

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ПОШУК РЕЧОВИН, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ СТВОРЕННЯ  
СИСТЕМИ PROTAC НА МІШЕНІ BRD4**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студентки спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

**Алексєєвої Діани Олегівни**

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

к. б. н., доцент **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у науково-виборничому хіміко-біологічному центрі

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

під керівництвом к.б.н. **Бориска Петра Олександровича**

Оцінка захисту роботи

---

Київ – 2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Алексеева Д.О. Пошук перспективних речовин для створення системи PROTAC на мішені BRD4. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено тестування таргетної бібліотеки речовин, з метою пошуку речовин, що зможуть бути використані для створення системи PROTAC та ініціювання протеасомної деградації білка. Після проведення першого етапу скринінгу методом TSA були відібрані потенційно активні речовини відносно BRD4 та створено нову таргетну бібліотеку, що містила 78 сполук для подальшого тестування. В результаті другого етапу скринінгу методом SPR, було встановлено, що 24 сполук зі 78 продемонстрували специфічне зв'язування з BRD4. Для даних речовин були обраховані кінетичні параметри.

Отримані результати були використані для формування вибірки речовин та проведення подальших етапів дослідження з метою створення системи PROTAC, механізму таргетного протеолізу білків.

Важливо зазначити, що частина результатів першого етапу тестувань були опубліковані у статті «The iterative application of a large chemical space in the drug discovery process» з Алексеевою Д.О. у співавторстві[1].

**Ключові слова:** BRD4, HTS, TSA, SPR, PROTAC.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВСТУП .....	6
РОЗДІЛ I. Огляд літератури.....	8
1.1. Загальна інформація про BRD4 .....	8
1.2. Функції BRD4 у нормі .....	8
1.3. Функції BRD4 у патології .....	13
1.4. Дослідження Бромодому 1 та Бромодому 2 .....	20
1.5. Система PROTAC .....	21
1.6. Існуючі PROTAC системи на BRD4 .....	23
РОЗДІЛ II. Матеріали та методи дослідження.....	26
2.1. Обладнання використане для дослідження .....	26
2.2. Матеріали та реактиви .....	26
2.3. Схема проведення дослідження.....	27
2.4. Створення бібліотеки речовин на BRD4 за допомогою віртуального скринінгу .....	29
2.5. Первинний скринінг бібліотеки речовин на BRD4 методом TSA. ....	31
2.6. Білок для тестування речовин методом TSA .....	33
2.7. Тестування таргетних бібліотек на BRD4 методом TSA.....	33
2.8. Дослідження селективності речовин на неспоріднених білках методом TSA. ....	34
2.9. Методи аналізу даних у TSA .....	35
2.10. Загальний опис методу вторинного скринінгу – Поверхневого Плазмонного Резонансу.....	38
2.11. Білок для тестування методом SPR.....	40
2.12. Підбір та оптимізація умов для проведення SPR.....	41
2.13. Створення бібліотеки речовин для вторинного скринінгу. ....	46
2.14. Перший етап тестування відібраних речовин методом SPR .....	47
2.15. Другий етап тестування речовин методом SPR. ....	48
2.16. Аналіз результатів у методі Поверхневий Плазмонний Резонанс.....	49
РОЗДІЛ III. Результати та обговорення .....	55

3.1. Результати тестування таргетної вибірки 1 під час первинного скринінгу методом TSA.....	55
3.2. Результати тестування вибірки 2 під час первинного скринінгу методом TSA .....	57
3.3. Результати першого етапу тестування речовин методом Поверхневого Плазмонного Резонансу.....	59
3.4. Результати другого етапу тестування речовин методом Поверхневого Плазмонного Резонансу.....	60
3.5. Обговорення подальших етапів створення та дослідження системи PROTAC на BRD4. ....	64
ВИСНОВКИ.....	65
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	66
ДОДАТКИ.....	73

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DMCO	–	диметилсульфоксид
ФТ	–	фактори транскрипції
BD	–	бромодомен
BET	–	(bromo- and extraterminal domain (proteins)) – білки з бромодоменом та екстратермінальним доменом
BETi	–	інгібітори білків родини BET
BRD4	–	бромодомен-вмісний білок 4
E2	–	фермент-кон'югатор убіквітинового шляху
HTS	–	(High-Throughput Screening) – високопродуктивний скринінг
KD	–	Рівноважна константа дисоціації
PROTAC	–	комбінована молекула вибіркового протеолізу білка
p-TEFb	–	(positive transcription elongation factor) – позитивний фактор елонгації транскрипції
QC	–	(quality control) – контроль якості експерименту
RU	–	Resonance Units – одиниця вимірювання сигналу у SPR
SO	–	(Sypro Orange) – флюорисцентний гідрофобний барвник
SPR	–	(Surface Plasmon Resonance) – Поверхневий Плазмонний Резонанс
TERT	–	теломерна зворотня транскриптаза
TSA	–	(Thermal Shift Assay) – метод визначення зсуву температури плавлення

## ВСТУП

Проблема терапії раку є актуальною темою досліджень вже не перший десяток років і залишається такою до сьогодні. Тому, тема даної дипломної роботи присвячена пошуку речовин, що можуть бути використані для створення системи ініціювання таргетної деградації білку-мішені, що є ключовою ланкою у розвитку онкогенних захворювань. Мішенню дослідження був обраний бромодомен-вмісний білок 4 (BRD4), що відіграє важливу роль у регуляції транскрипції, контролю пошкоджень ДНК, регуляції теломер, як у нормі так і у патології. В якості методу дії на білок була обрана система таргетного протеолізу білків (PROTAC), що забезпечує протеасомну деградацію у клітині. Метод вважається перспективним, оскільки функціонує за рахунок використання вже існуючих систем захисту клітини, що є потенційно безпечнішим методом терапії онкогенних захворювань у порівнянні із традиційними методами, такими як: хірургічне втручання, хіміо- та радіо- терапія. Саме тому система PROTAC є багатообіцяючим підходом терапії раку та потребує подальшого вивчення.

Метою роботи було створити та дослідити вибірку речовин на предмет специфічної взаємодії з BRD4, з перспективою створення молекули PROTAC.

Наступні завдання були поставлені перед виконанням дослідження:

1. Підбір та оптимізація умов для тестування таргетних бібліотек на BRD4 методом TSA.
2. Високопродуктивний скринінг таргетної бібліотеки речовин на BRD4 методом TSA. Відбір сполук, що проявили активність, для вторинного скринінгу.
3. Підбір та оптимізація умов для вторинного скринінгу відібраних речовин методом SPR.
4. Вторинний скринінг бібліотеки речовин на BRD4 методом SPR.

5. Аналіз характеру взаємодії тестованих речовин з BRD4 та їх кінетичних параметрів. Відбір речовин для наступних етапів дослідження.

## РОЗДІЛ I. Огляд літератури

### 1.1. Загальна інформація про BRD4

Бромодомен-містить 4 (BRD4) - білок сімейства бром і екстратермінальних доменів (BET). Довжина поліпептидного ланцюга білка становить 1 362 амінокислоти, молекулярна маса – 152 219 Да. Білок локалізований у ядрі, хромосомах.

Білок містить два бромодомена (BD1, BD2) на N-кінці молекули та екстратермінальний домен (ET). Бромодомен – це високо консервативний білковий домен розміром приблизно 110 амінокислот, що складається з 4 альфа-спіралей відокремлених петлями різних довжин, що утворюють ліво-закручений пучок та гідрофобну кишеню для розпізнавання ацетил лізину. Розпізнавання ацетиллізину відбувається за рахунок двох консервативних петель – ZA та BC бромодоменів. BD білків сімейства BET характеризуються відносно низькою афінністю до одиничних залишків ацетил лізину та набагато більшою до ділянок з багатьма сайтами ацетилювання. ET складається з 3 альфа-спіралей та петлі[2].

### 1.2. Функції BRD4 у нормі

BRD4 належить до регуляторів хроматину, фосфопротеїнів та задіяний у багатьох біологічних процесах, а саме: транскрипція та її регуляція, репарація ДНК, ацетилювання, альтернативний сплайсинг, підтримка довжини теломер.

Транскрипційна активність BRD4 є важливою під час ембріогенезу та для диференціації клітин. На ранніх фазах ембріогенезу BRD4 необхідний для підтримки самооновлення та плюрипотентності ембріональних стовбурових клітин шляхом опосередкованого впливу або взаємодії з

факторами транскрипції (ФТ) ембріональних стовбурових клітин, такими як Nanog[3] та OCT4[4].

Пізніше під час постембріонального розвитку, BRD4 є важливим для диференціації клітин за допомогою селективної регуляції лінійних специфічних генів. Пониження активності BRD4 сповільнює весь процес диференціації остеобластів, починаючи з ранніх стадій до пізніх фаз мінералізації та формування кісток.

Все це обумовлюється одним механізмом: BRD4 накопичується на конкретній підмножині специфічних енансерів (ділянок ДНК до яких можуть приєднуватись білки, ФТ) завдяки взаємодії із лінійними специфічними ФТ, сприяючи експресії генів клітинної ідентичності. Цим самим BRD4 виконує головним чином функцію активатора транскрипції. Проте наявна інформація про BRD4, як транскрипційний репресор. Так наприклад, BRD4 зв'язаний з убіквітин-кон'югуючим ензимом E2 бере участь у інгібуванні транскрипції хроматину вірусу папіломи людини (HPV).

Бромодоменвмісний білок накопичується на гіпер-ацетильованих ділянках та ділянках хроматину схильних до транскрипції (як промотори і енансери) працює в якості основи для збірки великих білкових комплексів, які сприяють активності РНК-полімерази II стимулювати ініціацію транскрипції і елонгації (рис. 1.1.A)[5].

Ініціація ж транскрипції починається з приєднання РНК-полімерази II на комплекс преініціації на промоторі гена, після чого відбувається фосфорилування РНК-полімерази II на серині у 5-му положенні та стабілізація взаємодії РНК-полімерази II з промотором. Медіатор транскрипції РНК-полімерази II (Медіатор) – це великий комплекс, який передає сигнали від ФТ та активаторів на енансерах до промоторів ініціюючи транскрипцію. BRD4 та Медіатор значною мірою колокалізуються на активних енансерах, а їх геномна локалізація порушується інгібуванням BET (рис. 1.1.B). Тобто за дією інгібіторів BET (iBET), комплекс Медіатору

та регуляторних факторів руйнується, чим і обумовлюється пригнічення Медіатору.

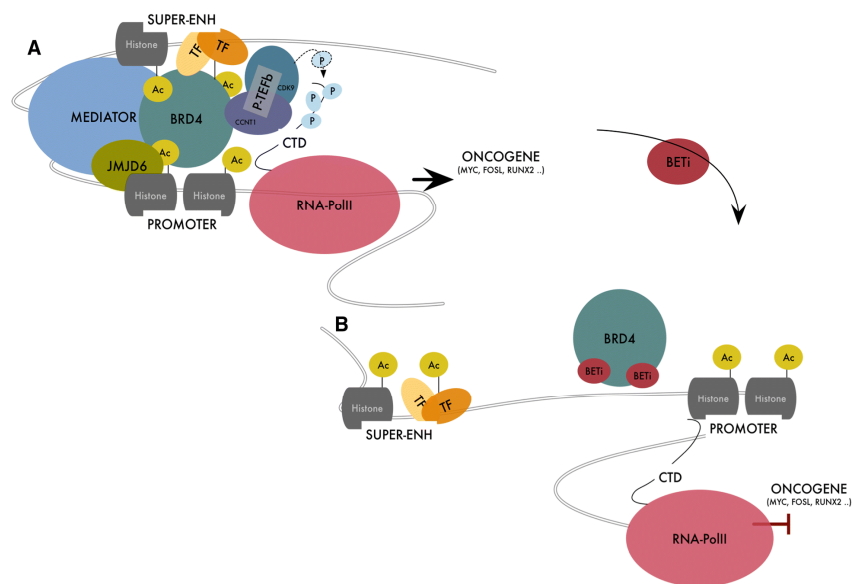


Рис 1.1. Схематичне представлення функцій BRD4 в організації та утворенні супер-енхансерів[6]. **А.** BRD4 залучає комплекс Медіатору, ініціюючи збирання великої платформи білків, що регулюють транскрипцію, сприяючи та стабілізуючи зв'язування РНК-полімерази II. BRD4 також взаємодіє та активує Р-TEFb. **В.** Вплив BETі на організацію супер-енхансерів. Де супер-енхансери - це великі скупчення енхансерів, тісно розташованих в геномі, які мають унікальні функціональні властивості, що відрізняють їх від звичайних енхансерів.

Крім того, багато ФТ та білків, що ремоделюють хроматин, взаємодіють з BRD4[7]. Оскільки ФТ в основному асоційовані з енхансерами, взаємодія BRD4 з цими білками має вирішальне значення для взаємодії BRD4-енхансери та для визначення селективності BRD4 до генів-мішеней. ФТ рекрутують гістон-ацетилювальні ферменти, які, в свою чергу, сприяють ацетилюванню гістонів та/або негістонових білків[5]. Нещодавно запропонували, що одночасне зв'язування BRD4 з гістонами та ФТ стабілізує зв'язування ФТ з енхансерами, підтримуючи підвищену транскрипційну

активність цих елементів. Взаємодія BRD4 з ФТ та модифікаторами гістонів може бути осопередкована бромодоменом і, таким чином, залежати від рівня ацетилювання ФТ[8] чи інших мішеней BRD4[9]. Доведено, що ET-домен BRD4 бере участь у регуляції транскрипції, взаємодіючи з модифікаторами гістонів, включаючи біфункціональну деметилазу аргініну та лізил-гідроксилазу (JMJD6)[10], метилтрансферазу NSD3 та білки ремоделювання хроматину SWIF/SNF та CDH4[11]. Завдяки цим взаємодіям BRD4 полегшує транскрипційну активацію шляхом розкручування хроматину та прискорення синтезу мРНК.

Додатково було виявлено, що BRD4 взаємодіє з групою ФТ незалежно від бромодоменив, таких як p53, YY1, AP2, c-JUN, C/EBP $\alpha$  та  $\beta$  та гетеродимер c-MYC/MAX. Селективне зв'язування з певними ФТ, а також можлива модуляція цих взаємодій за допомогою сигнальних шляхів мають суттєве значення для забезпечення специфічності BRD4 до генів-мішеней і можуть сприяти відповідним функціям BRD4.

Окрім контролю білок-кодуючих генів, BRD4 також регулює транскрипцію енхансер-асоційованої РНК (eРНК). Багато активних енхансерів є місцем активної транскрипції eРНК, що, в свою чергу, допомагає енхансерам у сприянні експресії генів-мішеней[12]. Інгібування BRD4 за допомогою BETі пригнічує експресію eРНК транскрибованих з BRD4 збагачених енхансерами. Дія BETі руйнує зв'язок BRD4 та енхансерів, зупиняючи взаємодію BRD4 з РНК-полімеразою 2 на цих ділянках, що зумовлює пригнічення синтезу eРНК[13].

Серед білків сімейства BRD, BRD4 єдиний здатний взаємодіяти з р-TEF $\beta$  через свій С-кінцевий домен. Взаємодія з BRD4 запобігає зв'язуванню Р-TEF $\beta$  з інгібуючим рибонуклеопротеїновим комплексом 7SK/HEXIM, який обмежує Р-TEF $\beta$  у його неактивній формі[14]. Накопичення BRD4 на гіпер-ацетильованих і транскрипційно активних сайтах початку транскрипції служить місцями приєднання для Р-TEF $\beta$ , що, в свою чергу, полегшує

активацію РНК-полімерази II та перехід до активної елонгації. Нещодавні дані вказують, що також енхансер-зв'язаний BRD4, через свою взаємодію з JMJD6, впливає на активність Р-TEFb, сприяючи елонгації. BRD4 опосередковує набір JMJD6 на цих ділянках, що в свою чергу:

1. деметилує H4 аргінін 3 моно- та диметильований (H4R3me1, H4R3me2), які є маркерами репресії транскрипції;
2. деметилує 5'-метилфосфатний кеп 7SK РНК спричиняючи її деградації та місцевій активації Р-TEFb.

BRD4, крім того, що збагачується активними промоторами та енхансерами, зв'язаний вздовж високотранскрибованих генів[13]. BRD4 функціонує як шаперон, що використовує здатність взаємодіяти з ацетильованими гістонами, полегшує проходження РНК-полімерази II через гіперацетильовані нуклеосоми [15].

Крім вищеперерахованих функцій BRD4 приймає участь у регулюванні теломер. Теломери - ділянки на кінцях плечей кожної хромосоми, що містять велику кількість повторюваних послідовностей. Теломери захищають ДНК від дії нуклеаз та від розпізнання кінців хромосом білками, які розпізнають дволанцюгові розриви ДНК, зупиняють клітинний цикл чи запускають апоптоз. Разом з цим теломери скорочуються при кожному поділі клітин, та коли стають критично короткими – запускають сигнальні каскади, що зупиняють клітинний цикл та/чи призводять до загибелі клітин. Таким чином соматичні клітини мають обмежену кількість поділів (ліміт Хейфліка), яка залежить від довжини їх теломер. Скорочення теломер у клітині може компенсуватись завдяки активності ферменту теломераза, яка після кожного поділу може добудувувати втрачений фрагмент ДНК, що забезпечує більшу можливість для подальших поділів. Так у ракових клітинах проліферація клітин стає неконтрольованою та необмеженою. Аберрантне подовження теломер та зміни в експресії та/або активності теломерази є важливим для визначення ступеня агресивності раку[5]. Теломераза складається з

теломеразної зворотної транскриптази (Telomerase reverse transcriptase, TERT), з її матрицею РНК, компонентом РНК теломерази (Telomerase RNA component, TERC), що вважаються необхідними її компонентами, що забезпечують нормальне функціонування[16].

Результати експресії генів показали, що BRD4 експресується в широкому діапазоні соматичних клітин. Крім того, дані ChIP-seq (методу аналізу ДНК-білкових взаємодій, оснований на імунопреципітації хроматина (ChIP) та секвенування нового покоління), показали, що BRD4 займає багато енансерів і промоторів у неракових клітинах і, як правило, сприяє експресії генів[5].

Враховуючи центральну та багатofункціональну роль, яку BRD4 відіграє в різних процесах, включаючи регуляцію транскрипції, BRD4 є перспективною мішенню для дослідження нормальних та паталогічних станів з метою пошуку оптимальних механізмів впливу на його активність.

### 1.3. Функції BRD4 у патології

Так як BRD4 задіяний у основних етапах транскрипції, та відіграє важливу роль в інших механізмах клітинного циклу, білок проявляє свою ключову роль у паталогічних станах.

Нещодавне відкриття супер-енхансерів та їх зв'язок з BRD4 свідчить про те, що специфічність ВЕТі до раку може бути питанням кількості цих ділянок. Ці регіони характеризуються більшою щільністю зв'язування факторів транскрипції та регуляторів, а також кількістю маркеру активних енансерів - H3K27Ac та маркеру "збалансованих" ("poised") енансерів - H3K3Me1[17], яка на один порядок перевищує той, який виявляється на звичайних енансерах. При раку, супер-енхансери є центральними для підтримання ідентичності клітин і є ведучими для стимулювання експресії специфічних онкогенів, від яких ракові клітини стають сильно залежними.

Дослідження, проведені у всьому геномі, показали, що наявність та кількість супер-енхансерів позначають специфічність ФТ до онкогенів за широким діапазоном типів раку, виявляючи, що ці структури набуваються під час канцерогенезу і є унікальними для ракових клітин, і в значній мірі відсутні в нетрансформованих клітинах[18]. Таким чином, взаємодія BRD4 з супер-енхансерами підвищує стійкість ракових клітин, а дія BETі призводить до зменшення функціональної організації цих структур, різкого падіння експресії онкогенів і, як наслідок, пригнічення або загибель росту ракових клітин.

У супер-енхансерах, BRD4, разом із Медіатором, діє як каталізатор збору синергетичних транскрипційних комплексів високої щільності, що змінюють структуру, динаміку та функцію хроматину. Накопичення BRD4 і Медіатора на супер-енхансерах утворює механізм, який розділяє і концентрує апарат транскрипції, сприяючи перехресним зв'язкам і взаємодії білків[19]. Інгібування BRD4 має більший вплив, ніж регулярних енхансерів, що надають супер-енхансер-асоційованим генам вищу ступінь сприйнятливості до BETі та пояснюють, принаймні частково, селективну активність цих препаратів проти раку (рис. 1.1.В).

Порушення відновлення дволанцюгових розривів ДНК сприяє нестабільності геному та розвитку раку[20]. Зміни в структурі хроматину, в основному опосередковані посттрансляційними модифікаціями гістонів, причетні до ініціювання та розповсюдження реакції на пошкодження ДНК[21]. Зчитувач стану та основи організації хроматину, BRD4, нещодавно був запропонований як головний фактор у відновленні пошкоджень ДНК, що відбувається як за допомогою канонічних, так і нетрадиційних механізмів. Окрім того, що BRD4 є головним регулятором багатьох генів, що входять до системи відновлення ДНК або беруть участь у активації контрольної точки пошкодження ДНК, BRD4 також сприяє відновленню пошкоджень ДНК незалежно від транскрипції.

BRD4 необхідний для правильної активації шляху рекомбінації негомологічного кінцевого з'єднання (NHEJ)[22]. У В-лімфоцитах BRD4 необхідний під час перемикавання ізотипу імуноглобуліну (Ig) для завершення рекомбінації перемикачів класу після дволанцюгових розривів ДНК шляхом індукованої активацією цитидиндезамінази [22]. BRD4 необхідний для відновлення дволанцюгових розривів ДНК, індукованих іонізуючим випромінюванням, та сприяє перебудові генів у клітинах раку простати. Вплив BRD4 на систему відновлення ДНК не залежить від транскрипційної активності BRD4, а від його здатності формувати платформу між модифікаціями гістонів та компонентами механізму репарації ДНК (рис.1.2.А).

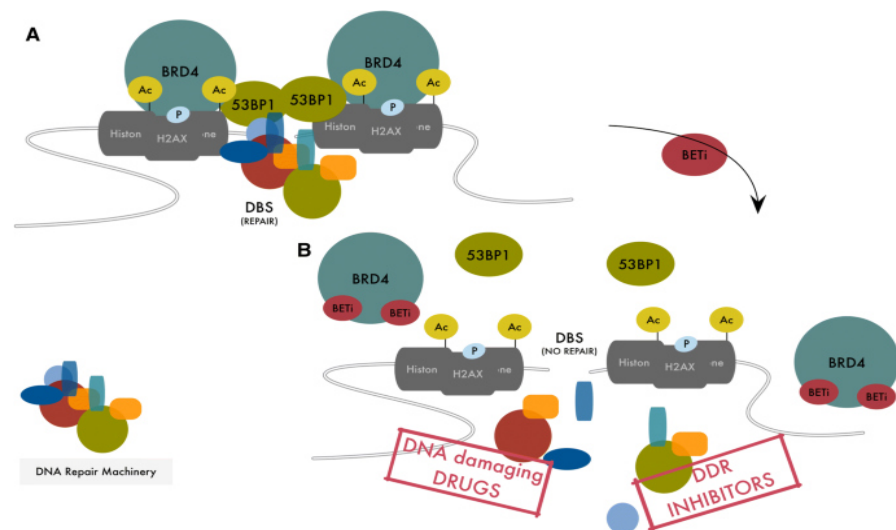


Рис 1.2. Схема функцій BRD4 в репарації пошкоджень ДНК[6]. **А.** BRD4 полегшує та стабілізує взаємодію 53BP1, який, у свою чергу, слугує посередником для складання та активації механізмів відновлення ДНК. **В.** Вплив BETi на систему відновлення ДНК.

