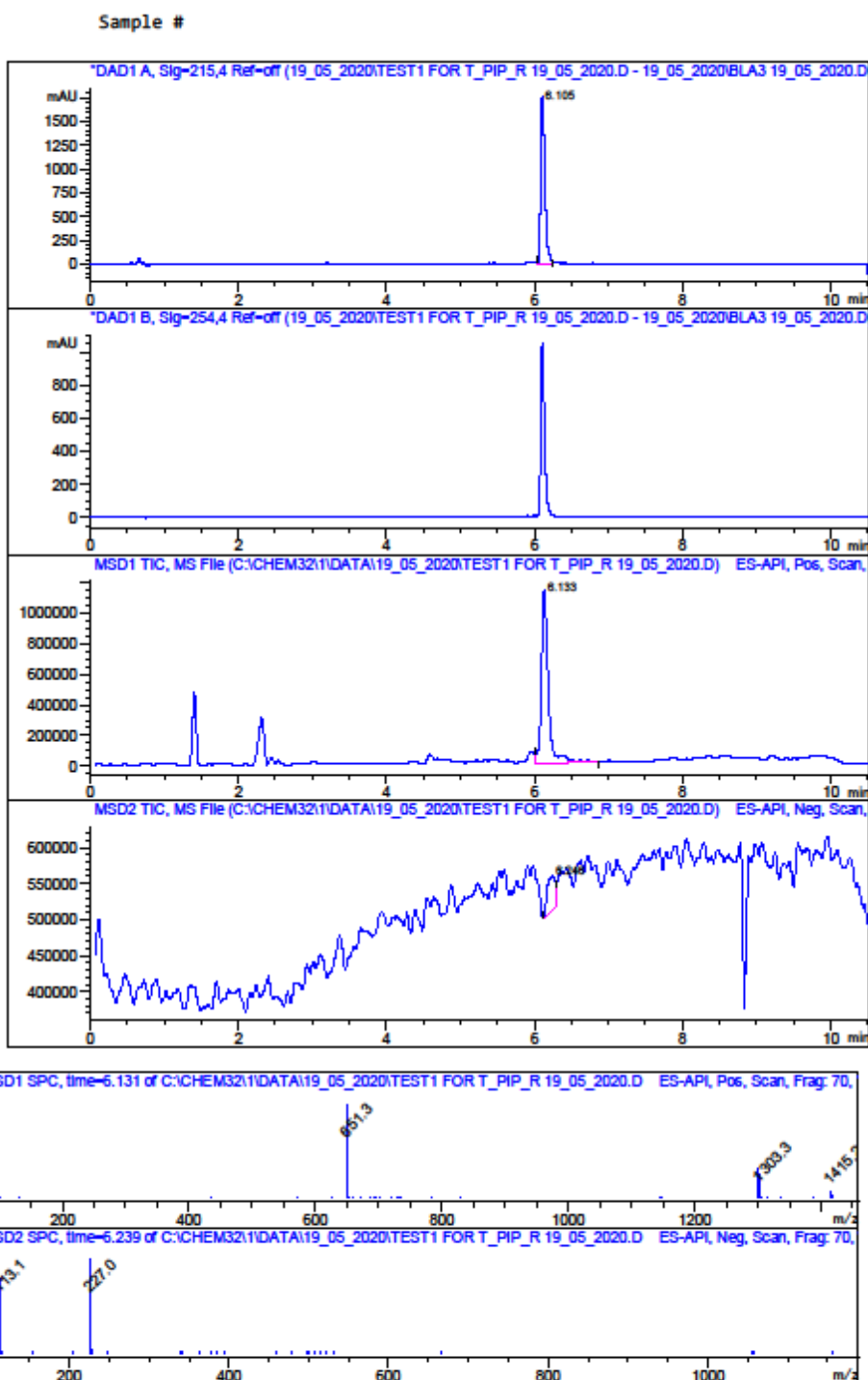
Vial 42

Acq. Method C:\CHEM32\-->

Рис.1.36 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 7

MaxPeak: 100.00%  
Ret\_Time: 6.105 min

#	Time	Area%
1	6.105	100.00



Inj.Date 5/19/2020

E

Vial 43

Acq. Method C:\CHEM32\>

Рис.1.37 HPLC і мас-спектрометричні спектри сполуки 8