Дволанцюгові розриви ДНК супроводжуються підвищеним ацетилюванням H4 (H4Ac) та фосфорилуванням H2AX. Накопичення цих модифікацій на обох кінцях призводить до накопичення BRD4, який, у свою чергу, працює як місце зв'язування для комплексу відновлення ДНК

(Рис. 1.2. А). Взаємодія з BRD4 на дволанцюгових розривах виконує функцію стабілізації зв'язування р53 зв'язуючого білку 1 (53BP1) з репараційними комплексами ДНК на відповідних сайтах, в моделі, яка сильно нагадує механізм дії BRD4 при стабілізації транскрипційних механізмів на енхансерах і промоторах під час транскрипції (Рис 1.2. А, В). Крім того, BRD4, за рахунок своєї ферментативної активності, може сприяти ацетилюванню або фосфорилуванню білків, що відновлюють ДНК, стимулюючи їх взаємодію. Це може призвести до утворення щільних багатобілкових комплексів, які змінюють фізичний стан хроматину (поділ фази рідина-рідина) [20].

На додаток до своєї ролі у сприянні діяльності NHEJ, BRD4 також був залучений до активації механізму контролю пошкодження ДНК[23]. Реплікативний стрес, спричинений підвищеною транскрипцією онкогену або реплікацією ДНК, є складним явищем, яке має серйозні наслідки для стабільності геному[24]. Неправильне функціонування механізму контролю пошкоджень ДНК призводить до руйнування вилки реплікації, дволанцюгових розривів ДНК та перебудови хромосом[25].

Крім цього попередні дослідження інших вчених показують, що ізоформа (iso B) BRD4 функціонує як ендогенний інгібітор реакції пошкодження ДНК, ізолюючи хроматин від поширення реакції на пошкодження ДНК[26]. У відповідь на індуковане пошкодження ДНК спостерігається посилена асоціація BRD4 з хроматином. У свою чергу, BRD4 регулює білки структурної підтримки хромосом 2 та 4 (SMC2, SMC4), компонентів конденсуючого комплексу II, що викликає конденсацію хроматину. Інгібування цього BRD4 індукує розкручення структури хроматину та підвищує стійкість до опромінення.

Функціональна участь BRD4 у активації контролю пошкоджень та репарації ДНК є причинами використання білка для терапії раку та передбачає нові умови для використання BETi як окремо, так і в поєднанні.

Докази того, що BRD4 позитивно регулює активацію механізму контролю пошкодження ДНК та репарацію дволанцюгових розривів, свідчать про те, що його фармакологічне пригнічення за допомогою BETi може підвищити чутливість ракових клітин до інгібіторів репарації ДНК, визначаючи можливу стратегію комбінування для терапії відповідних пухлин. Інформація про те, що використання BETi погіршує відновлення дволанцюгових розривів, вказують на те, що ці препарати можуть також покращувати цитотоксичну дію ДНК-пошкоджуючих агентів, таких як опромінення або хіміотерапія.

Нещодавні дослідження висвітлювали можливу роль BRD4 в аномальній регуляції теломер при раку. По-перше, BRD4 був залучений до аберантної транскрипційної регуляції теломерної зворотної транскриптази (TERT), в пухлинах мутованих на промоторі TERT. Нещодавно було виявлено дві повторювані мутації в межах промотору TERT, які пов'язані з агресивністю та утрудненим протіканням багатьох видів раку[27][28]. Ці мутації представляють найбільш поширені некодуючі зміни при раку та створюють аномальні сайти зв'язування для E-Twenty-Six (ETS) ФТ у промоторі, ведучи до підвищеної експресії TERT[29]. Було з'ясовано, що фактор ETS GABPA специфічно зв'язується з мутантним промотором TERT опосередковуючи взаємодію хроматину на великій ділянці та збагачує активні мітки гістонів, сприяючи транскрипції TERT [30]. BRD4 є учасником цього процесу як за допомогою прямого, так і непрямого механізму. Безпосередньо BRD4 накопичується на мутованому промоторі TERT, зв'язуючись з гіперацетильованими гістонами, та бере участь у стабілізації взаємодій хроматину на великій ділянці, ініційовані GABPA. Крім того, BRD4 зв'язується з промотором GABPA, регулюючи його транскрипцію та побічно допомагаючи транскрипційній організації на мутованому промоторі TERT, що призводить до підвищення експресії TERT. Використання BETi, а також нокдаун BRD4 призводять до значного зменшення експресії TERT та

пригнічення активності теломерази разом із значним зменшенням утворення активних міток гістону та взаємодії хроматину на великій ділянці, особливо в клітинах з мутацією промотора TERT.

Короткі теломери характеризуються підвищеним ацетилюванням гістону та фосфорилуванням H2AX[31]. Оскільки комплекс теломерази переважно діє на короткі теломери[32], можна припустити, що BRD4 діє як основа для утворення та стабілізації зв'язування комплексу теломерази та/або інших теломер-зв'язаних комплексів, що сприяють подовженню теломер шляхом накопичення до гіпер-ацетильованих гістонів на кінцях хромосом[32] (Рис 1.3.А, В).

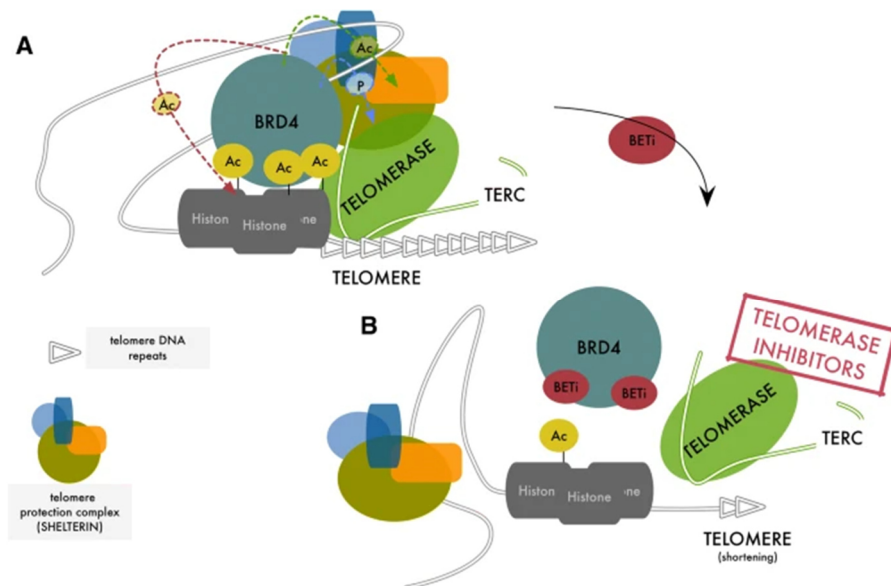


Рис 1.3. Схематичне зображення можливих функцій BRD4 при регуляції довжини теломер[6]. **А.** Підвищене ацетилювання гістонів на теломерах, сприяє зв'язуванню BRD4, що, в свою чергу, полегшує збірку комплексу захисту теломер і сприяє активності теломерази. **В.** Вплив BET1 на регуляцію теломер. BET1 конкурує з ацетильованими гістонами за зв'язування з бромодоменами BRD4, дестабілізуючи організацію комплексу захисту теломер і знижуючи активність теломерази.

Вплив на регуляцію теломерази та теломерних мутацій довгий час розглядалася як перспективна протиракова стратегія, а інгібітори теломерази показали ефективність у зменшенні життєздатності ракових клітин, росту пухлини та метастазування в доклінічних дослідженнях[33]. Однак цим препаратам не вистачає специфічності до раку та не були проведені клінічні випробування через високу токсичність та побічні ефекти[34]. Актуальність BRD4 у селективному контролі експресії TERT за присутності мутацій промотору, асоційованих з раком, можливо свідчить про те, що інгібування BRD4 за допомогою BETi може забезпечити альтернативне та більш селективне інгібування теломерази. Крім того, можлива комбінація з BETi може покращити ефективність інгібіторів теломерази при менших дозах, зменшуючи ступінь небажаних побічних ефектів.

З 2005 року багато досліджень підтвердили, що BRD4 грає роль в регуляції транскрипції та латентності ВІЛ. Останні дослідження показали, що BRD4 пригнічує транскрипцію ВІЛ та сприяє затримці розвитку ВІЛ. На підтвердження пізніших досліджень було показано, що інгібування BRD4/BET інгібітором JQ1 активує транскрипцію ВІЛ. Через свої BD BRD4 може бути залучений до промотору ВІЛ шляхом зв'язування з різними ацетилгістонами, включаючи AcH3 та AcH4.

Крім вищеперерахованого BRD4 відіграє важливу роль у розвитку NUT карциноми, який є одним з найагресивніших проявів злоякісних пухлин людини. Даний тип раку в більшості випадків розвивається за рахунок BRD4-NUT онкопротеїну утвореного хромосомною транслокацією. BRD4-NUT блокує диференціацію та стимулює ріст клітин NUT карциноми. Білок сімейства BET зв'язує NUT з ацетильованим хроматином через свої бромодомени, утворюючи великі гіперацетильовані ядерні вогнища. Функція цих вогнищ достеменно не відома, проте вони спостерігались в усіх пухлинних тканинах BRD4-NUT. Критичних характер взаємодій бромодомен-ацетил-лізину був використаний для розробки BETi, які швидко

індукують диференціацію клітин NUT карциноми як *in vitro*, так і *in vivo* з поступовим зникненням вогнищ гіперацетильованих ядер. Вплив інгібіторів BET на розвиток NUT карциноми привернуло уваги до клінічних тестувань лікування даного типу раку та багатьох інших досліджень, що показали, що багато інших типів раку залежать від BRD4[35].

Таким чином у нормі та патології BRD4 залучений у цілий спектр клітинних процесів. Він відіграє важливу роль у регуляції транскрипції, контролю пошкоджень ДНК та регуляції довжини теломер. Тому BRD4 залишається перспективною мішенню у створенні протиракової терапії.

#### 1.4. Дослідження Бромодомену 1 та Бромодомену 2

Враховуючи описану роль BRD4 та перспективу створення механізмів інгібування та деградації даного білка, було проведено дослідження ролі доменів BD1 та BD2 у функціонуванні BRD4 для пошуку найбільш ефективною (мішені) для інгібування.

Послідовності BD1 та BD2 є досить консервативними та гомологічними. Проте наявність певних відмінностей у структурі на послідовності можуть свідчити про відмінності у функціонуванні за нормального та паталогічного станів. В першу чергу це може спричиняти різницю у специфічній взаємодії з різними білками, що і буде впливати на подальшу функцію.

Так у дослідженнях було запропоновано, що BD1 і BD2, мають різні функції через їх взаємодію з різними лізин-ацетильованими гістонами (наприклад, H3 і H4) або з транскрипційними білками. Так, BD1 демонструє сильнішу афінність до тетра-ацетильованого гістону H4 ніж BD2. BD1 зв'язується з діацетильованою міткою H4K5AcK8Ac, щоб закріпити пов'язані з ним білки до промоторів і енхансерів цільового гена в хроматині. BD1 також може зв'язуватись з ацетильованим залишком лізину гістону

H3[5]. BD2 не взаємодіє з моно-ацетильованим H3K4ac, але демонструє сильну взаємодію з діацетильованим H3K4AcK9Ac. Крім того, BD2 здебільшого знаходиться у вільному стані та пов'язаний із взаємодією з негістоновими білками[36].

Подальші біохімічні дослідження показали, що BD1 білків BET в першу чергу відповідає за зв'язування з хроматином[37], а нещодавні функціональні дослідження показали, що BD1 також відповідає за підтримання злоякісного фенотипу клітин гострої мієлоїдної лейкемії[38].

Відмінності у функціонуванні BD1 і BD2 також було підтверджено при дослідженні iBET. Було виявлено, що iBET-BD1 ефективні у вивільненні зв'язаного з хроматином BRD4, тоді як iBET-BD2 були значною мірою неефективним[39].

Ці дослідження підтримують ідею того, що селективні інгібітори BD1 можуть бути ефективнішими, ніж інгібітори pan-BET в ракових клітинах, тому саме BRD4 BD1 був обраний мішенню для нашого дослідження.

## 1.5. Система PROTAC

Як метод деградації білку-мішені є перспективним створення комбінованої молекули вибіркового протеолізу білка (PROTAC). PROTAC – це гетеробіфункціональна мала молекула, що складається з двох активних доменів і лінкера, здатного видаляти певні небажані білки. Замість того, щоб діяти як звичайний інгібітор ферменту, PROTAC працює, викликаючи селективний внутрішньо-клітинний протеоліз. Молекули PROTAC складаються з двох ковалентно зв'язаних молекул, що зв'язують білки: одна, здатна взаємодіяти з E3 убіквітиновою лігазою (зазвичай використовується талідамід, леналідомід, помалідомід), і інша, зв'язується з цільовим білком, обраним для протеолізу. Наближення лігази E3 до цільового білка призводить до убіквітинування і подальшої деградації цільового білка

протеасомою[40]. Оскільки для PROTAC потрібно лише зв'язувати свої мішені з високою селективністю (а не пригнічувати ферментативну активність цільового білка), в даний час прикладається багато зусиль, щоб відновити раніше неефективні молекули інгібіторів як PROTAC для препаратів наступного покоління. Система PROTAC спричиняє деградацію білка-мішені шляхом "викрадення" клітинної системи Убіквітин – протеосома (UPS). UPS складається з активуючого E1 ферменту, який кон'югується з ферментом E2, переносячи молекулу убіквітину до E2. Потім E2 зв'язується з лігазою E3 у комплексі, який потім може розпізнавати білки-мішені для подальшого мічення убіквітином та деградації протеасомою 26S (Рис 1.4). Ефективність дії цих молекул залежить від здатності наближати білок-мішень та E3-лігазу за допомогою створення системи лігандів до білка-мішені (protein of interest, POI) та E3-лігази та лінкеру, що їх з'єднує[41]. Саме ця система і представляє собою PROTAC. Таким чином при створенні PROTAC не є необхідним вплив лігандів на активність білка-мішені, а лише наявність зв'язку.

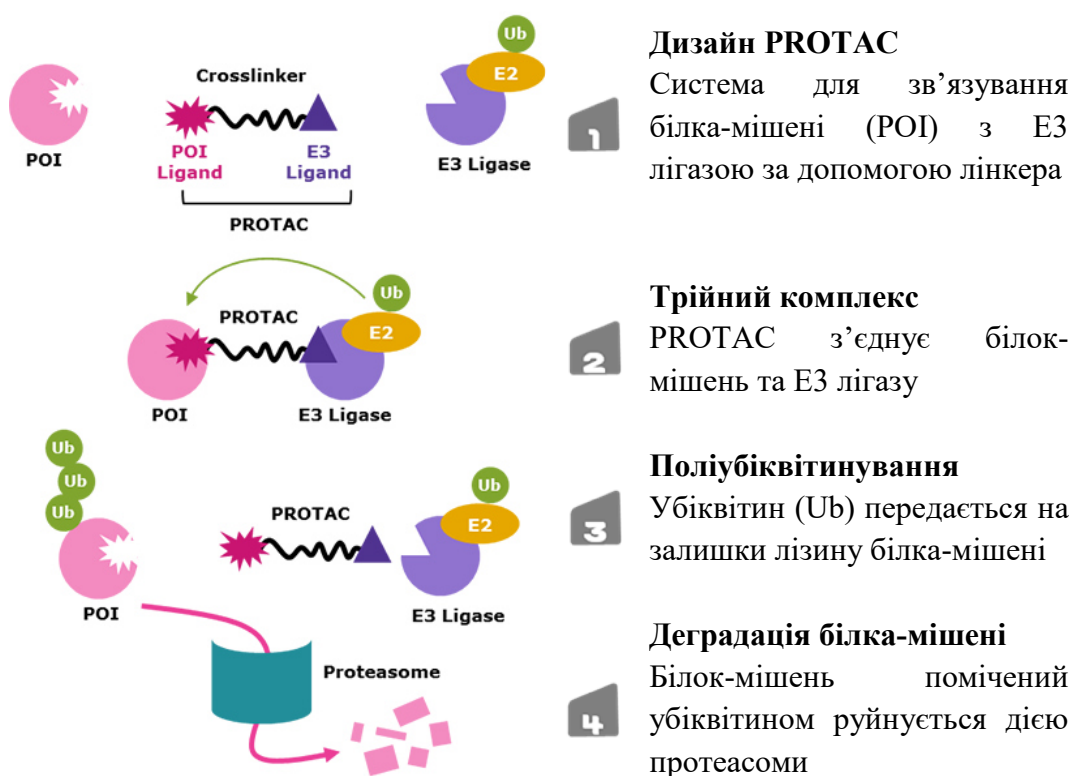


Рис 1.4. Схематичне зображення механізму дії системи PROTAC.

PROTAC слугує ефективним інструментом, що дозволяє виконувати деградацію білка-мішені на основі низькомолекулярних сполук. За рахунок досить простого механізму, що не потребує генетичних модифікацій клітин, PROTAC є досить перспективним у використанні так як дозволяє специфічно відокремлювати білки-мішені. Крім того за рахунок перехідних взаємодій з білком-мішенню, PROTAC є ефективним навіть за низьких концентрацій, на відміну від тих, що потребують високих концентрацій для максимальної взаємодії з білком-мішенню, наприклад, традиційні низькомолекулярні інгібітори.

Таким чином, PROTAC є привабливим механізмом для лабораторних та клінічних досліджень, що призвело до генерації систем PROTAC, що руйнують циклін-залежні кінази, ліпідкінази, пептидази, протеїн-ізомерази, структурні білки, ФТ, протеїнкінази та білки регуляції епігенетики. Саме цей спосіб деградації BRD4 був обраний для даного дослідження.

### 1.6. Існуючі PROTAC системи на BRD4

Для створення системи PROTAC важливим є пошук речовин, що утворюють стабільні та специфічні взаємодії з білком-мішенню. Так, був використаний селективний інгібітор BRD4 на основі дигідрохіназоліну (Рис 1.5. А). Шляхом модифікації цієї сполуки було розроблено два тісно зв'язаних та сильнодіючих інгібітори BRD4 (рис 1.5. Б, В)[42].

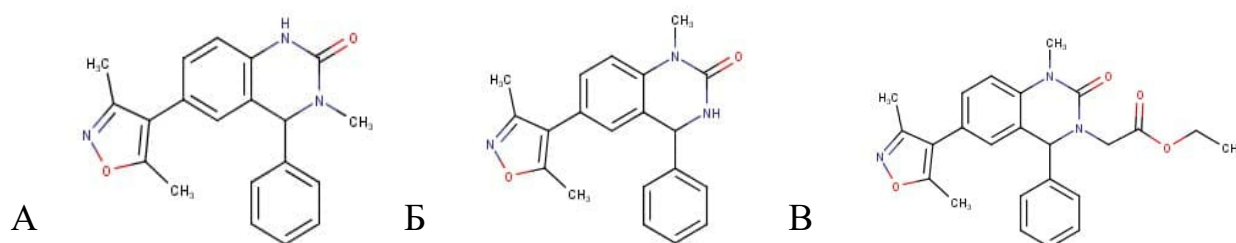


Рис 1.5. Структурні формули інгібіторів BRD4: **А** - селективний інгібітор на основі дигідрохіназолінону, **Б** та **В** - інгібітори розроблені шляхом модифікації сполуки А.

Молекулярний докінг сполуки В з рисунка 1.5 з BD1 BRD4 показав, що боковий ланцюг етилацетату може виконувати роль лінкера для зв'язування сполуки Б з лігандом Е3 цереблону леналідомідом/помалідомідом для розробки потенційних PROTAC. В зв'язку з цим був розроблений та синтезований новий клас низькомолекулярних деструкторів BRD4 з використанням сполуки Б, як інгібітор, та леналідомід чи помалідомід, як ліганд для Е3 лігази. Таким чином було синтезовано 9 систем PROTAC з різними варіантами лінкера, які потім були оптимізовані для підвищення афінності. Надалі створені системи були перевірені у системі *in vivo* на клітинній лінії THP-1, що підтвердило ефективну стимуляцію деградації білка BRD4.

У іншому ж дослідженні система PROTAC була створена з JQ1, інгібітора BRD4, (рис. 1.6. А) та ідасанутліна, інгібітора MDM2, Е3 убіквітин-протеїн лігази, (рис. 1.6. Б) з'єднаний 13 атомним лінкером на основі поліетиленгліколю[43]. Повний вигляд створеної PROTAC зображений на рисунку 1.6. В.

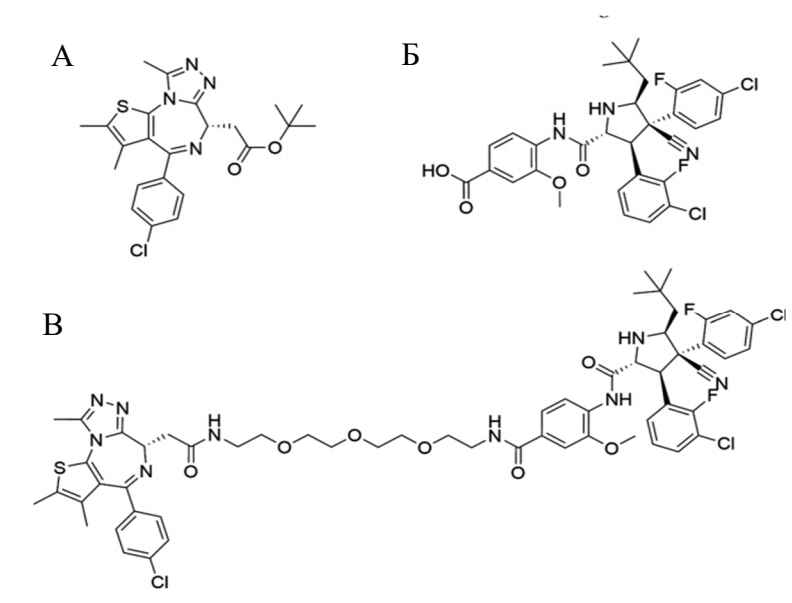


Рис. 1.6. Структурні формули: А - інгібітора BRD4/BET, JQ1, Б - ідасанутліну (RG7388), В - BRD4-деградуюча PROTAC[43].

Після синтезу нової PROTAC, її здатність індукувати деградацію BRD4 була перевірена за допомогою обробки клітинних ліній HCT116 PROTACом та проведення імуноблотингу, що показало майже повну деградацію, 98% відносно контрольних клітин. В порівнянні з обробкою цих ж клітин не модифікованим інгібітором BRD4, JQ-1, не спостерігалось зменшення білку-мішені.

Більше того, декілька різних систем PROTAC проти BRD4 були успішно протестовані у доклінічних дослідженнях на моделях мишей з гострим лімфобластним лейкозом, раком молочної залози та інших моделей, що підтвердило ефективність PROTAC у деградації білка-мішені[44]. Наявна інформація про проведення клінічних досліджень, результати яких ще не були опубліковані, що підтверджує актуальність та перспективність використання даного підходу.

Таким чином це доводить, що система PROTAC є перспективною методикою терапії раку для спричинення протеасомної деградації BRD4. Враховуючи її новітність, пошук та створення альтернативних систем на наш білок-мішень є актуальним.

## РОЗДІЛ II. Матеріали та методи дослідження

### 2.1. Обладнання використане для дослідження

В дослідженні було використано наступне обладнання: багатоканальний автоматизований диспенсер MultiDrop (Thermo Fisher Scientific, США), касета для розкапування з металевими наконечниками (Thermo Fisher Scientific, США), центрифуга Multifuge X1 Pro (Thermo Fisher Scientific, США), система для очищення води NANO pure Diamond B 11911 (Barnstead MicroPure Thermo, США), інкубатор iEMS (Thermo Fisher Scientific, США), багатоканальна автоматизована піпетка (Thermo Fisher Scientific, США), міні-центрифура Vortex mixer (Thermo Fisher Scientific, США), акустичний диспансер Echo 550 (Labcyte inc., США), ПЛР система ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США), 384-лункові плати (Thermo Fisher Scientific, Cat. 4309849, США), термостабільні плівки ThermalSeal RT2 (Excel Scientific, Cat. TS-RT2, США), прилад для вимірювання поверхневого плазмонного резонансу Biacore T200 (Cytiva, Швеція), 384-лункові плати (Greiner Bio-One, Cat. 781270, США), прилад для заклеювання плат фольгою Thermo Abgene Microplate Sealer ALPS 300 (Thermo Fisher Scientific, США).

### 2.2. Матеріали та реактиви

В дослідженні було використано наступні реактиви: HEPES (Bio Basic Inc., Cat: HB0264, Канада), Tris (Sigma, Cat: 252859, США) NaCl (Thermo Fisher Scientific, Cat: BP358-1, США), Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Bio Basic Inc., Cat: SB0879(ST1220) Канада), флуоресцентний барвник Sypro Orange (SO) (Thermo Fischer Scientific, Cat: S6650, 5000x stock, США), диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, Cat: 472301, США), органічний детергент Tween 20 (Sigma, Cat: P9416, США), стрептавідинові чіпи (SA chip)

(Cytiva, Cat: 22054648-AD, Швеція), нейтравфідінові чіпи (NA chip) (Cytiva, Cat: 29439502-AC, Швеція), біоцитин (Thermo Fisher Scientific, Cat: 28022, США), HBS-N буфер, рН 7.4 (Cytiva, Cat: BR100670, Швеція), (+)-JQ-1 (HelloBio, Cat: HB1448, Ірландія).

### 2.3. Схема проведення дослідження

Для створення системи PROTAC, була запропонована схема дослідження продемонстрована на рисунку 2.1.



Рис 2.1. Схема етапів проведення дослідження з метою розробки системи PROTAC для ініціації протеасомної деградації білка-мішені.

Першим етапом було заплановано проведення віртуального скринінгу для пошуку речовин, що будуть проявляти селективну взаємодію з білком-мішенню. Дана фаза є стандартною для процесу розробки лікарських препаратів, що дозволяє створити таргетну вибірку речовин на мішень з врахуванням необхідних властивостей сполук перевірених у математичних моделях.

Після створення таргетної бібліотеки відбувається перший етап *in vitro* тестувань для перевірки речовин на предмет наявності взаємодії з білком-мішенню. Для цього відбувалось тестування відібраних речовин методом визначення зсуву температури плавлення білка (Thermal Shift Assay, TSA), що дозволяє проаналізувати речовини, без визначення точних параметрів, але за короткий час та відносно низьку вартість. Даний етап є фазою первинного скринінгу, що формує процес відбору речовин з потенційно перспективними властивостями.

Наступним етапом дослідження було заплановано перевірка міцності та стабільності взаємодії речовин, які були відібрані після етапу первинного скринінгу, з визначенням кінетичних параметрів. Даний етап проводився за допомогою методу Поверхневого Плазмонного Резонансу (Surface Plasmon Resonance, SPR), що складатиме фазу вторинного скринінгу, яка обумовлена детальним визначенням властивостей речовин.

Після визначення кінетичних параметрів та відбирання речовин з характеристиками специфічних та стабільних взаємодій буде проводитись підбір лінкеру та створення молекули PROTAC. Наступним етапом заплановано провести тестування на предмет утворення комплексу з цереблоном та можливість ініціювання подальшої протеасомної деградації білка-мішені. Для даного етапу був обраний метод AlphaLISA з використанням набору оптимізації PROTAC для зв'язування бромодомен-цереблон BET

Далі відбуватиметься перевірка речовин на цитотоксичність та ефективність протеасомної деградації білка у клітинних моделях.

У роботі над дослідженням використовувався високопродуктивний скринінг (HTS), що є одним з найпопулярніших принципів досліджень бібліотеки речовин на ранніх етапах розробки медичних препаратів за допомогою роботизованого процесу. HTS дає можливість за короткий час проаналізувати багато речовин, не використовуючи великі об'єми реагентів,

чим допомагає знизити вартість експерименту. HTS – це принцип, що включає в себе різноманітні методи, такі як детекція поляризації флюоресценції, люмінесцентні чи флуоресцентні методи і тому подібне.

В даній роботі висвітлені результати перших 3 етапів дослідження.

#### 2.4. Створення бібліотеки речовин на BRD4 за допомогою віртуального скринінгу

Протягом останніх років компанія Enamine Ltd акумулювала бібліотеку, що налічує декілька мільйонів малих молекул доступних для тестування. Речовини, що використовувались у даній роботі були отримані із доступних порошкових стоків компанії Enamine Ltd.(Київ, Україна).

Пошук речовин, перспективних для створення системи PROTAC проти BRD4, та формування скринінгових вибірок проводився науковими співробітниками Дмитром Дуденко та Оленою Савич. На основі пошуку речовин, що демонструватимуть специфічну та стабільну взаємодію з BRD4 BD1 було проведено віртуальний скринінг та створено 2 вибірки речовин (Вибірка 1 – 320 сполук та Вибірка 2 – 190 сполук).

Для вибору ліганду, що слугуватиме зразком для створення бібліотеки, та підготовки структури активного центру білка-мішені використовувалися бази даних UniProt, ChEMBL та Protein Data Bank. Референсною сполукою був відомий ліганд BRD4 3U5L\_08K; його 3D структура та інформація про активний центр були взяті з даних рентгеноструктурного аналізу [1].

Для пошуку речовин, що складатимуть вибірки проводився shape-based fingerprinting та similarity search за даними про 3U5L\_08K, які робилися за допомогою пакетів RDKit та ODDT. Докінг проводився в DOCK3.7.3 для визначення характеристик, які важливі для відбирання потенційних лігандів. Таким чином була отримана інформація про розміщення 3U5L\_08K в активному центрі BRD4 (Рис 2.2). 3U5L\_08K розташовується як у

ліпофільному сендвічі, утвореному навколо спряженого кільця Val87, Leu92, Leu94 і Tyr97 з одного боку, та Phe83 й Ile146 з іншого. Крім того сполука 3U5L\_08K продемонструвала взаємодію з гідروفобним суб-карманом утвореним Trp81, Pro82, Met149.

На основі взаємодії 3U5L\_08K з BRD4 були сформовані параметри докінгу бромодому для пошуку речовин:

1. Присутня взаємодія ліганду з Asn140, що демонструє наявність водневого зв'язку ліганду з активним центром;
2. Наявність каскаду з 8 молекул води, що зустрічається у рентгенній структурі BRD4. Він грає важливу роль у водневих зв'язках лігандів з активним центром, особливо біля Tyr97.
3. Наявні додаткові взаємодії з гідروفобним суб-карманом.

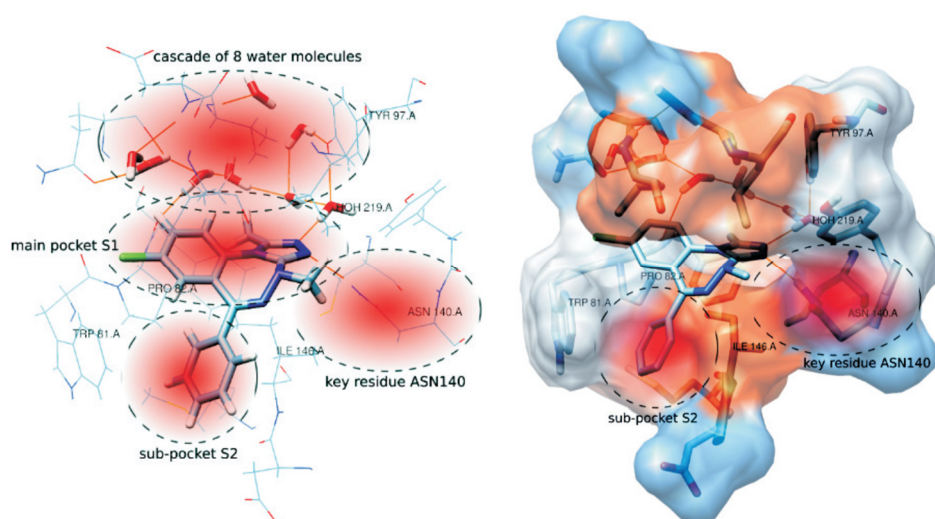


Рис. 2.2. Дані рентгеноструктурного аналізу BRD4 BD1 з лігандом 3U5L\_08K [1].

Створення вибірки сполук для першого етапу тестування було проведено у два підходи:

- створення першого варіанту вибірки (вибірка 1), проведення тестування відібраних речовин;

- на основі отриманих експериментальних результатів була проведена оптимізація віртуального скринінгу для створення фінальної таргетної бібліотеки (вибірка 2) для тестування *in vitro*.

Вибірка 1 була створена виключно за допомогою electroshape similarity search. Для всієї вибірки було згенеровано 3D структури, для яких оптимізували геометрію. Потім для референсної сполуки і для сполук з вибірки були згенеровані shape-based fingerprints. Для структур з бази було пораховано подібність (аналогічно до Tanimoto similarity). 320 найбільш подібних структур було відібрано для скринінгу. Після тестування 320 сполук (вибірки 1) методом TSA, метод створення вибірок було оптимізовано та застосовано для створення наступної вибірки.

Для створення вибірки 2 було проведено similarity search за shape-based fingerprints проти 9 структур, які продемонстрували найкращі результати у тестуванні вибірки 1, та раніше-використаної референсної речовини. По 400 сполук, що найбільш подібні на кожну «батьківську» структуру (9 лігандів та референсна сполука), було відібрано для докінгу.

Кожен такий набір було посортовано за docking score. Далі із кожного набору було відібрано 20-30 сполук, які демонструють найкраще позиціонування у актиному центрі, мають найбільший docking score.

В результаті було відібрано 190 структур, які і сформували вибірку 2, для тестування у наступному етапі дослідження та визначення потенційних сполук для створення системи PROTAC на BRD4.

## 2.5. Первинний скринінг бібліотеки речовин на BRD4 методом TSA.

Тестування речовин на предмет взаємодії з BRD4 проводилось за допомогою методу визначення зсуву температури плавлення (Thermal Shift Assay, TSA). Даний метод використовується для вимірювання зміни температури денатурації білка. В основі методу лежить використання

спеціалізованих флюорисцентних барвників, таких як Sypro Orange (SO), які неспецифічно зв'язуються з гідрофобною частиною білку. Таким чином, коли білок розгортається при підвищенні температури, флюорисценція барвника посилюється через утвореного гідрофобного середовища, (Рис 2.3) в той час як у водному середовищі флюорисценцію приглушується. За рахунок цього можна визначити зміни стабільності протеїну в залежності від коливання концентрацій діючої речовини, рН буфера чи іонної сили, окислювально-відновного потенціалу, мутації послідовності і тд.

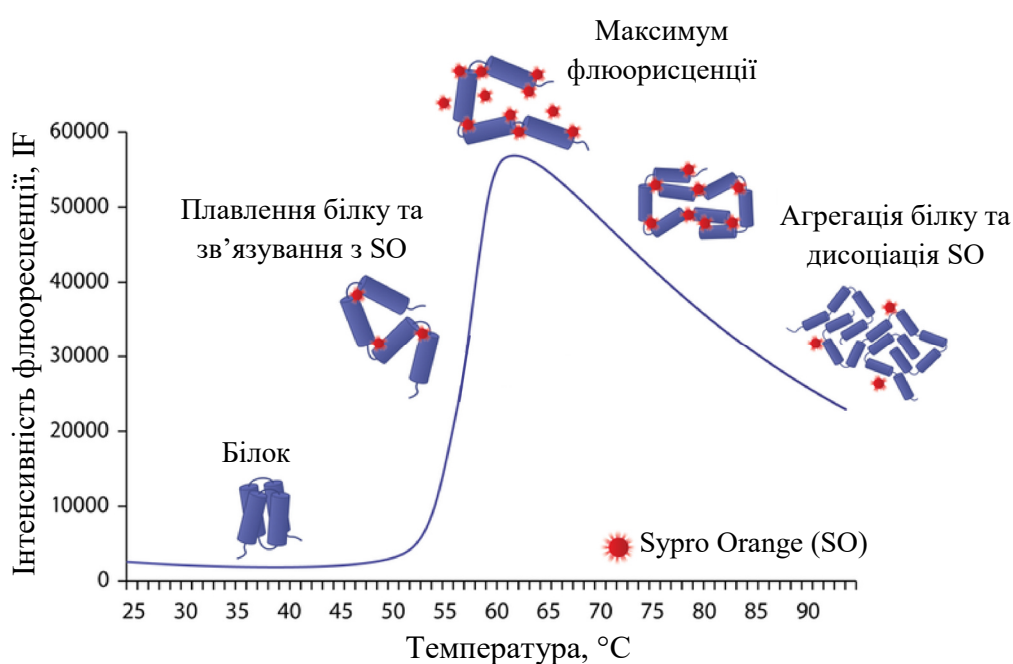


Рис 2.3. Схематичне зображення принципу тестування речовин методом TSA використовуючи гідрофобний барвник SO.

Перевагами методу є відсутність потреби у використанні специфічних міток для білків, швидкість та простота. Недоліком методу є потреба у великій кількості та чистоті білка.

## 2.6. Білок для тестування речовин методом TSA

Для тестування методом TSA використовувався рекомбінований, вкорочений His-Tag домен 1 BRD4. Для його отримання клітини *Escherichia coli* були трансформовані плазмідною 38942 (вектор NIC28-Bsa4) від Addgene. Даний етап був проведений Васьків Діаною.

Амінокислотна послідовність домену 1 (AA 44-168), з N-кінцевим His6-тегом та 16-амінокислотним лінкером представлена нижче:

10	20	30	40
MHHHHHSSG	VDLGTENLYF	QSMNPPPET	SNPNKPKRQT
50	60	70	80
NQLQYLLRVV	LKTLWKHQFA	WPFQQPVDAV	KLNLDPDYYKI
90	100	110	120
IKTPMDMGTI	KKRLENNYYW	NAQECIQDFN	TMFTNCYIYN
130	140		
KPGDDIVLMA	EALEKLFLQK	INELPTEE	

Червоним позначений 6xHIS tag, зеленим – BD1 BrD4

Фрагмент послідовності BRD4 відповідає запису послідовності O60885.1 у базі даних UniProtKB.

Кількість амінокислот: 148

Молекулярна маса: 17549.07 Да

## 2.7. Тестування таргетних бібліотек на BRD4 методом TSA

Дослідження проводилось за раніше описаних умов для дослідження BRD4 методом TSA[1]. Детектування флюорисценції барвника SO та контроль температурних режимів відбувались за допомогою пристрою ViiA 7 Real-Time PCR System.

Температурний діапазон плавлення білка 35-80 °С з кроком 1.6 °С/сек до досягнення температури в 35 °С і з кроком 0.1 °С/сек протягом діапазону 35-80 °С. Зчитування флуоресцентного сигналу відбувалось з інтервалом 2 секунди використовуючи фільтри EX470/EM623 nm.

Вибірка 1 (320 сполук) та вибірка 2 (190 сполук) тестувались за одним протоколом експерименту проілюстрованим у вигляді схеми на рисунку 2.4.

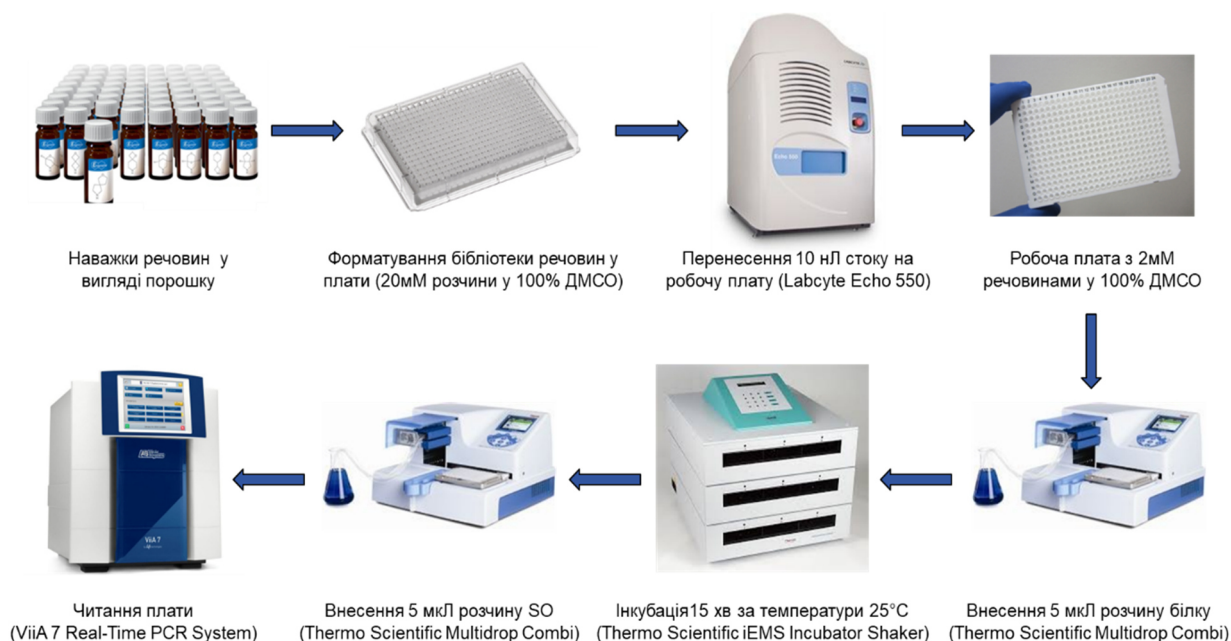


Рис 2.4. Схема проведення експерименту методом TSA.

## 2.8. Дослідження селективності речовин на неспоріднених білках методом TSA.

З метою перевірки специфічності підібраних лігандів до BRD4 використовували білки SIRT-1 та Abl SH2. Речовини тестувались квадруплікатами у 384-лункових платах, використаних у попередньому етапі, за концентрації 20 мкМ та 1% ДМСО, у об'ємі реакції 10 мкл.

Для білка SIRT-1 використовували буфер 20 мМ Tris pH 8.0, 50 мМ NaCl. Для Abl SH2 буфер складався з 50мМ Tris pH 7.5, 150 мМ NaCl та 2мМ MgCl<sub>2</sub>.

Для SIRT1 та Abl SH2 фінальна концентрація білків – 100 мкг/мл (1,3 мкМ та 1 мкМ, відповідно), барвника SO – 8х.

Протокол тестування (розкапування та інкубування) аналогічний до експерименту з BRD4 (Рис 2.4).

Температурний діапазон плавлення білка складав 35-75 °С (з кроком 1.6 °С/сек до досягнення температури в 35 °С і кроком 0.5 °С/сек протягом температурного діапазону 35-75 °С) та 40-80 °С (з кроком 1.6 °С/сек до досягнення температури в 40 °С і кроком 0.5 °С/сек протягом температурного діапазону 40-80 °С) для SIRT1 та Abl SH2 відповідно.

Зчитування флуоресцентного сигналу відбувалось з інтервалом 2 секунди використовуючи фільтри EX470/EM623 nm.

## 2.9. Методи аналізу даних у TSA

Результати, що були отримані після зчитування, спершу аналізуються у програмному забезпечення Protein Thermal Shift. У ньому переглядаються графіки та вивантажуються данні у зручному форматі, для подальшого аналізу.

В результаті тестування методом TSA обраховується температура плавлення білка ( $T_m$ , рис 2.5) з отриманої кривої для кожної лунки плати. Для обрахунку даної характеристики використовується derivative  $T_m$  ( $T_mD$ ).  $T_mD$  розраховується за допомогою визначення похідної кривої плавлення.

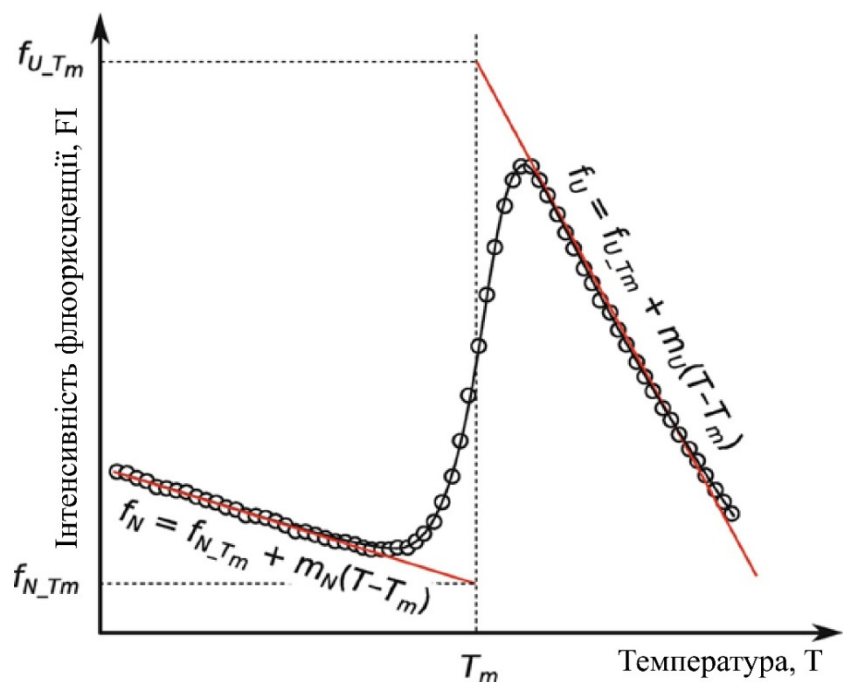


Рис 2.5. Репрезентативна крива плавлення глобулярного білка методом TSA, візуалізована за допомогою флуорисценції як функція температури. Точка температурної осі, що відповідає середині кривої плавлення за якої половина білка розгорнута називається температурою плавлення  $T_m$

У TSA важливим параметром для аналізу є зсув температури плавлення ( $dT_m$ ), що вираховується як різниця між температурою плавлення білка з речовинами та білка у лунках контролю, де фіксується вплив розчинника на білок (Формула 2.1).

$$dT_m = T_m(\text{білок з речовиною}) - T_m(\text{контроль}) \quad (2.1)$$

У разі присутності зсуву температури плавлення білка спричиненого речовиною, можна говорити про характер активності сполуки. Якщо зсув іде в сторону нижчих температур, тоді речовина є дестабілізатором, якщо ж зсув іде в сторону вищих температур - стабілізатором. Оскільки для PROTAS головним є наявність утворення взаємодії сполуки з білком, то важливими є будь-який характер взаємодії.

Згідно правила 3-SD, потенційно активними вважаються сполуки, що спричиняють зсув температури плавлення білка, що в 3 рази більший за стандартне відхилення ( $T_m$  RSD) у контрольних зразках, оскільки так враховується ймовірність випадкових змін та коливань у результатах (Формула 2.2).

$$|dT_m(\text{білок з речовиною})| > 3 * T_m \text{ RSD} (\text{контроль}) \quad (2.2)$$

Таким чином формується критерій відбору потенційно активних сполук, який є індивідуальний для кожного експерименту та для кожної плати в межах одного експерименту.

У HTS при тестуванні великих бібліотек збільшується ймовірність отримання викидів, що вирізняються від загального тренду даних, тому для аналізу даних часто використовують робастну (robust) статистику.

У робастній статистиці для обрахунків результатів використовують медіану та стандартне відхилення за медіаною (RSD), за допомогою чого артефактні данні (точки, що випали в результаті механічних помилок чи неточностей) мають не значний вплив на обрахунок результатів.

Крім того у HTS необхідно перевіряти якість проведеного експерименту, quality control (QC). QC обраховується для кожної плати індивідуально з даних контрольних точок експерименту (у реакції присутній білок з розчинником, без речовини). Параметром QC для TSA є RSD контролю, що не повинен перевищувати 0.5 °C та значення  $T_m$  тестованого білка, що повинен відтворюватись з наявними літературними даними чи отриманих у попередніх експериментах.

Отриманні результати візуалізувались у програмному забезпеченні TIBCO Spotfire, Excel, MarvinView та MarvinSketch.

## 2.10. Загальний опис методу вторинного скринінгу – Поверхневого Плазмонного Резонансу

Для проведення вторинного скринінгу був використаний метод Поверхневого Плазмонного Резонансу (Surface Plasmon Resonance, SPR), що є методом HTS. SPR – це біофізичний метод, за допомогою якого можна детектувати зміну маси білка-мішені іммобілізованого на поверхні чіпа у момент взаємодії із тестованою речовиною. Після зв'язування аналіту (тестованих речовин) змінюється показник заломлення металевої плівки, що призводить до зміни кута відбиття світла (Рис 2.6. А, Б).

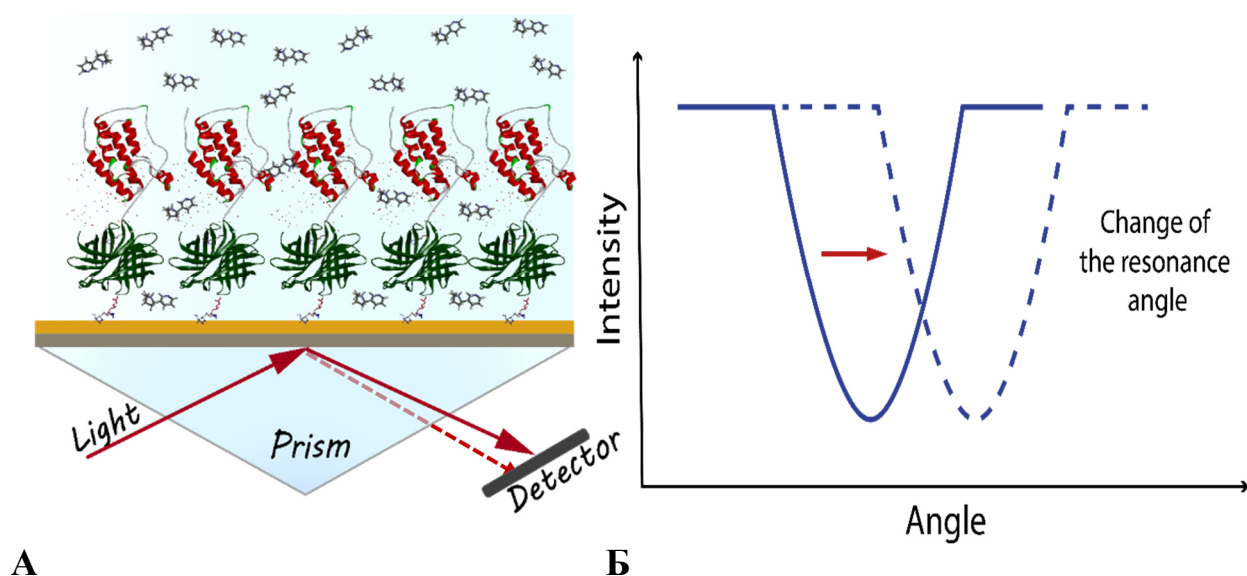


Рис 2.6. Принципи методу SPR: **А.** Принцип детектування взаємодії тестованих речовин з білком-мішенню іммобілізованим на поверхні чіпа; **Б.** Принцип вимірювання взаємодії речовин з білком. Зміна кута відбивання світла у часі.

Параметри, доступні з аналізів за допомогою методу SPR:

- Специфічність взаємодії тестованих речовин з мішенню;
- Спорідненість: міцність утвореного комплексу (KD, KA);
- Кінетика: швидкість асоціації та дисоціації (ka, kd).

Переваги SPR-аналізу включають низьку кількість білка, необхідного для тестування, виявлення специфічності та кінетики молекулярних взаємодій у реальному часі та без міток.

Особливості методу полягають у процесі іммобілізації білка-мішені на поверхню чіпа, що забезпечує обмеження рухливості його молекул та розташування моношаром, потрібні для тестування.

За умови необхідності гомогенного розташування ліганду на поверхні чіпа переважно використовують спосіб іммобілізації за допомогою захоплення стрептавідину/нейтравідину-біотину. Для цього є декілька причин:

- зв'язування біотину зі стрептавідином/нейтравідином є одним із найсильніших нековалентних взаємодій, відомих у природі;
- рівномірне розташування білка на поверхні чіпа;
- еквівалентний доступ тестованих сполук до активного центру білка.

Тому взаємодія стрептавідину/нейтравідину-біотину є оптимальним варіантом для використання у пошуку нових лікарських засобів.

Для детекції у методі SPR використовуються біосенсори, що утворюються шляхом іммобілізації білка-мішені на поверхню чіпа. Зазвичай під час тестування поверхня чіпа розділяється на 4 лунки (Рис 2.7), кожна з якої вимірюється незалежно від інших, тим самим можуть бути проведені тести для різних мішеней за ідентичних умов. За правилами тестування 1 лунка залишається вільною (іммобілізація не проводиться) – референсна лунка. На інші ж лунки може проводитись іммобілізація білка (активні лунки). Таким чином віднімаючи взаємодію тестованих речовин з референсною лункою від активної лунки можна отримати значення рівне взаємодії речовин з білком-мішенню, компенсуючи артефакти(Рис 2.8).

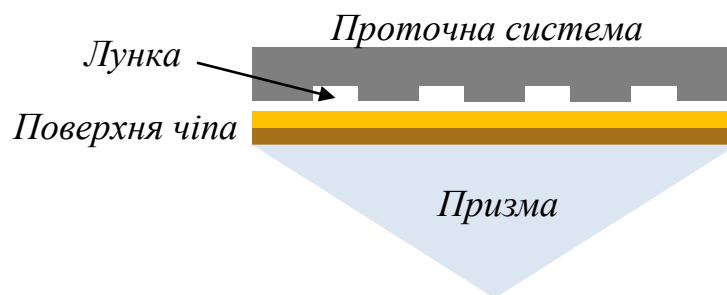


Рис 2.7. Схематичне зображення лунки на поверхні чіпа у методі SPR.



Рис.2.8. Схематичне зображення принципу отримання кривих взаємодій речовин з білком-мішенню використовуючи метод аналізу СПР. **А.** Сенсорграма отримана для референтної лунки; **Б.** Сенсорграма отримана для активної лунки; **В.** Отриманна сенсорграма взаємодій речовини з білком-мішенню, отримана шляхом віднімання сигналу з референтної лунки від активної. Результати представляються, як залежність сигналу (RU) від часу.

## 2.11. Білок для тестування методом SPR

Для тестування методом SPR був отриманий біотинельований BRD4 з AviTag, для можливості використання іммобілізації методом стрептавідин/нейтравідин-взаємодії. Дана форма білка була отримана Васків Діаною з культури клітин *Escherichia coli* трансформованих вектором pET-6xHis/{AviTag-TEV-hBRD4N}.

## Амінокислотна послідовність Біотин- AviTag-BD1 BrD4:

10	20	30	40
MHHHHHSSG	LNDIFEAQKI	EWHENLYFQS	MNPPPPETSN
50	60	70	80
PNKPKRQTNQ	LQYLLRVVLK	TLWKHQFAWP	FQQPVDVAVKL
90	100	110	120
NLPDYKIIK	TPMDMGTIKK	RLENNYYWNA	QECIQDFNTM
130	140	150	
FTNCYIYNKP	GDDIVLMAEA	LEKLFLQKIN	ELPTEE

Червоним позначений 6xHIS tag, жирним чорним - AviTag, блакитним – TEV, зеленим – BD1 BrD4

Молекулярна маса BRD4 з AviTag = 18914.35 Да

Кількість амінокислот – 156.

## 2.12. Підбір та оптимізація умов для проведення SPR

Враховуючи вищевказану інформацію та проаналізувавши літературні данні був проведений етап налаштування умов експерименту та їх оптимізація.

Спершу був проведений етап оптимізації іммобілізації, шляхом підбору необхідного чіпа, складу буфера, та створення протоколу ін'єкції розчину білку машиною Biacore T200.

На початку, був обраний чіп на основі стрептавідину (SA chip)[45]. Проте під час наступних тестувань була помічена неспецифічна взаємодія речовин з поверхнею чіпа (гіпотетично з стрептавідином, що є на його поверхні), що проявлялось непропорційним сигналом взаємодії речовин з пропорційною масою білка-мішені, що був іммобілізований на поверхню

чіпа (Додаток А). Тому було вирішено замінити стрептавідинові чіпи на нейтравідинові (NA chip).

Проте на нейтравідиновому чіпу теж спостерігалась неспецифічна взаємодія, що могла бути оцінена візуально з вигляду сенсорграм взаємодії речовини та проявлялась її дисоціацією від референтної лунки (Додаток Б).

Тому для забезпечення блокування активних центрів нейтравідину та уникнення неспецифічної взаємодії після іммобілізації білка було вирішено проводити блокування поверхні біоцитином, шляхом заколу розчину 10 мкг/мл біоцитину протягом 3 хв. Блокування біоцитином проводиться на активній та референтній лунках. Біоцитин взаємодіє з активним центром нейтравідину, цим самим блокуючи його від взаємодії з тестованими речовинами. Важливо примітити, що оскільки протягом тестування біоцитин дисоціює від нейтравідину, то загол біоцитину буде повторно відбуватись протягом експерименту. Даний загол біоцитину відбувається аналогічно до умов заколів тестованих речовин, щоб не переривати експеримент.

Буфером для іммобілізації був обраний HBS-N Buffer, pH 7.4, у складі якого 10 mM HEPES, 150 mM NaCl. Іммобілізація проводилась за протоколом автоматичної іммобілізації до визначеного рівня ( $A_{im} = 3000$  RU) з розчину білка концентрацією 20 мкг/мл.

Після іммобілізації був проведений процес підбирання та перевірки референтної сполуки, що буде використовуватись як контроль під час проведення експерименту. Референтною сполукою був обраний JQ-1, відомий інгібітор BRD4[45]. Перевагами використання цієї сполуки як контрольної є тип взаємодії, з отриманням сенсорграм (Рис 2.9.) з характерними кривими асоціації/дисоціації та можливістю прорахувати кінетичні параметри взаємодії (Табл. 2.1).

Таблиця 2.1. Параметри взаємодії JQ-1 з BRD4 отримані Reaction Biology Corporation[46].

Зразок	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	T ½ (s)	KD (nM)	Rmax (RU)
JQ-1	1.89 E+06	2.91E-02	32.4	15.4	70

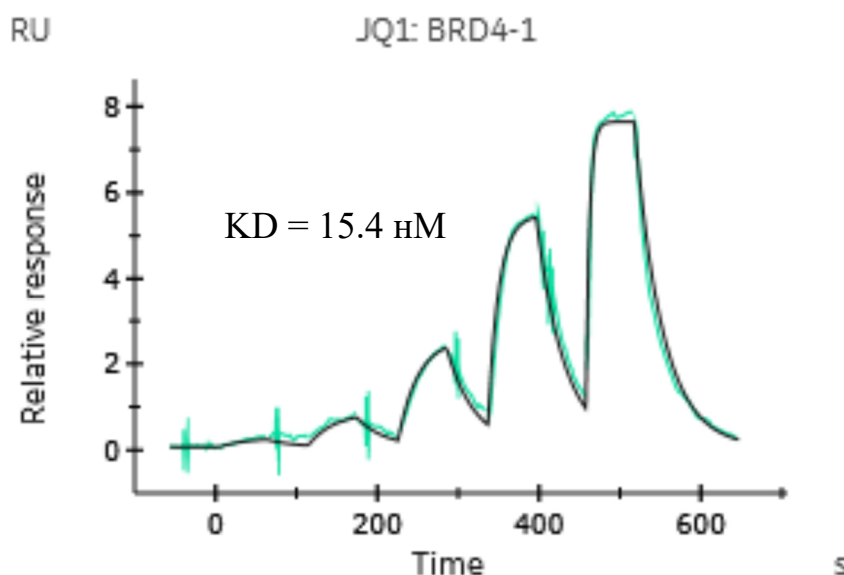


Рис.2.9. Репрезентативна сенсорграма взаємодії JQ-1 з BRD4 отримана Reaction Biology Corporation[46].

Наступний етапом був проведений тест підбору буферу.

У даному проекті було проведено два етапу підбору буферу:

1 етап - оптимізація складу буферу з метою зменшення проявів неспецифічної взаємодії тестованих речовин з чіпом.

2 етап - підбір відсотку ДМСО у буфері, оскільки в літературній даних наявна інформація про взаємодію ДМСО з BRD4, що в свою чергу може викликати конкуренцію за активний центр білка при тестування речовин[47];

Для першого етапу підбору буферу було приготовано 4 буфера різного складу, склад яких систематизований у Таблиці 2.2.

Тестування проходило використовуючи протокол “buffer scouting”, що є одним з наявних протоколів у арсеналі функцій Biacore T200. З його

допомогою можна в межах одного тестування (одна іммобілізація білка та один експеримент) провести експеримент використовуючи одразу 4 буфера. За даного протоколу до проточної системи приладу підключається 2-4 буфери, використання яких чергується автоматично під час проведення вимірювань, що забезпечує максимально достовірні результати даних проведені в межах одного експерименту.

Таблиця 2.2. Склад 4 буферів, використаних на першому етапі оптимізації буферу (жирним шрифтом виділено складову, що відмінна відносно Буферу 1).

Буфер	Склад
1	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО
2	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, <b>0,1% P20</b> , 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО
3	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО, <b>3 mM EDTA</b>
4	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, <b>0,1% P20</b> , 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО, <b>3 mM EDTA</b>

Для проведення даного етапу вибору буфера були протестовані референтна та 4 сполуки, що у тестуваннях з SA чіпом проявили найсильнішу неспецифічну активність. Референтна сполука JQ-1 тестувалась у 6 концентраціях з 3-кратним розведенням (від 900 нМ до 3.7 нМ), сполуки ж тестувались у 8 концентраціях з 2-кратним розведенням (від 200 мкМ до 1.56 мкМ). Усі речовини готувались у 4 різних буферах та переносились на 384-лункову плату. Таким чином був мінімізований ефект масового зсуву (bulk shift), що виникає за умови різниці складу буферу у проточній системі приладу та зразку (buffer mismatch) (Рис 2.10)

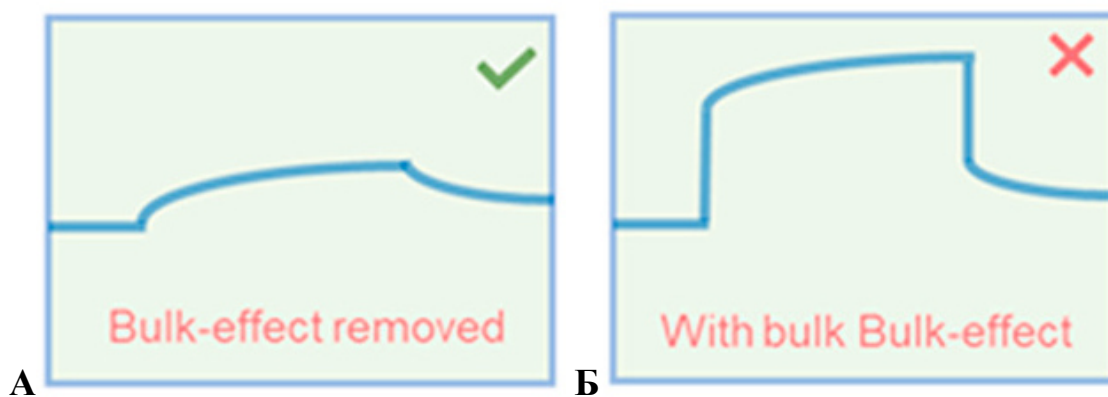


Рис 2.10. Репрезентативні сенсорграми отримані в результаті вимірювання методом SPR: **А.** Якісна сенсорграма без ефекту bulk shift; **Б.** Сенсограма з ефектом bulk shift[48].

В результаті експерименту були проаналізовані кінетичні параметри JQ-1 та порівняні з літературними даними. Значної різниці між реакцією JQ-1 з BRD4 у різних буферах (Додаток В) не спостерігалось. Крім того візуально оцінювалась різниця у взаємодії 4 протестованих сполук з референтною лункою, яка була заблокована біоцитином (Додаток Г, І, Д, Е). На основі отриманих даних був обраний буфер 1, з рекомендованим складом солей та відсотком детергенту P20.

Для другого етапу підбору буферу були приготовані 4 варіації буфера 1 (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% P20, 0.5 мМ TCEP, pH 7.4), обраному на попередньому етапі оптимізації умов експерименту, що містили різний відсоток ДМСО (0.5, 1, 3, 5%). Для тестування використовувався раніше описаний протокол “buffer scouting”.

У межах експерименту були протестовані референтна сполука JQ-1 та сполука Z9226 (Enamine Ltd, Ukraine), де остання використовувалась як референтна у інших методах дослідження[49], проте не була обрана як референтна сполука для методу SPR. В результаті тестування були проаналізовані кінетичні параметри взаємодій JQ-1 та Z9226 (Додаток Є).

На основі результатів експерименту був обраний буфер складу 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% P20, 0.5 мМ TCEP, pH 7.4, 1% ДМСО, за

якого отримані дані взаємодії референтних сполук не зазнали значної зміни у порівнянні з літературними та відсоток розчинника є достатнім для ефективного розведення речовин.

Таким чином були підібрані умови для подальшого тестування.

### 2.13. Створення бібліотеки речовин для вторинного скринінгу.

В результаті попередніх етапів тестувань було створено нову вибірку 3 для тестування методом Поверхневого Плазмового Резонансу. До вибірки увійшли речовини, що були відібрані під час першого етапу тестування, та в межах інших досліджень BRD4, а саме:

- 13 сполук було відібрано в результаті тестування методом TSA, що описано у першій частині дипломної роботи;
- 61 сполука була додана використовуючи результати раніше отриманих даних методом TR-FRET у Vienta Ltd.[50];
- 2 та 7 сполуки були додані за результатами тестувань методом TSA, проведених у межах інших проектів дослідження BRD4 у Vienta Ltd.[1].

Наступним етапом відібрані 83 сполуки були перевірені групою контролю якості речовин на предмет чистоти. В результаті перевірки 5 речовин не пройшли QC (чистота складала менше 90%), тому були виключені з тестування. Таким чином була сформована вибірка 3, що складалась з 78 сполук (Рис 2.11).

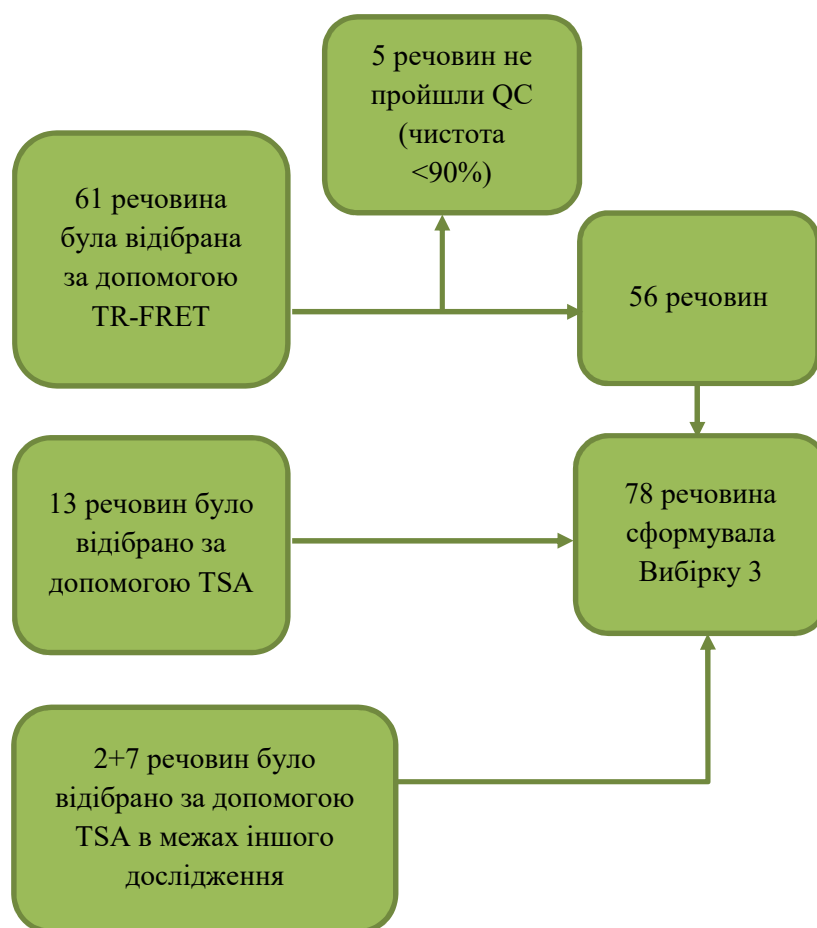


Рис 2.11. Схема створення вибірки 3 на основі результатів раніше проведених досліджень для тестування методом SPR

#### 2.14. Перший етап тестування відібраних речовин методом SPR

Першим етапом дослідження Поверхневим Плазмонним Резонансом було тестування речовин в одній концентрації (single-point test). Для цього кожна з речовин тестувалась у одній концентрації (50 мкМ). Як контроль використовувалась референсна сполука JQ-1, що тестувалась у 5 концентраційних розведеннях (7.4, 22.2, 66.67, 200, 600 нМ) на початку та на кінці експерименту для підтвердження активності та стабільності білку на поверхні чіпа. Додатково до цього референтна сполука тестувалась періодично протягом експерименту (кожні 6 годин) у одній концентрації (600 нМ) для корекції даних при обрахунку результатів відносно активності

білку на моменти детекції та забезпечення контролю реакції референтної сполуки з BRD4, відносно якої буде відбуватись відбір потенційних хітів. Як негативний контроль використовувався бланковий зразок.

Речовини тестувались послідовно, по 4 речовини з проміжними заколами 2 бланків. Склад буферу відповідав обраному на етапі валідації (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% P20, 0.5 мМ TCEP, pH 7.4, 1% ДМСО).

Зразки речовин та референтної сполуки тестувались у 384-лунковій платі з глибокими лунками, що була заклеєна фольгою.

Імобілізація та блокування поверхні чіпа біоцитином проводилась відповідно до підбраного протоколу на етапі валідації експерименту.

Таким чином був створений протокол проведення експериментів, що включає параметри заколу та тестування зразків, інформація про зразки, їх кількість та порядок тестування.

## 2.15. Другий етап тестування речовин методом SPR.

Другим етапом тестуванням методом Поверхневого Плазмонного Резонансу було проведення тесту у концентраційних розведеннях, з метою визначення кінетичних параметрів взаємодії 39 речовин, відібраних за результатами тестування у одній концентрації. Для цього були використанні попередні умови імобілізації та тестування референтної та тестованих сполук.

Важливо примітити, що референсна сполука JQ-1 тестувалась лише 2 рази у 5 концентраційних розведеннях (7.4, 22.2, 66.67, 200, 600 нМ): на початку та кінці експерименту. Речовини тестувались у 2-кратних концентраційних розведеннях (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 мкМ) послідовно від найнижчої до найвищої, з наступними тестованими зразками бланка та повтору концентрації 25 мкМ, для підтвердження відтворюваності результатів. Таким чином був сформований протокол експерименту, що

включає параметри заколу та тестування зразків, інформація про зразки, їх кількість та порядок тестування.

## 2.16. Аналіз результатів у методі Поверхневий Плазмонний Резонанс.

В результаті тестування детектований сигнал візуалізується у вигляді кривої (сенсорграми), які надалі аналізуються в Biacore Insight Evaluation Software.

Один з обов'язкових етапів опрацювання даних є процедура корекції розчинником (solvent correction), який компенсує різницю в об'ємі референсної та активної лунки, обумовленою об'ємом іммобілізованого білка (Рис 2.12) (Додаток Ж).

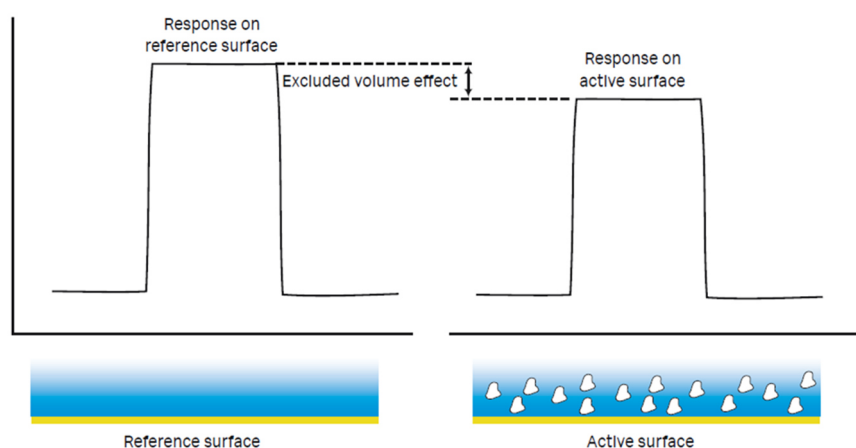


Рис. 2.12. Ілюстрація потреби в корекції розчинника, що виникає в результаті утворення об'ємної різниці в отриманому сигналі для активної та референсної лунки, обумовленою іммобілізацією білка[51].

Даний етап проводиться за допомогою побудови калібрувальної кривої буферу (з різним відсотком ДМСО) без тестованих речовин на різних лунках. Калібровка містить 4-8 зразків з відсотком ДМСО в межах від меншого на 0.5% в порівнянні з running buffer до більшого на 0.8%.

Важливим етапом аналізу результатів є перевірка достовірності експериментів, що проводиться за аналізом кінетичних параметрів референтної сполуки (в даному дослідженні це JQ-1) та порівняння отриманих значень з літературними та раніше отриманими. На основі контролю якості експерименту можна стверджувати про достовірність результатів чи про потребу проведення повторного експерименту.

Для речовин, тестованих у одній концентрації, проводиться аналіз та обрахунок результатів з метою відбору речовин для наступного етапу дослідження. Для зручності порівняння даних сигнал отриманий від кожної протестованої сполуки був нормалізований за її молекулярною масою, що надає відносну оцінку кількості молекул, які провзаємодіяли з білком-мішенню. Фінальним етапом для порівняльної характеристики була нормалізація за сигналом отриманого від референтної сполуки. Таким чином були отримані дані як % від сигналу JQ-1. До наступного етапу тестування відібраються речовини, що продемонстрували сигнал взаємодії з BRD4 вищий за 30% сигналу взаємодії референтної сполуки з білком (концентрація JQ-1 була 600 нМ, що є приблизно 10 KD і вважається концентрацією, за якої приблизно 90% активних центрів BRD4 зайнята молекулами референтної речовини).

Для речовин, тестованих в концентраційних розведеннях, виконується аналіз кривих та обрахунок параметрів взаємодії з мішенню. Для цього отримані дані від різних концентрацій однієї сполуки групуються в один графік та аналізуються, щоб спостерігати доза-залежні закономірності.

В SPR є два підходи до аналізу даних: аналіз кінетики та афінності (steady state analysis). Перший підхід, аналіз кінетики, використовується тоді, коли отримані сенсорграми мають характерні криві (демонструють кривизну) асоціації та дисоціації. (Рис 2.13)[52].

За допомогою аналізу кінетики можна обрахувати параметри взаємодії речовини та білка-мішені систематизовані у таблиці 2.3.

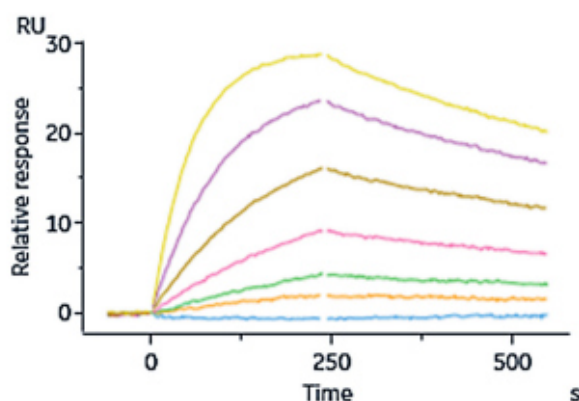


Рис 2.13. Репрезентативна сенсорграма взаємодії тестованої речовини з мішенню, що може бути використана для аналізу кінетики[53].

Таблиця 2.3. Параметри взаємодії речовин з білком-мішенню, які можна отримати з аналізу кінетики[52][54].

Параметр	Пояснення	Одиниця вимірювань
$k_a$ (або $k_{on}$ )	Константа швидкості асоціації. Визначає швидкість утворення комплексу.	$M^{-1}s^{-1}$
$k_d$ (або $k_{off}$ )	Константа швидкості дисоціації. Визначає швидкість, з якою комплекс дисоціює.	$s^{-1}$
$KD$	Рівноважна константа дисоціації. Описує силу взаємодії.	$M$
$R_{max}$	Максимальна здатність біосенсора (іммобілізованого білку) до зв'язування аналіту.	RU
$T_{1/2}$	Період напіврозпаду комплексу	$s^{-1}$

Другий ж підхід, аналіз афінності, використовують коли сенсорграми досягають стаціонарного стану під час асоціації, але асоціація та дисоціація надто швидкі, щоб показати достатню кривизну для кінетичної оцінки (Рис 2.14)[52].

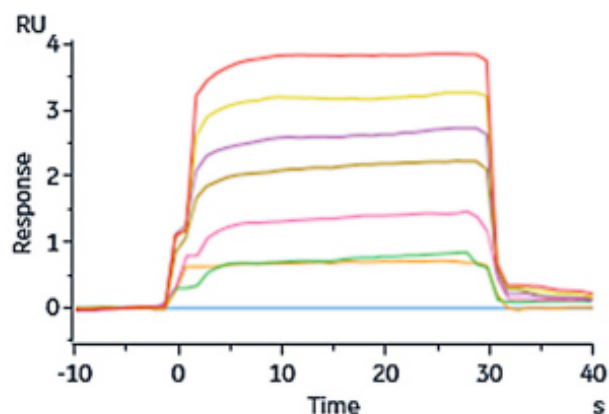


Рис 2.14. Репрезентативна сенсорграма взаємодії тестованої речовини з мішенню, що може бути використана для аналізу афінності[53].

З його допомогою можна отримати не таку широку характеристику[52] кінетичних параметрів як за аналізу кінетики, значення  $KD$  та  $R_{max}$ , проте достатніх для аналізу взаємодії сполуки та проведення подальших досліджень.

Обидва підходи можна використовувати окремо або комбінуючи, за умови наявності необхідних параметрів сенсорграм (Рис 2.15).

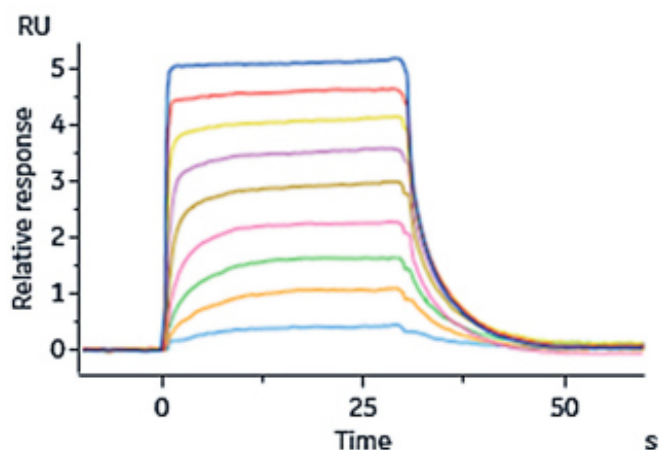


Рис 2.15. Репрезентативна сенсорграма взаємодії тестованої речовини з мішенню, що може бути використана для аналізу як кінетики так і афінності[53]. Сенсорограми досягають стійкого стану під час асоціації та показують достатню кривизну для кінетичної оцінки.

В даному дослідженні характер сенсорграм референтної сполуки підходить для кінетичного аналізу, на противагу сенсорграм речовин, для яких потрібно застосовувати аналіз афінності.

Крім того для оцінки активності взаємодії білком з сполуками порівнюються значення  $R_{max}$  та  $R_{max_{теор}}$  (вимірюється у RU), які в свою чергу пов'язуються параметром зайнятості білка (вимірюється у відсотках).  $R_{max_{теор}}$  – це величина, що характеризує максимальну теоретичну здатність іммобілізованого білка-мішені до зв'язування аналіту. Визначається за допомогою формули 2.3.

$$R_{max_{теор}} = \frac{Mr(\text{речовини}) * R_{\text{іммобілізації}}}{Mr(\text{іммобілізованого білку})} \quad (2.3)$$

де,

$Mr(\text{речовини})$  – молекулярна маса тестованої речовини [М]

$Mr(\text{іммобілізованого білку})$  - молекулярна маса іммобілізованого білку [М]

$R_{\text{іммобілізації}}$  – рівень іммобілізації білка-мішені [RU]

Таким чином порівнюючи  $R_{max}$  та  $R_{max_{теор}}$  можна визначити відсоток зайнятості іммобілізованого білка речовиною, тобто наскільки ефективно відбулась взаємодія речовини з білком (Формула 2.4).

$$\% \text{ Зайнятості} = \frac{R_{max}}{R_{max_{теор}}} \times 100\% \quad (2.4)$$

Важливим є те, що якщо відсоток зайнятості білка більший 100%, тобто з білком зв'язалось більше речовини ніж є теоретично можливим, це може свідчити про неспецифічну активність сполуки.

Якщо порівнювати відсоток зайнятості для референтної сполуки можна стверджувати про активність білку на поверхні чіпа, а саме яка відсоткова частина білку є активною. Враховуючи довгу тривалість експериментів

проведених методом SPR (20-40 годин), це є важливою характеристикою для оцінки активності білку на момент детектування взаємодії.

## РОЗДІЛ III. Результати та обговорення

## 3.1. Результати тестування таргетної вибірки 1 під час первинного скринінгу методом TSA

Вибірка 1 була протестована методом TSA проти білка-мішені BRD4, та неродинних білків Abl SH2 та SIRT1 для перевірки специфічності. Проведені експерименти можуть вважатись достовірними оскільки проходять за параметрами контролю якості (Додаток. 3).

У вибірці 1 було протестовано 320 сполук та виявлено 9 сполук, що показали свою активність, проти мішені нашого дослідження BRD4 (Рис 3.1).

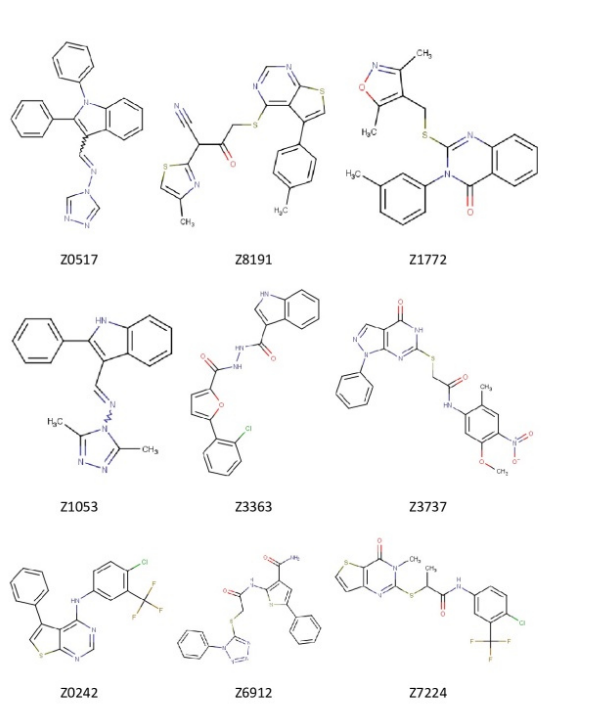


Рис.3.1. Структурні формули та ID речовин вибірки 1, що продемонстрували активність відносно BRD4.

Отримані результати були систематизовані у вигляді стовпчикової діаграми, що продемонстрована на рисунку 3.2. Серед речовин, що мали статистично достовірний ефект на мішені вивчення, виявилися як стабілізатори, так і дестабілізатори.

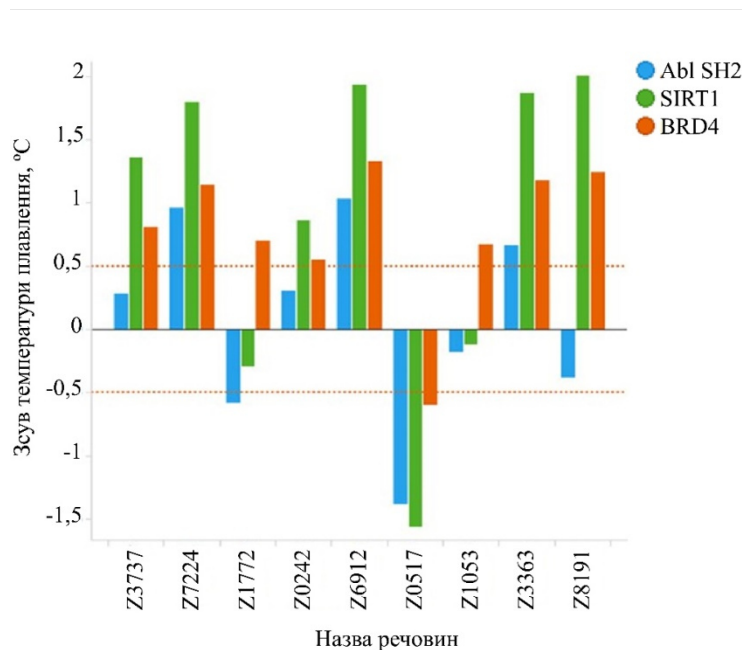


Рис.3.2. Стовпчикова діаграма даних зсуву температури плавлення для 9 протестованих речовин проти білка-мішені - BRD4 та неродинних білків Abl SH2, SIRT1 методом TSA

Речовини даного сету не демонструють абсолютну селективність до BRD4. Деякі з них зв'язуються з SIRT1 (Z3737, Z7224, Z0242, Z8191, Z0517, Z3363, Z8191) або Abl SH2 (Z7224, Z1772, Z6912, Z0517, Z3363) (Рис 3.2). При чому Z0517 має негативний  $dTmD$ , що може говорити про його дестабілізуючий вплив на всі білки. З літературних даних відомо, що такі сполуки найчастіше схильні до агрегації, або володіють фізико-хімічними властивостями поверхнево активних речовин[55]. Тільки сполука Z1053 показала специфічність виключно до BRD4, але значення її температурного зсуву на межі хіт критерію, тому можна стверджувати, що речовина має слабку активність проти BRD4.

З отриманих даних можна стверджувати, що молекулярний докінг пройшов не дуже якісно, низький відсоток селективних до BRD4 речовин (Hit rate =0,3%), що характерно для диверсифікованих вибірок.

Для оптимізації процесу створення вибірки 2 було взято за основу 9 речовин, що продемонстрували активність відносно BRD4.

### 3.2. Результати тестування вибірки 2 під час первинного скринінгу методом TSA

Вибірка 2, що складалась з 190 речовин була протестована на BRD4, Abl SH2 та SIRT1 аналогічно до тестування вибірки 1. Результати експерименту відповідають параметрам контролю якості (Додаток І) та можуть вважатись достовірними.

У другій вибірці було виявлено 26 сполук, що показали активність проти BRD4. З цих 26 активних речовин 13 проявили свою активність до SIRT1 чи Abl SH2 (Рис.3.3).

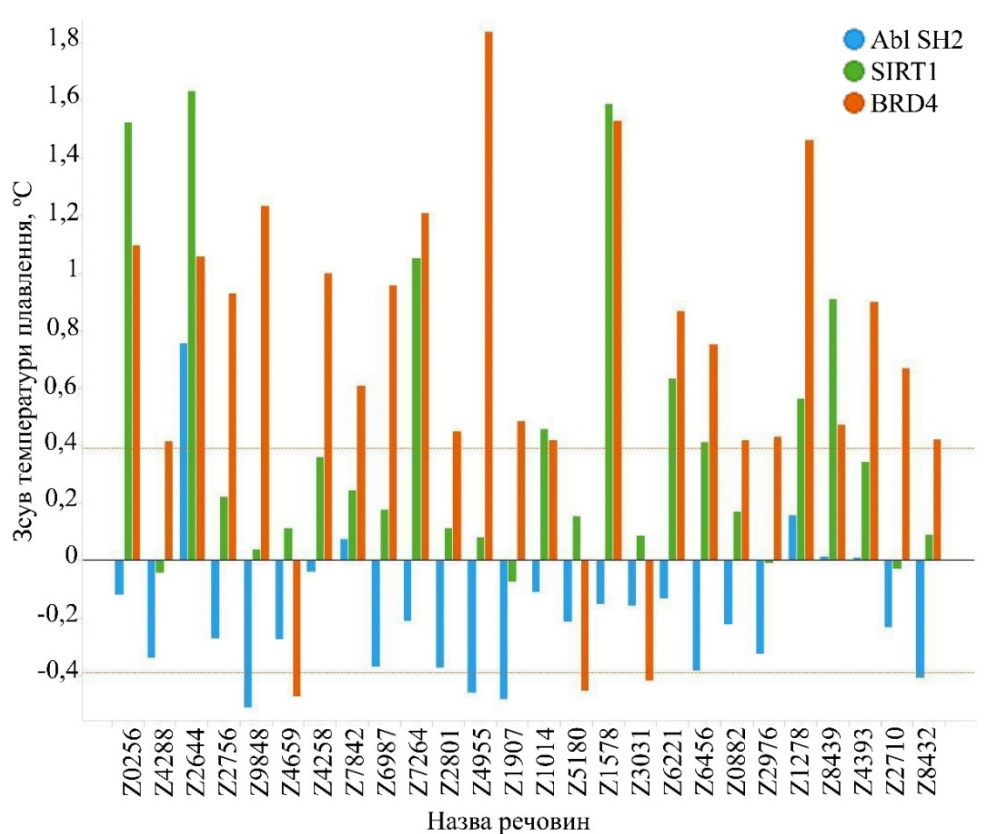


Рис.3.3. Результати високопродуктивного скринінгу 26 сполук методом TSA на білку-мішені BRD4 та неродинних білках Abl SH2 і SIRT1. Дані представлені як зсув температури плавлення. Критерій відбору речовин представлений чорною лінією та відповідає  $|\Delta TmD \text{ речовина}| \geq 0.39^\circ \text{C}$ .

Таким чином зробили висновок, що інші 13 речовин (Рис.3.4) є специфічно активними у відношенні до BRD4: Z4258, Z6987, Z2756, Z4393, Z2710, Z7842, Z4659, Z5180, Z2801, Z2976, Z0882, Z3031, Z4288.

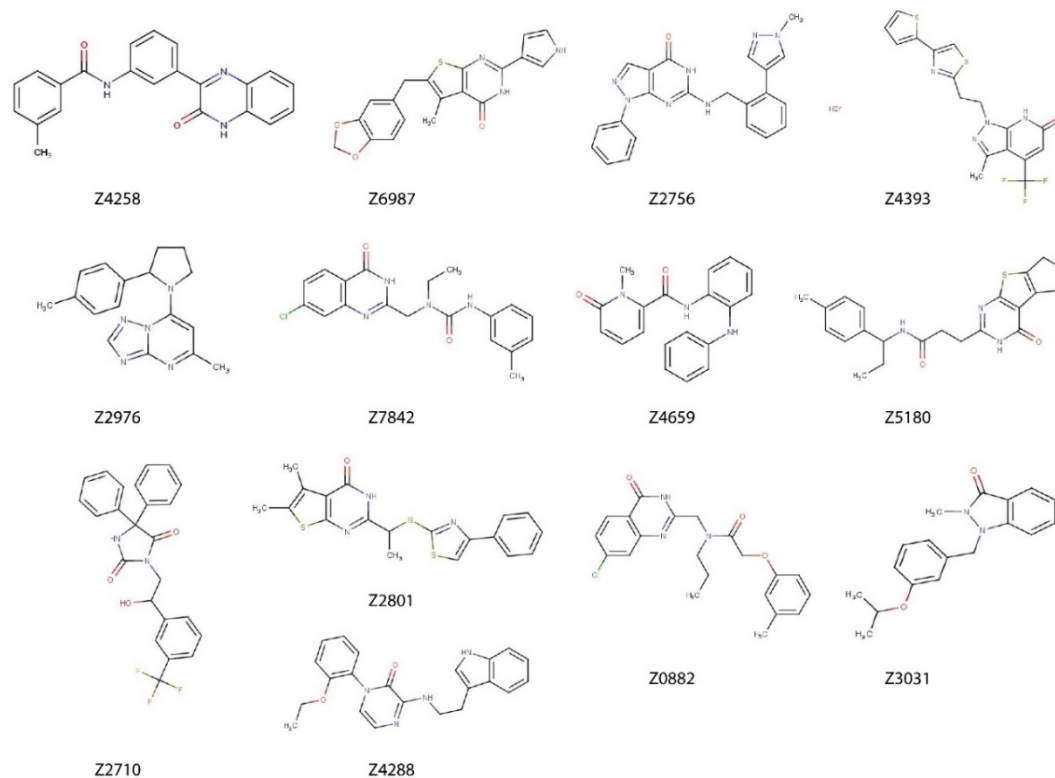


Рис.3.4. Структурні формули 13 потенційно активних речовин, селективно специфічних до BRD4.

Отже, в результаті тестування було виявлено 13 потенційно активних сполук, що задовольняють вимоги специфічності до BRD4 та потребують додаткових перевірок на активність іншими методами й в системі *in vivo*.

З 2 вибірки 6,8 % речовин продемонстрували специфічну активність відносно білка-мішені, що свідчить про якість алгоритму створення таргетних бібліотек [56]. Можемо зробити висновок, що метод віртуального скринінгу використаний хіміками для створення вибірки 2 є ефективнішим у порівнянні з методом, використаний при пошуку сполук для вибірки 1.

Надалі тестування активності відібраних 13 сполук відбуватиметься методом Поверхневий Плазмонний Резонанс (SPR).

### 3.3. Результати першого етапу тестування речовин методом Поверхневого Плазмонного Резонансу.

Вибірка 3, що складається з 78 сполук, була протестована в одній концентрації методом Поверхневого Плазмонного Резонансу. Результати експерименту можуть вважатись достовірними на основі відповідності кінетичних параметрів взаємодії JQ-1 з BRD4 в порівнянні з літературними (Додаток І) та візуальній оцінці отриманих сенсорграм (Додаток ІІ)

Результати були проаналізовано та візуалізовані у вигляді точкового графіка (Рис 3.5) за допомогою програмного забезпечення Biacore Insight Evaluation Software.

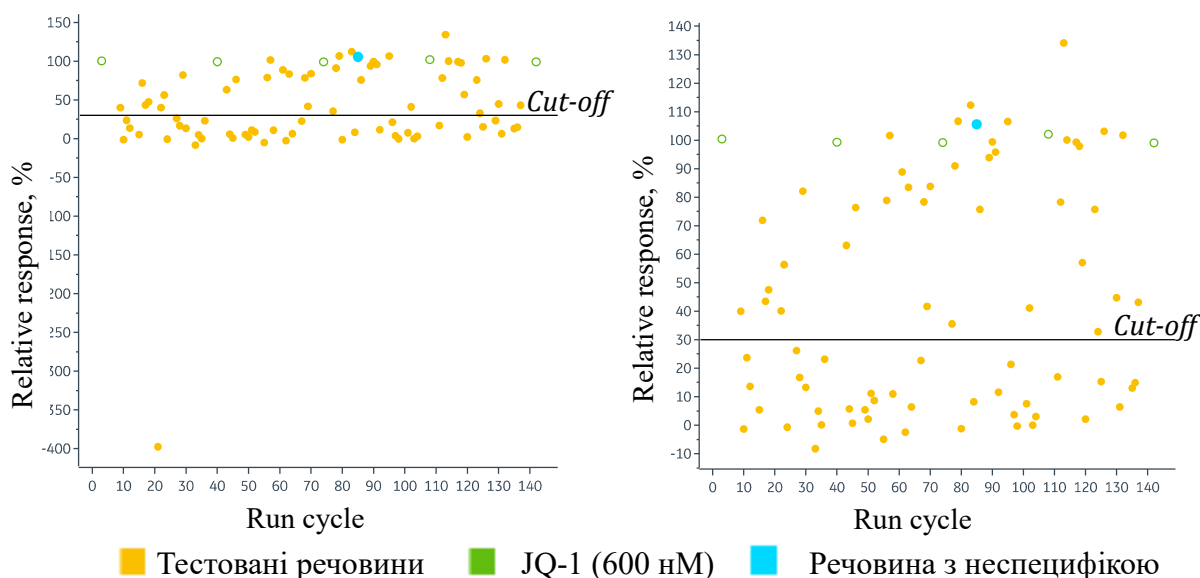


Рис 3.5. Скринінг потенційно активних речовин на білку-мішені BRD4 методом SPR. **А.** Точковий графік протестованих 78 сполук у концентрації 50 мкМ. **Б.** Точковий графік “А” у збільшеному масштабі на діапазоні [-10%; 40%]. Дані представлені як % від сигналу референсної сполуки JQ-1 протестованої у концентрації 600 нМ (концентрація, що еквівалентна 10 КД). Критерій відбору речовин представлений чорною лінією (*cut-off*) та відповідає 30 % сигналу JQ-1.

З графіку видно, що 39 сполук пройшли критерій відбору та продемонструвало зв'язуючу активність з BRD4, тому можуть бути використані у наступній фазі дослідження методом SPR.

Крім того отримані сенсорами були візуально оцінені на предмет неспецифічної взаємодії з референтною лункою (наявність асоціації та/чи дисоціації). 1 сполука (Z2480) з 39, що пройшли критерій відбору, продемонструвала неспецифічну активність (Рис 4.5, позначена блакитним), проте не була виключена з переліку сполук для подальшого тестування, для підтвердження та більш детального вивчення неспецифічної реакції.

В результаті експерименту було відібрано 39 сполук для подальшого дослідження – тестування концентраційних розведень.

#### 3.4. Результати другого етапу тестування речовин методом Поверхневого Плазмонного Резонансу.

В результаті другого етапу тестування було протестовано 39 сполук в 8 різних концентраціях. Отримані результати взаємодії референтної сполуки з BRD4, підтверджують якість проведених тестів та достовірність результатів (Додаток Й).

За даними експерименту протестовані речовини були посортовані у 6 груп за характеристикою взаємодії з BRD4, що визначалася з аналізу отриманих сенсорграм. Класифікація 39 сполук протестованих речовин систематизована у таблиці 3.1.

Даний етап був проведений з метою відбирання речовин, що не демонструють неспецифічну активність та для оптимізації процесу відбору сполук у наступний етап дослідження.

Таблиця 3.1 Класифікація 39 протестованих сполук за характеристикою взаємодії з білком-мішенню та поверхнею чіпа. Зеленим помічені речовини, які відібрані у наступні етапи тестувань, червоним – не будуть відібрані, жовтим – можуть бути включені чи виключені після додаткових тестувань.

Назва групи	Опис характеристик	Кількість	Сенсорграми
Потенційні хіти	Сенсорграми демонструють взаємодію без артефактів та неспецифіки, якісно визначені параметри взаємодії	19	Рис 3.6
Потенційні хіти, які перетестувати	Якісні данні. Обраховані КD є нижчим ніж тестовані концентрації. <i>Рекомендовано понизити діапазон концентраційних розведень</i>	5	Додаток К
Речовини з нехарактерною взаємодією	Аналіз афінності проходить не якісно. За високих концентрацій проявляється нехарактерний сигнал. <i>Рекомендовано повторне тестування</i>	5	Додаток Л
Речовини з лінійною концентраційною залежністю	При обрахунку результатів спостерігається лінійна залежність, що є ознакою неспецифічної взаємодії	6	Додаток М
Речовини, що налипають	Спостерігається зміна в рівні базової лінії до тестування сполуки та після, що свідчить про налипання речовин	2	Додаток Н
Речовини, що взаємодіють з поверхнею чіпа	Спостерігається асоціація та/чи дисоціація від референтної лунки, що є ознакою неспецифічної активності	2	Додаток О

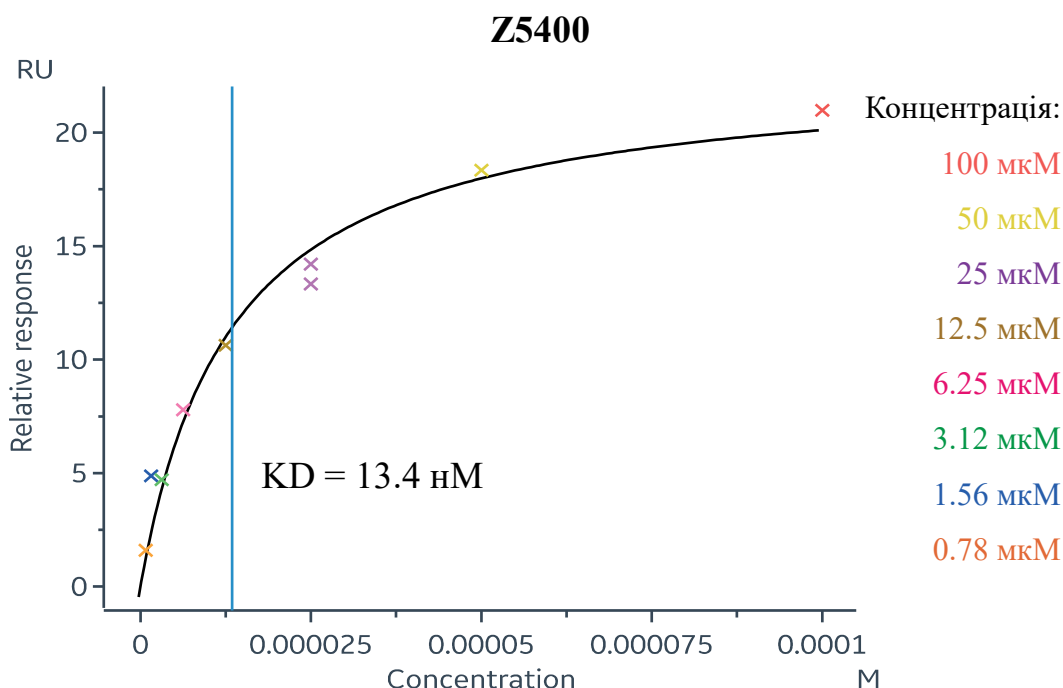


Рис 3.6. Репрезентативний графік аналізу афінності речовин, що були класифіковані як потенційні хіти. Отриманні данні не містить помітних артефактів та проявів неспецифіки, якісний фітинг та якісно визначені параметри. Можна зробити висновок про достовірність отриманих кінетичних параметрів взаємодій та допуску речовин даної категорії до наступних етапів тестувань.

Для речовин, для яких є можливим визначення кінетичних параметрів (позначені зеленим у Таблиці 3.1) був проведений обрахунок (Рис 3.6.) результати якого систематизовані у Таблиці 4.2.

Таким чином були отримані кінетичні параметри для 24 сполук, з яких видно, що вони є перспективними для створення системи PROTAC і будуть відібрані у наступні етапи дослідження (після чи паралельно проведення повторного тестування для необхідних речовин).

Таблиця 3.2. Кінетичні параметри для 24 протестованих речовин обраховані методом аналізу афінності (сірим кольором помічені сполуки, які рекомендовано перетестувати у нижчих концентраціях). Речовини представлені у порядку спадання значення KD.

Сполука	Rmax_теор	Rmax, RU	Зайнятість,%	KD (мкМ)
Z2456	88.55	36.41	41.12	23.40
Z5514	57.71	23.84	41.32	23.15
Z8899	45.81	33.46	73.04	19.58
Z5208	57.21	41.14	71.90	18.31
Z7954	54.69	19.81	36.21	17.67
Z7728	61.74	40.72	65.95	17.41
Z5716	61.91	38.73	62.56	16.83
Z1999	57.54	42.29	73.50	15.35
Z3032	53.77	32.09	59.69	14.84
Z6230	62.14	36.80	59.22	14.63
Z5400	50.42	22.81	45.24	13.42
Z4429	45.46	25.37	55.81	8.15
Z4572	67.87	47.29	69.67	7.76
Z3845	57.55	48.12	83.61	5.39
Z6506	53.10	43.62	82.14	4.48
Z6074	62.89	35.73	56.82	4.26
Z9226	43.12	21.22	49.20	3.45
Z5698	57.20	36.36	63.57	3.27
Z0144	62.17	36.64	58.94	2.59
Z2304	61.47	43.52	70.80	1.75
Z0254	57.20	35.02	61.23	1.20
Z2733	56.88	33.79	59.41	1.12
Z2359	63.95	32.80	51.28	0.88
Z1820	57.60	39.23	68.10	0.44

Крім того неспецифічна реакція спостерігалась лише для 2 з 39 сполук (5%), що може свідчити про якість оптимізації умов для тестування методом SPR у порівнянні з попередньо використаними умовами тестування (неспецифічна взаємодія спостерігалась для 25 з 38 сполук, 65%).

### 3.5. Обговорення подальших етапів створення та дослідження системи PROTAC на BRD4.

В результаті отриманих даних, що висвітлені у дипломній роботі, для подальшого дослідження може бути відібрано 24 сполуки, що продемонстрували специфічну та стабільну взаємодію з BRD4 та є перспективними для створення системи PROTAC. Після проведення додаткових тестувань речовин, для яких це є рекомендованим, кількість відібраних сполук може зрости.

Важливим наступним етапом для створення цілісного механізму PROTAC є підбір лінкеру, що поєднуватиме дві функціональні одиниці механізму дії системи. Даний етап буде проведений групою хемоінформатиків та хіміків Enamine Ltd.

Надалі ж, після створення потенційно активних систем PROTAC відбуватиметься їх тестування на здатність убіквітинувати та деградації білку-мішені. Для цього проводитиметься тест на зв'язування Цереблону.

Після цього проводитиметься дослідження ефективності PROTAC у клітинних системах та перевірка на цитотоксичність.

Внаслідок багатоетапного процесу досліджень планується розробка повноцінної молекули PROTAC, що буде ефективною для використання у боротьбі з раком різних типів опосередкованим BRD4.

## ВИСНОВКИ

Дана робота була присвячена пошуку та тестуванню речовин, що демонструють специфічну та стабільну взаємодію з BRD4, з перспективою створення механізму деградації білку-мішені, системи PROTAC, що є відносно новим напрямком у терапії раку.

В результаті дослідження:

1. Успішно оптимізовано алгоритм пошуку речовин за допомогою віртуального скринінгу. Метод, за яким формувалася вибірка 1, не відібрав структур з високою селективністю до BRD4, але результати тестування методом TSA стали основою для покращення механізму створення другої вибірки. Відсоток потенціальних хітів отриманий для вибірки 2 методом TSA зріс від 0.3 % до 6,8 %.

2. Успішно підібрані та оптимізовані умови тестування таргетних бібліотек на білку-мішені BRD4 методами TSA та SPR. Доведено ефективність використання біоцитину у методі SPR у випадках взаємодії речовин з поверхнею чіпа. Про це свідчить значне зменшення проявлення неспецифічної реакції речовин до поверхні використаного чіпа (відсоток сполук з цим ефектом знизився з 65 % до 5 %).

3. За результатами первинного скринінгу методом TSA відібрано 13 сполук для вторинного скринінгу.

4. Відібрано та обраховано константи дисоціації для 24 сполук, що є перспективними для створення системи PROTAC на основі результатів вторинного скринінгу методом SPR.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] O. V. Savych *et al.*, “The iterative application of a large chemical space in the drug discovery process,” *J. Org. Pharm. Chem.*, vol. 19, no. 4(76), pp. 3–11, 2021, doi: 10.24959/ophcj.21.244362.
- [2] B. N. Devaiah, A. Gegonne, and D. S. Singer, “Bromodomain 4: a cellular Swiss army knife,” *J Leukoc Biol*, vol. 100, 2016, doi: 10.1189/jlb.2RI0616-250R.
- [3] W. Liu *et al.*, “BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos,” *Cell Death Differ*, vol. 21, 2014, doi: 10.1038/cdd.2014.124.
- [4] T. Wu, H. B. Pinto, Y. F. Kamikawa, and M. E. Donohoe, “The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression,” *Stem Cell Reports*, vol. 4, 2015, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.012.
- [5] J. Shi and C. R. Vakoc, “The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition,” *Mol Cell*, vol. 54, 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.016.
- [6] B. Donati, E. Lorenzini, and A. Ciarrocchi, “BRD4 and Cancer: Going beyond transcriptional regulation,” *Molecular Cancer*, vol. 17, no. 1. 2018, doi: 10.1186/s12943-018-0915-9.
- [7] Y. W. Jiang *et al.*, “Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.15.8538.
- [8] Z. Zou *et al.*, “Brd4 maintains constitutively active NF-kappaB in cancer cells by binding to acetylated RelA,” *Oncogene*, vol. 33, 2014, doi: 10.1038/onc.2013.179.
- [9] S. Y. Wu, A. Y. Lee, H. T. Lai, H. Zhang, and C. M. Chiang, “Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-

- specific targeting,” *Mol Cell*, vol. 49, 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.006.
- [10] W. Liu *et al.*, “Brd4 and JMJD6-associated anti-pause enhancers in regulation of transcriptional pause release,” *Cell*, vol. 155, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.056.
- [11] S. Rahman *et al.*, “The Brd4 Extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3,” *Mol Cell Biol*, vol. 31, 2011, doi: 10.1128/MCB.01341-10.
- [12] W. B. Li *et al.*, “Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation,” *Nature*, vol. 498, 2013, doi: 10.1038/nature12210.
- [13] T. Kanno *et al.*, “BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 21, 2014, doi: 10.1038/nsmb.2912.
- [14] M. K. Jang, K. Mochizuki, M. S. Zhou, H. S. Jeong, J. N. Brady, and K. Ozato, “The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription,” *Mol Cell*, vol. 19, 2005, doi: 10.1016/j.molcel.2005.06.027.
- [15] E. Donato *et al.*, “Compensatory RNA polymerase 2 loading determines the efficacy and transcriptional selectivity of JQ1 in Myc-driven tumors,” *Leukemia*, vol. 31, 2017, doi: 10.1038/leu.2016.182.
- [16] E. H. Blackburn, “Structure and function of telomeres,” *Nature*, vol. 350, 1991, doi: 10.1038/350569a0.
- [17] S. Eyre and J. Worthington, “Take your PICS: Moving from GWAS to Immune Function,” *Immunity*, vol. 41, no. 6, pp. 883–885, Dec. 2014, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2014.12.014.
- [18] D. Hnisz *et al.*, “Super-enhancers in the control of cell identity and disease,” *Cell*, vol. 155, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.09.053.
- [19] “Sabari BR, Dall’Agnese A, Boija A, Klein IA, Coffey EL, Shrinivas K, Abraham BJ, Hannett NM, Zamudio AV, Manteiga JC, et al. Coactivator

- condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science*. 2018;361.” .
- [20] R. S. Mani and A. M. Chinnaiyan, “Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences,” *Nat Rev Genet*, vol. 11, 2010, doi: 10.1038/nrg2883.
- [21] T. Misteli and E. Soutoglou, “The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 10, 2009, doi: 10.1038/nrm2651.
- [22] A. Stanlie, A. S. Yousif, H. Akiyama, T. Honjo, and N. A. Begum, “Chromatin reader Brd4 functions in Ig class switching as a repair complex adaptor of nonhomologous end-joining,” *Mol Cell*, vol. 55, 2014, doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.018.
- [23] J. W. Zhang *et al.*, “BRD4 facilitates replication stress-induced DNA damage response,” *Oncogene*, vol. 37, 2018, doi: 10.1038/s41388-018-0194-3.
- [24] M. K. Zeman and K. A. Cimprich, “Causes and consequences of replication stress,” *Nat Cell Biol*, vol. 16, 2014, doi: 10.1038/ncb2897.
- [25] C. Gelot, I. Magdalou, and B. S. Lopez, “Replication stress in mammalian cells and its consequences for mitosis,” *Genes (Basel)*, vol. 6, 2015, doi: 10.3390/genes6020267.
- [26] S. R. Floyd *et al.*, “The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling,” *Nature*, vol. 498, 2013, doi: 10.1038/nature12147.
- [27] G. Gandolfi, M. Ragazzi, A. Frasoldati, S. Piana, A. Ciarrocchi, and V. Sancisi, “TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma,” *Eur J Endocrinol*, vol. 172, 2015, doi: 10.1530/EJE-14-0837.
- [28] G. Gandolfi *et al.*, “Genome-wide profiling identifies the THYT1 signature as a distinctive feature of widely metastatic papillary thyroid carcinomas,” *Oncotarget*, vol. 9, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.22805.
- [29] S. Horn *et al.*, “TERT promoter mutations in familial and sporadic

- melanoma,” *Science (80-. )*, vol. 339, 2013, doi: 10.1126/science.1230062.
- [30] S. C. Akincilar, E. Khattar, P. L. Boon, B. Unal, M. J. Fullwood, and V. Tergaonkar, “Long-range chromatin interactions drive mutant TERT promoter activation,” *Cancer Discov.*, vol. 6, 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0177.
- [31] L. Y. Hao, M. A. Strong, and C. W. Greider, “Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts,” *J Biol Chem*, vol. 279, 2004, doi: 10.1074/jbc.M403924200.
- [32] J. N. Bandaria, P. W. Qin, V. Berk, S. Chu, and A. Yildiz, “Shelterin protects chromosome ends by compacting Telomeric chromatin,” *Cell*, vol. 164, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.01.036.
- [33] M. a. r. t. i. n. a. Gatzka, “Targeted Tumor Therapy Remixed—An Update on the Use of Small-Molecule Drugs in Combination Therapies,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, 2018, doi: 10.3390/cancers10060155.
- [34] I. Mender *et al.*, “Imetelstat (a telomerase antagonist) exerts off-target effects on the cytoskeleton,” *Int J Oncol*, vol. 42, 2013, doi: 10.3892/ijo.2013.1865.
- [35] A. A. Alekseyenko *et al.*, “The oncogenic BRD4-NUT chromatin regulator drives aberrant transcription within large topological domains,” *Genes Dev.*, vol. 29, no. 14, 2015, doi: 10.1101/gad.267583.115.
- [36] Z. Zhou *et al.*, “A Bromodomain-Containing Protein 4 (BRD4) Inhibitor Suppresses Angiogenesis by Regulating AP-1 Expression,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.01043.
- [37] T. C. R. Miller *et al.*, “A bromodomain-DNA interaction facilitates acetylation-dependent bivalent nucleosome recognition by the BET protein BRDT,” *Nat. Commun.*, vol. 7, 2016, doi: 10.1038/ncomms13855.
- [38] D. S. Tyler *et al.*, “Click chemistry enables preclinical evaluation of targeted epigenetic therapies,” *Science (80-. )*, vol. 356, no. 6345, 2017, doi: 10.1126/science.aal2066.
- [39] O. Gilan *et al.*, “Selective targeting of BD1 and BD2 of the BET proteins in

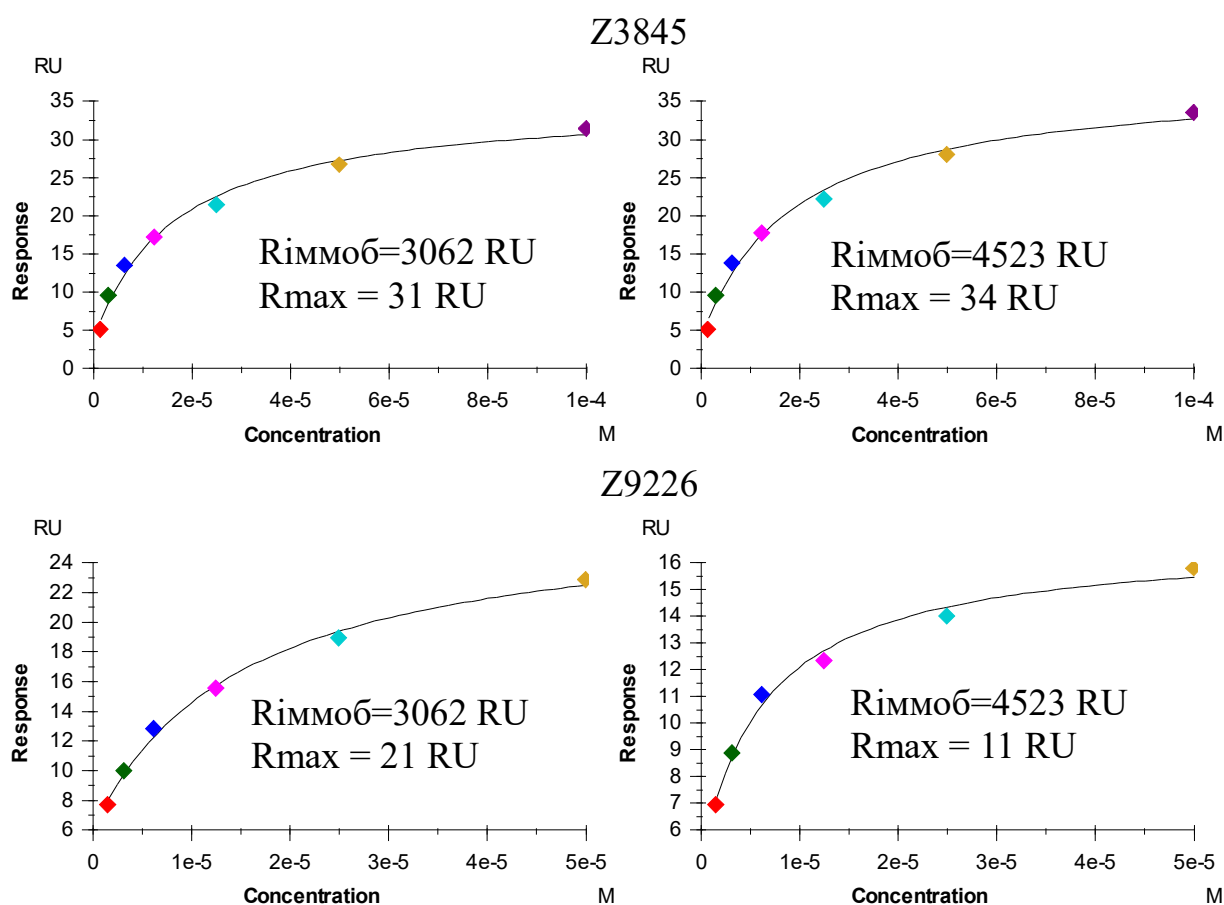
- cancer and immunoinflammation,” *Science* (80-. ), vol. 368, no. 6489, 2020, doi: 10.1126/science.aaz8455.
- [40] P. Ottis and C. M. Crews, “Proteolysis-Targeting Chimeras: Induced Protein Degradation as a Therapeutic Strategy,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 12, no. 4, pp. 892–898, Mar. 2017, doi: 10.1021/acscchembio.6b01068.
- [41] D. P. Bondeson *et al.*, “Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs CORRECTION NOTICE,” *Nat. Chem. Biol. Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, pp. 611–617, 2015, doi: 10.1038/nchembio.1858.
- [42] F. Zhang *et al.*, “Discovery of a new class of PROTAC BRD4 degraders based on a dihydroquinazolinone derivative and lenalidomide/pomalidomide,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 28, no. 1, p. 115228, 2020, doi: 10.1016/j.bmc.2019.115228.
- [43] J. Hines, S. Lartigue, H. Dong, Y. Qian, and C. M. Crews, “MDM2-recruiting PROTAC offers superior, synergistic antiproliferative activity via simultaneous degradation of BRD4 and stabilization of p53,” *Cancer Res.*, vol. 79, no. 1, pp. 251–262, 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2918.
- [44] X. Li and Y. Song, “Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 13, no. 1. 2020, doi: 10.1186/s13045-020-00885-3.
- [45] M. Jung *et al.*, “Affinity map of bromodomain protein 4 (BRD4) interactions with the histone H4 tail and the small molecule inhibitor JQ1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 13, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.523019.
- [46] P. Hunk, “SPR study of BRD4-1,” vol. 1, pp. 32–33, 2017.
- [47] I. Navratilova *et al.*, “Discovery of New Bromodomain Scaffolds by Biosensor Fragment Screening,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 12, 2016, doi: 10.1021/acsmchemlett.6b00154.
- [48] J. Svirelis, J. Andersson, A. Stradner, and A. Dahlin, “Accurate Correction of the ‘bulk Response’ in Surface Plasmon Resonance Sensing Provides New Insights on Interactions Involving Lysozyme and Poly(ethylene glycol),”

- ACS Sensors*, vol. 7, no. 4, 2022, doi: 10.1021/acssensors.2c00273.
- [49] B. Ligands *et al.*, “3, 5-Dimethylisoxazoles Act As Acetyl-lysine-mimetic,” pp. 6761–6770, 2011.
- [50] P. Borysko *et al.*, “Straightforward hit identification approach in fragment-based discovery of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) inhibitors,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 26, no. 12, pp. 3399–3405, 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2018.05.010.
- [51] Biacore application guides, “Solvent correction: principles and practice Biacore application guides 2.”
- [52] Cytiva, *Biacore™ Insight Evaluation Software User Manual*. 2021.
- [53] Biacore and A. Guides, “Kinetics and affinity measurements with Biacore™ systems,” 2008.
- [54] R. Rmax, M. Dalton, N. Newton, P. Joule, and A. Gas, “HowTo BiaCalculations,” pp. 1–15, 2016.
- [55] B. K. Shoichet, “Screening in a spirit haunted world,” *Drug Discovery Today*, vol. 11, no. 13–14. 2006, doi: 10.1016/j.drudis.2006.05.014.
- [56] M. Lipkin, A. Stevens, D. Livingstone, and C. Harris, “How Large Does a Compound Screening Collection Need To Be?,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 11, no. 6, 2008, doi: 10.2174/138620708784911492.
- [57] P. Filippakopoulos *et al.*, “Selective inhibition of BET bromodomains,” *Nature*, vol. 468, 2010, doi: 10.1038/nature09504.
- [58] Trace Drawer, “SOLVENT CORRECTION.” <https://tracedrawer.com/product/solvent-correction/#product-gallery-62a9b0436ac62-1>.
- [59] O. Savych *et al.*, “Application of large chemical space in an iterative discovery process Distribution of PhysChem parameters of the drug-like 221M subset . SlogP Rotatable bonds Analytical Data for the synthesized 29 compounds .”

- [60] SPR-pages, “Validation,” Oct. 2020. <https://www.sprpages.nl/data-fitting/validation?highlight=WyJjb25jZW50cmF0aW9uIiwuY29uY2VudHJhdGlvbniMiLCJjb25jZW50cmF0ZWQiLCInY29uY2VudHJhdGlvbiciLCJjb25jZW50cmF0aW9uJyJd>.

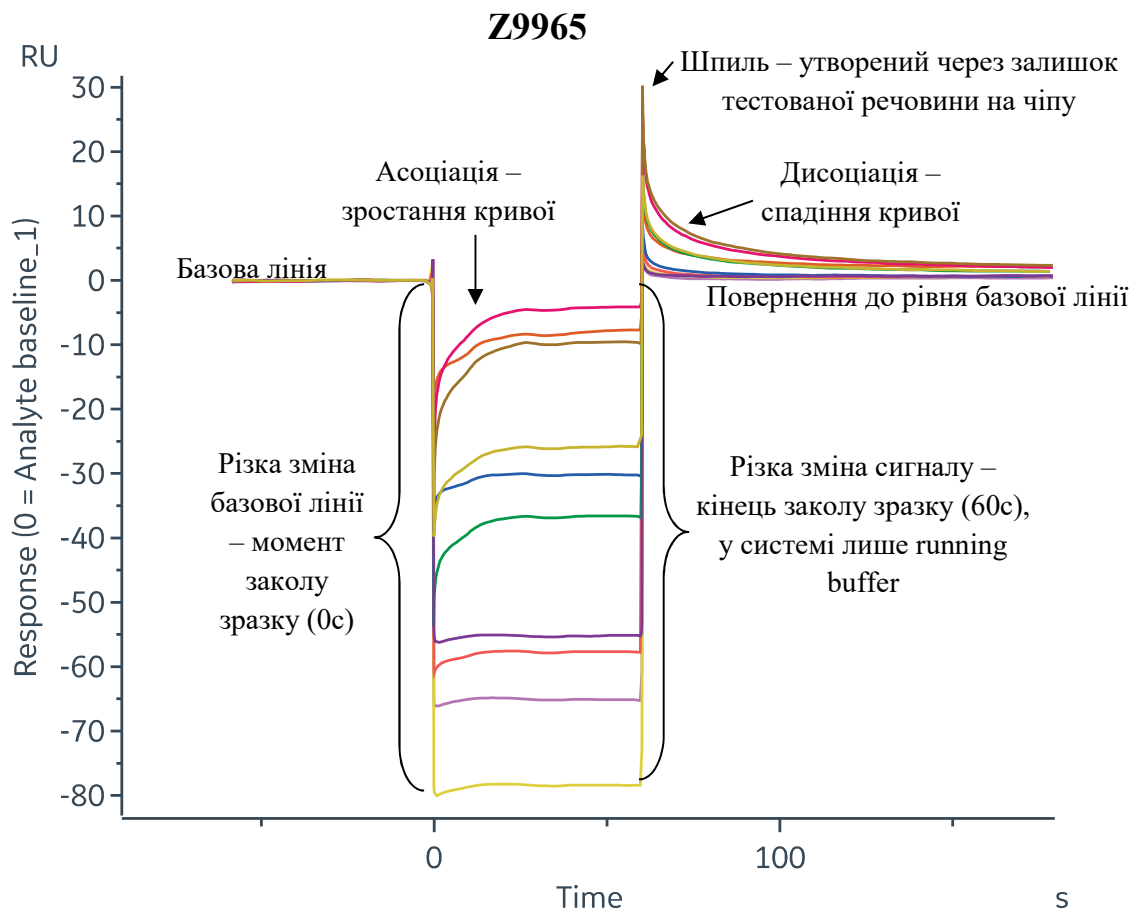
## ДОДАТКИ

**Додаток А.** Репрезентативні графіки порівняння даних двох речовин на двох лунках чіпа з різним рівнем іммобілізації BRD4, які проявляють неспецифічну активність.  $R_{\text{імоб}}$  - відносна характеристика кількості білка, що був іммобілізований на поверхню чіпа.  $R_{\text{max}}$  – параметр, отриманий в результаті вимірювання, що надає відносну характеристику максимальної кількості речовини, що може провзаємодіяти з усім іммобілізованим білком на поверхні чіпа (за умови заколу надлишкової концентрації речовини).



Чим більше білку на поверхні чіпа ( $R_{\text{імоб}}$ ), тим більша кількість речовини може взаємодіяти з цим білком ( $R_{\text{max}}$ ). З даних не видно прямої пропорційності у значення  $R_{\text{max}}$  та  $R_{\text{імоб}}$  для однієї речовини. Це може свідчити про взаємодію речовин не лише з BRD4, а й з поверхнею чіпа, використаному в експерименті (SA чіп).

**Додаток Б.** Репрезентативна сенсорграма неспецифічної взаємодії тестованої речовини з референтною лункою NA чіпа. Тестування відбувалось для 38 сполук у 8 концентраціях. Для 25 сполук була виявлена неспецифічна взаємодія (65%).



Стрілочкою на кривій сенсорграмі помічено область у якій спостерігається дисоціація від референтної лунки: після заколу зразку (протягом 60 с) певна кількість речовини зв'язалась з поверхнею чіпа та поступово від'єднувалась, що можна спостерігати у вигляді поступового спадання кривої після 60 с вимірювання. Крім того досить помітна асоціація речовин з поверхнею чіпа, що проявляється поступовим збільшенням рівня сигналу з моменту початку заколу (0 с) до кінця (60 с). Різка зміна сигналу у момент початку та кінця заколу зразка обумовлена не ідентичністю складу зразку та running buffer, що пізніше компенсується під час аналізу даних.

**Додаток В.** Порівняння параметрів взаємодії JQ-1 з BRD4 у різних буферах.

	<b>KD, нМ</b>	<b>Rmax</b>	<b>Зайнятість білка,%</b>
Буфер 1	50.4	38.8	53.3
Буфер 2	73.6	37	50.9
Буфер 3	45	43.1	59.2
Буфер 4	60.9	38.4	52.8

Де:

Буфер 1. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО;

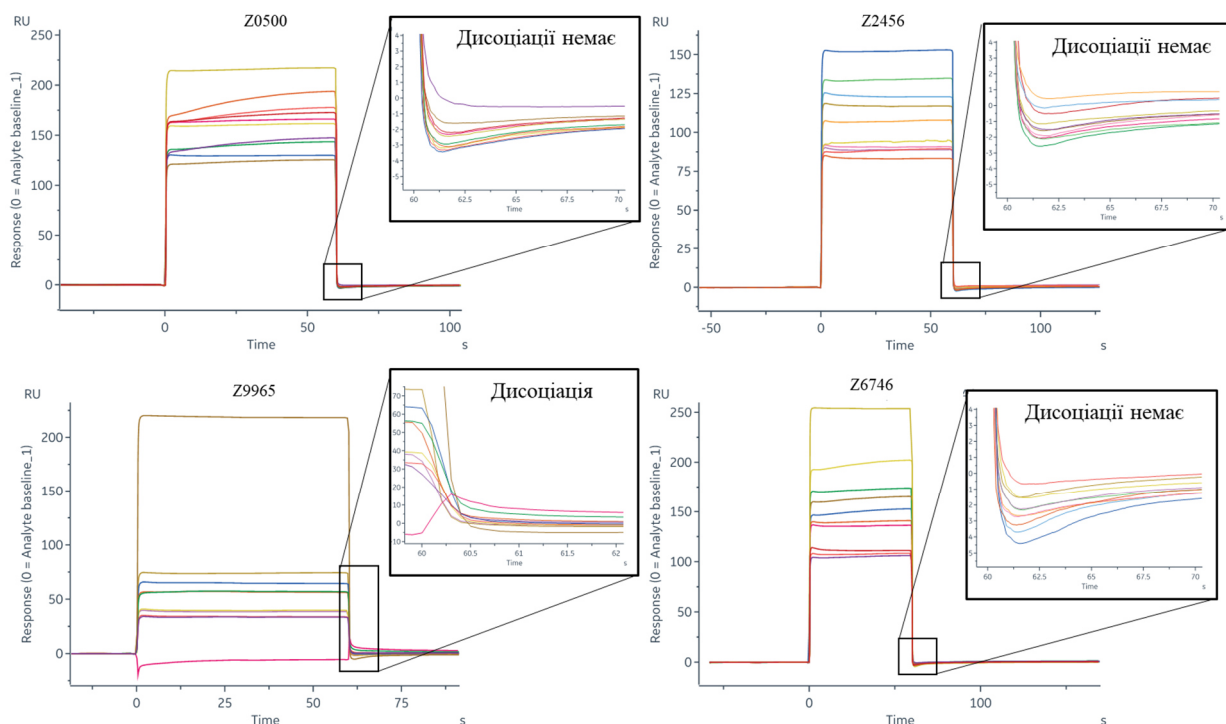
Буфер 2. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО;

Буфер 3. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО, 3 mM EDTA;

Буфер 4. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО, 3 mM EDTA.

З даних видно, що значення KD коливається в межах +/- 15 відносно попередньо отриманих даних у Bienta Ltd та літературних даних[57], що складає менше 30% похибки та є допустимою різницею за умови використання різних умов (в нашому випадку буферів). Аналогічно не спостерігалось великої різниці за параметрами Rmax та % зайнятості, де останній позначає частину іммобілізованого білку з яким могло б відбутись зв'язування речовини за умови надання безперервного потоку концентрації.

**Додаток Г.** Репрезентативні сенсорграми взаємодії 4 протестованих сполук з референтною лункою (блокованою біоцитином) за використання буфера 1 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО).

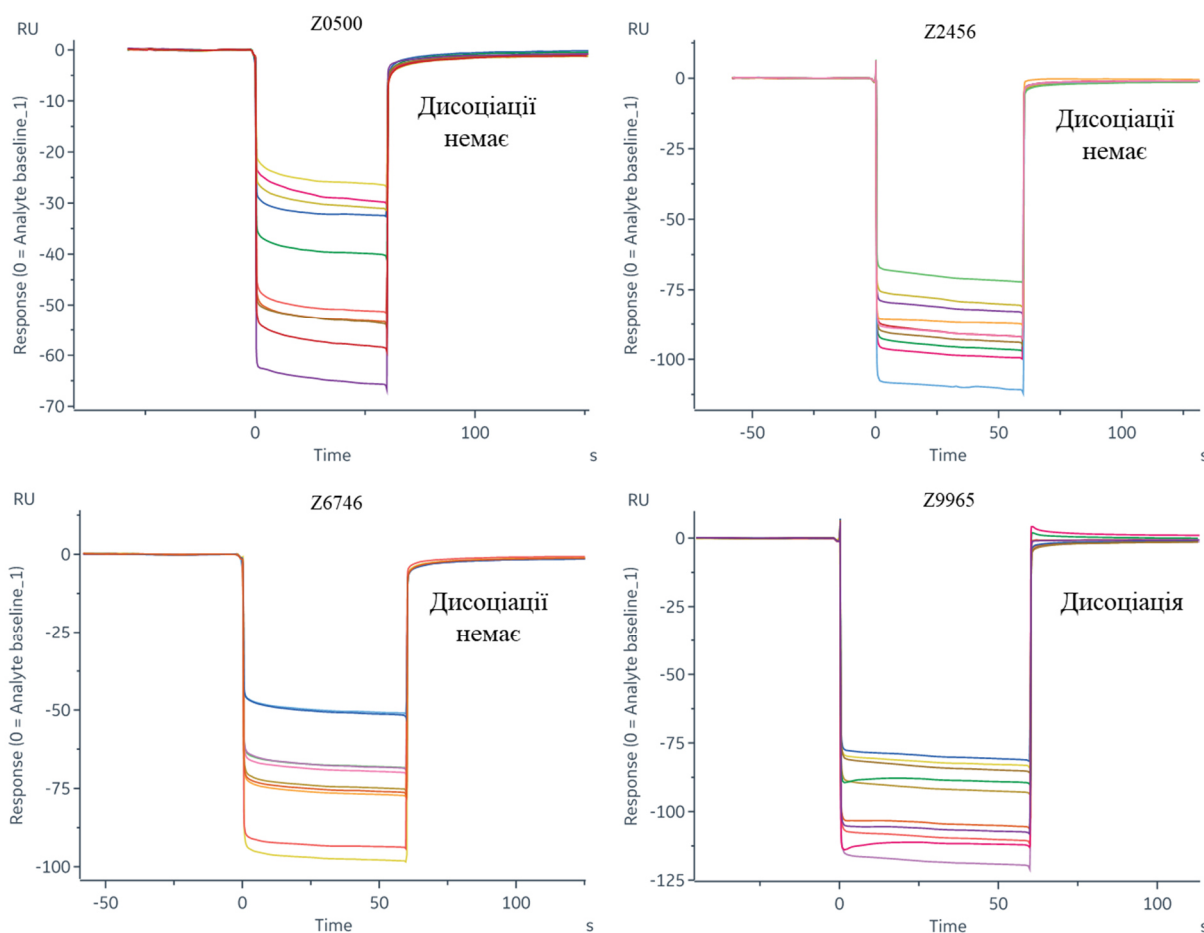


Порівнюючи дані сенсорграми з продемонстрованими у додатку Б, видно, що для 3 з 4 сполук не спостерігається очевидної дисоціації від референтної лунки, а для 1 дисоціація була в 2-3 рази меншою, що може свідчити про усунення неспецифічної взаємодії з поверхнею чіпа.

Важливо примітити, що підняття кривих угору є проявом явища bulk shift, що демонструє не значну різницю складу буферу у проточній системі машини та тестованих зразках, що буде компенсовано у подальших операціях при аналізі даних, проте впливає на візуальне сприйняття кривих.

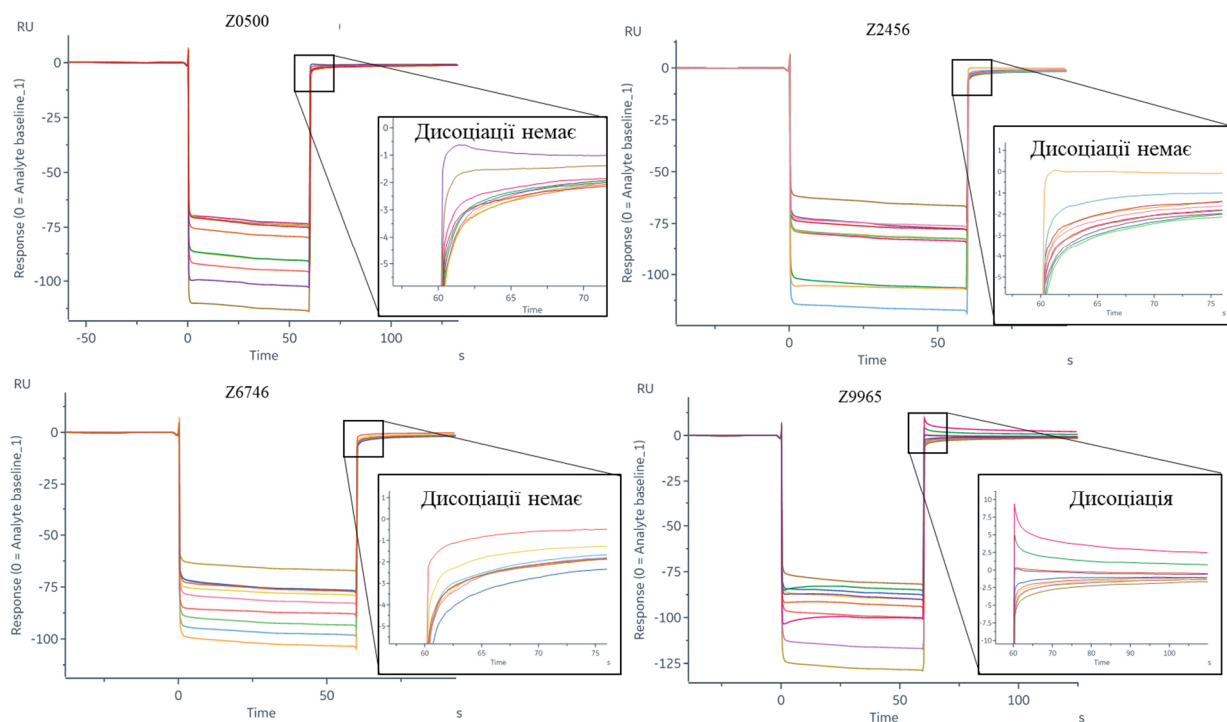
Тому при візуальній оцінці орієнтуємось на швидкість повернення рівня сигналу на початковий рівень до заколу (базова лінія, baseline).

**Додаток Г.** Репрезентативні сенсорграми взаємодії 4 протестованих сполук з референтною лункою (блокованою біоцитином) за використання буфера 2 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО).



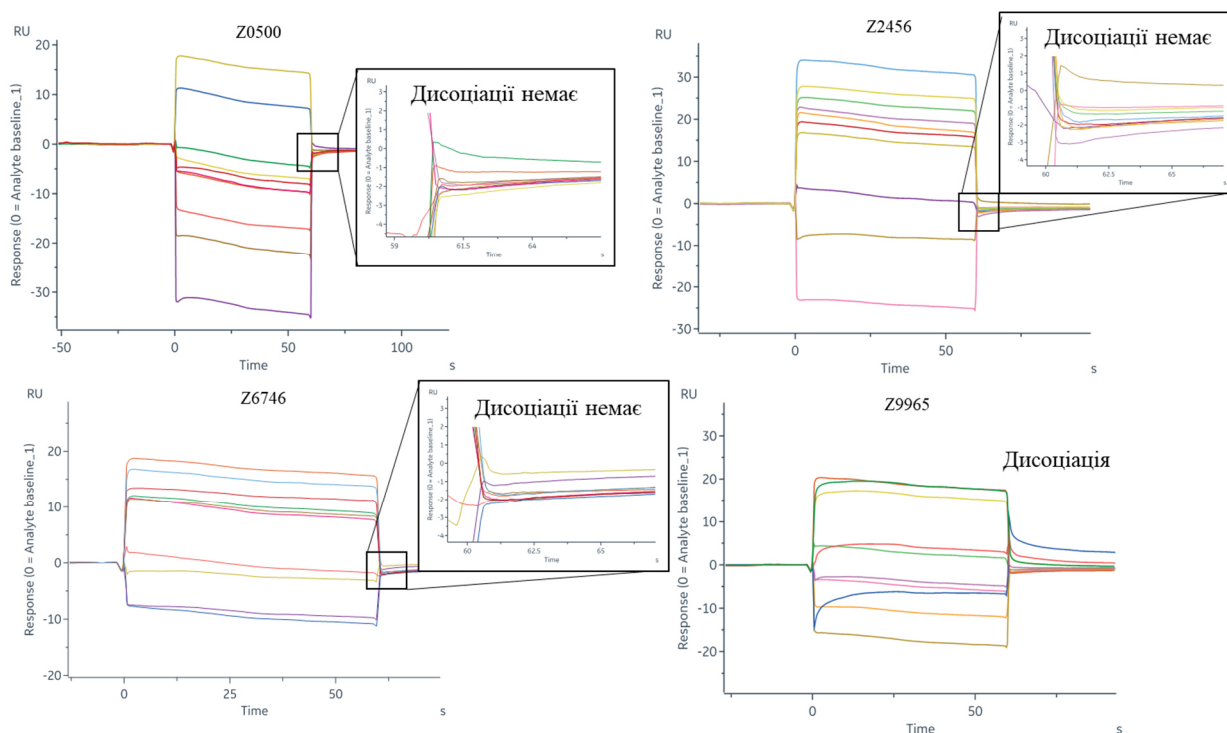
Порівнюючи дані сенсорграми з продемонстрованими у додатку Б, видно, що для 3 з 4 сполук не спостерігається очевидної дисоціації від референтної лунки, що може свідчити про усунення неспецифічної взаємодії з поверхнею чіпа. Цікавим є те, що сполука Z9965 має порівняно невелику дисоціацію, проте стверджувати про повне усунення неспецифічної взаємодії не можна, оскільки це може бути обумовлено властивостями самої речовини. Аналогічно порівнюючи період заколу речовини (0-60 с) з цим моментом у додатку Б, асоціації не спостерігається (крім незначних для речовини Z9965). Таким чином можна зробити висновок, що буфер 1 та 2 демонструють приблизно однаковий ефект на якість експерименту.

**Додаток Д.** Репрезентативні сенсорграми взаємодії 4 протестованих сполук з референтною лункою (блокованою біоцитином) за використання буфера 3 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% ДМСО, 3 mM EDTA).



Порівнюючи дані сенсорграми з продемонстрованими у Додатках Б, Г та Г, видно, що 3 з 4 сполук не демонструють очевидної неспецифічної взаємодії з референтною лункою, на відміну Z9965, для якої неспецифічна активність гіпотетично є характерною властивістю. Таким чином додавання EDTA у склад буферу не продемонструвало значного покращення результатів у порівнянні з буферами 1 та 2.

**Додаток Е.** Репрезентативні сенсорграми взаємодії 4 протестованих сполук з референтною лункою (блокованою біоцитином) за використання буфера 3 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 % P20, 0.5 mM TCEP, pH 7.4, 0.5% DMSO, 3 mM EDTA).



Порівнюючи дані сенсорграми з продемонстрованими у додатку Б, Г, І та Д, видно, що поєднання збільшеної кількості детергенту P20 та EDTA не допомогло позбутись неспецифічної взаємодії речовин з референтною лункою, що спостерігається як наявна дисоціація для всіх речовин, так і асоціацією для сполуки Z9965. Отже, дане поєднання не є задовільним для проведення подальших тестувань.

**Додаток Є.** Таблиця порівняння кінетичних параметрів взаємодії JQ-1 та Z9226 з BRD4 за використання 4 буферів з різним вмістом ДМСО.

JQ-1

<b>Буфер</b>	<b>KD, нМ</b>	<b>Rmax, RU</b>	<b>Зайнятість, %</b>
0.5%	43.7	53.7	68.2
1%	52.6	50.9	64.7
3%	81.3	48.5	61.6
5%	146	49.8	63.3

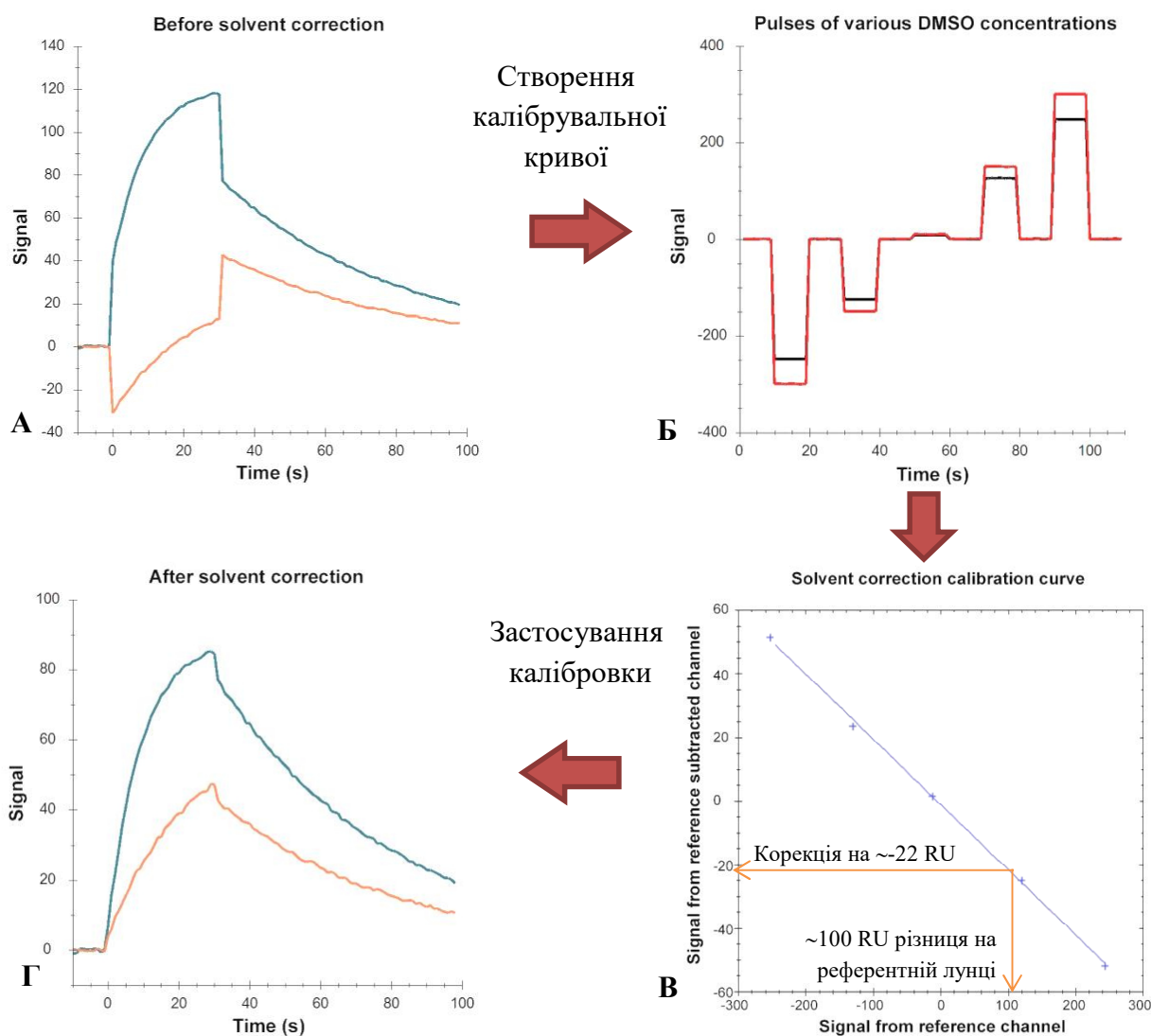
Z9226

<b>Буфер</b>	<b>KD, мкМ</b>	<b>Rmax, RU</b>	<b>Зайнятість, %</b>
0.5%	2.56	21.4	48.3
1%	2.97	23	51.9
3%	14	24.6	55.5
5%	12	21.5	48.5

З отриманих результатів видно, що за використання підвищеного відсотку ДМСО (3 та 5%) спостерігається підвищення значення KD у 2-4 рази для двох тестованих сполук. Це підтверджує гіпотезу про наявність взаємодії ДМСО з BRD4, що обумовлює утворення конкурентної взаємодії за активний центр білка. Поява даного ефекту і обумовлює підвищення значення KD. Тому було вирішено уникати використання буферів, що містить 3 та 5% ДМСО.

На противагу данні отримані для JQ-1 за використання буферів з 0.5 % та 1 % ДМСО відповідає раніше отриманим (Додаток В), що доводить оптимальність використання буферів з цим складом.

**Додаток Ж.** Схематичне зображення принципу компенсації артефактних сигналів за допомогою solvent correction[58].



Як видно з продемонстрованої схеми, до solvent correction (A) спостерігається стрімка зміна сигналу (ріст чи спад). Даний ефект виникає через об'ємну різницю потоку тестованих речовин, за рахунок іммобілізованого білка, що теж займає певний простір у лунці.

Для корекції даних створюється калібровка з різним відсотком ДМСО. З сенсорграми B калібрувальної кривої бачимо різний рівень сигналу для референтної та активної лунки (червона та чорна лінія відповідно). Саме на цю різницю, побудовану у вигляді калібрувальної кривої (B) і компенсується отриманий сигнал за тестування речовин, що корегує дані (Г).

**Додаток 3.** Таблиця значень TmD та TmD RSD контрольних зразків, що використовуються для оцінки контролю якості експерименту тестування вибірки 1 методом TSA.

<b>Назва білка</b>	<b>TmD контролю (°C)</b>	<b>TmD RSD контролю (°C)</b>
SIRT1	48.80	0.10
Abl SH2	61.56	0.12
BrD4	51.36	0.12

Отриманні значення TmD для трьох протестованих білків відповідають літературним та раніше отриманим[59]. TmD RSD не перевищують 0.5 °C, що свідчить про достовірне коливання отриманих значень для методу TSA. Таким чином можна зробити висновок, що експеримент проведений відповідно до вимог контролю якості та отримані результати можуть вважатись достовірними.

**Додаток И.** Таблиця значень TmD та TmD RSD контрольних зразків, що використовуються для оцінки контролю якості експерименту тестування вибірки 2 методом TSA.

<b>Назва білка</b>	<b>TmD контролю (°C)</b>	<b>TmD RSD контролю (°C)</b>
SIRT1	49.33	0.12
Abl SH2	61.61	0.12
BrD4	50.70	0.13

Отриманні значення TmD для трьох протестованих білків відповідають літературним[59] та раніше отриманим (Додаток З). TmD RSD не перевищують 0.5 °C, що свідчить про достовірне коливання отриманих значень для методу TSA. Таким чином можна зробити висновок, що експеримент проведений відповідно до вимог контролю якості та отримані результати можуть вважатись достовірними.

**Додаток I.** Таблиця кінетичних параметрів взаємодії JQ-1 з BRD4 на початку та кінці експерименту тестування 78 речовин у одній концентрації методом SPR. Обрахунок здійснювався методом аналізу кінетики.

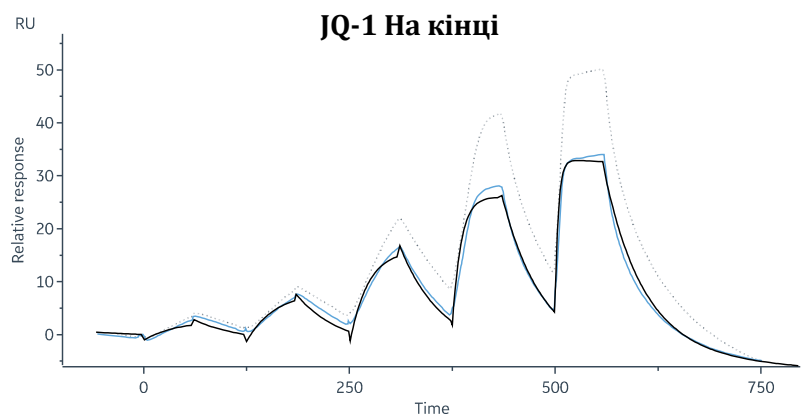
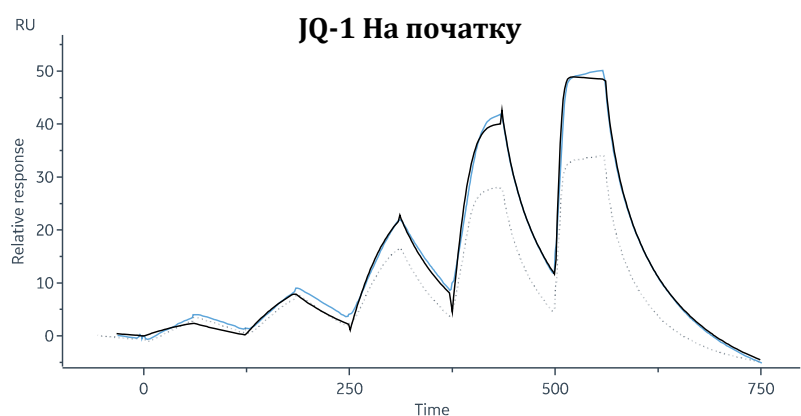
	<b>ka (1/M c)</b>	<b>kd (1/c)</b>	<b>KD, нМ</b>	<b>Rmax</b>	<b>Зайнятість, %</b>
<b>Початок</b>	9.86e5	5.98e-2	<b>60.7</b>	63.8	85.45
<b>Кінець</b>	3.85e5	2.11e-2	<b>54.7</b>	38.2	51.2

З отриманих значень видно, що параметри взаємодії JQ-1 з BRD4 коливається в межах норми. Крім того проводилась оцінка KD відносно наявної інформації у літературі, що відрізняється у межах допустимості (KD = 50 нМ[57]).

Для Rmax теж спостерігається зменшення з часом. Данні Зайнятості білка (%) підтверджують, що на початку експерименту приблизно 85% іммобілізованого білка були активні, що зменшилось до ~50% після 32 годин тестування.

Можна зробити висновок, що експеримент проведений відповідно до вимог контролю якості та отримані результати можуть вважатись достовірними.

**Додаток І.** Сенсорграми взаємодії JQ-1 з BRD4 на початку та кінці експерименту тестування 78 речовин у одній концентрації методом SPR. JQ-1 тестувалась у 5 концентраціях (7.4, 22.2, 66.67, 200, 600 нМ) починаючи від найменшої до найбільшої. Блакитна лінія відповідає кривій, отриманій в результаті вимірювання, чорна – отримана в результаті обрахунку кінетичних параметрів та демонструє якість фітінгу кривої.



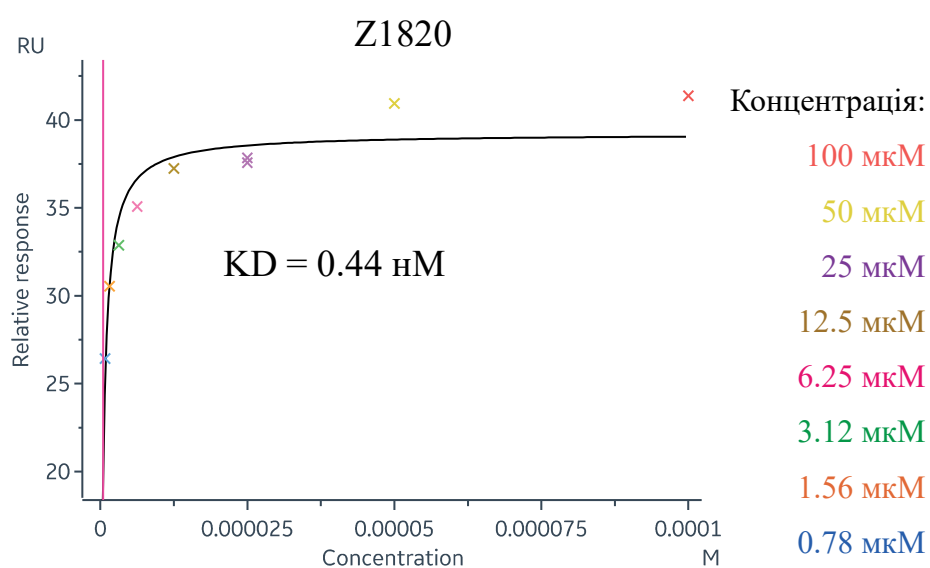
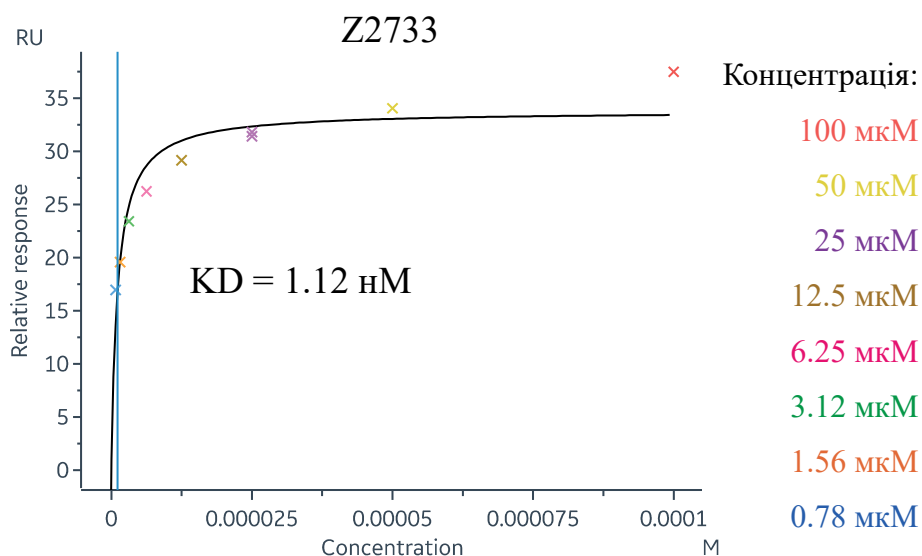
З візуальної оцінки кривих спостерігається нижчий сигнал для JQ-1 у кінці експерименту, в порівнянні даних на початку тесту, що є в межах норми та обумовлене зменшенням активності білка протягом тестування (Додаток І).

**Додаток К.** Таблиця кінетичних параметрів взаємодії JQ-1 з BRD4 визначені під час тестування 39 речовин у концентраційних розведеннях методом SPR. У таблиці систематизовані середні значення JQ-1 для 3 днів експерименту. У таблиці не висвітлені значення  $k_a$  та  $k_d$ .

	<b>KD, нМ</b>	<b>Rmax_теор, RU</b>	<b>Rmax, RU</b>	<b>Зайнятість, %</b>
<b>14.02</b>	<b>71.0</b>	81.3	64.5	79.3
<b>16.02</b>	<b>69.4</b>	76.6	61.6	80.4
<b>18.02</b>	<b>104.0</b>	74.8	61.9	82.7

З отриманих значень видно, що параметри взаємодії JQ-1 з BRD4 коливається в межах норми: різниця  $\sim 30$  нМ (що є менше 30% від обрахованого значення). Порівнюючи з даними отриманими у попередньому тестуванні (Додаток І) можна вважати, що експеримент проведений відповідно до вимог контролю якості та отримані результати є достовірними.

**Додаток К.** Репрезентативні графіки аналізу афінності речовин, що були класифіковані як потенційні хіти, але потребують повторного тестування у нижчих концентраціях.

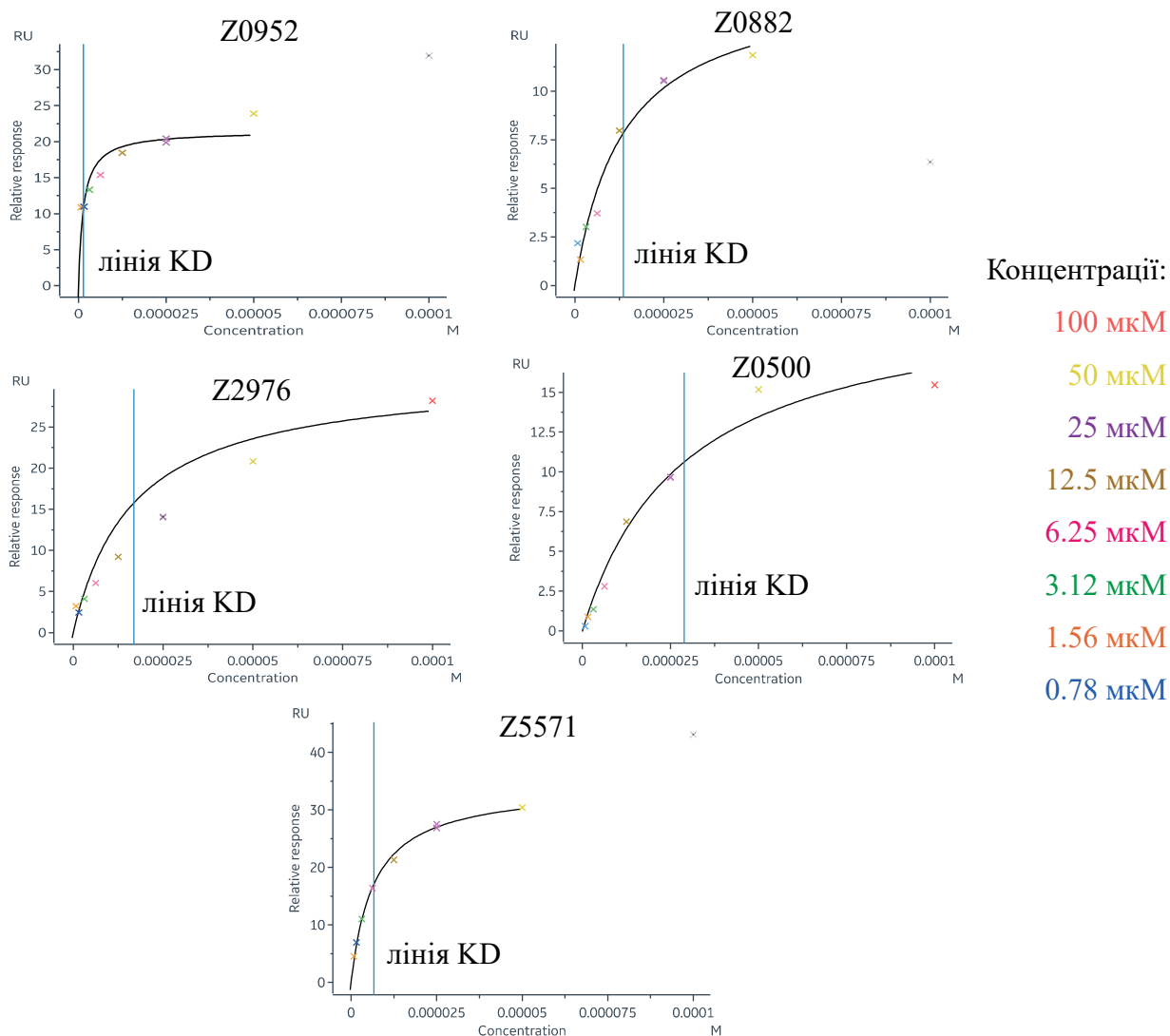


Отриманні данні не містить помітних артефактів та проявів неспецифічної активності.

Проте визначені значення  $KD$  є поза межами тестованих концентрацій чи майже на межі. В таких випадках не можна стверджувати про високу якість отриманих даних. Оскільки для якісного аналізу афінності необхідно використовувати діапазон концентрацій, що лежить в межах  $0.1-10 KD$ [60].

Було вирішено понизити діапазон концентрацій та повторно протестувати сполуки.

**Додаток Л.** Графіки аналізу афінності 6 речовин, що були класифіковані, як сумнівні та можуть бути додатково досліджені, після чого будуть додані або виключені з вибірки для наступного етапу дослідження.



Для сполук Z0952, Z0882 та Z5571 з обрахунку були виключені данні для 100 мкМ (позначені сірим хрестиком), що очевидно випадають із загальної тенденції отриманого сигналу залежно від концентрації. Z0882 та Z0500 продемонстрували низький рівень взаємодії з білком-мішенню (10-15 RU), що свідчить про слабкість взаємодії з BRD4.

Отже, рекомендовано провести повторне тестування, оскільки:

- Z0952 – проявляється початок лінійної залежності для концентрацій 50 та 100 мкМ. Це може бути обумовлене проявленням

неспецифічного зв'язування. Крім того отримане значення KD знаходиться на межі протестованого концентраційного діапазону;

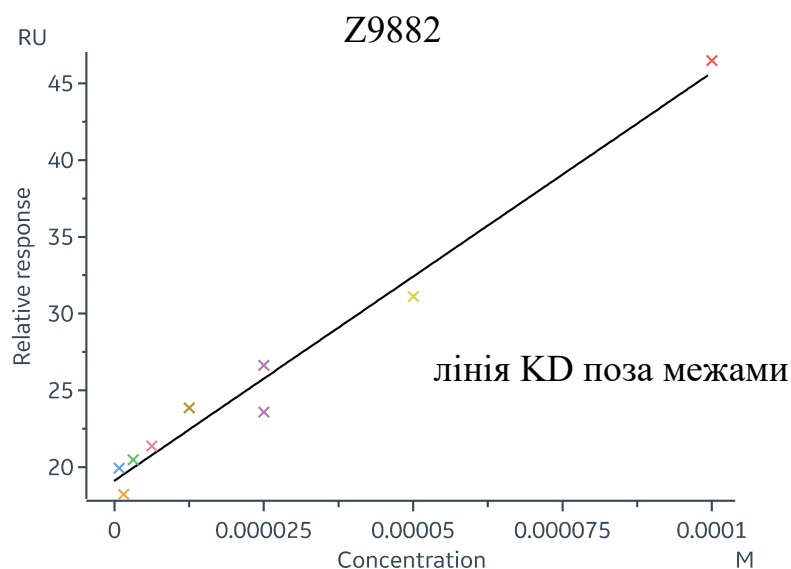
- Z0882 – спостерігаємо різке пониження сигналу для 100 мкМ концентрації. Це може бути обумовлено розчинністю речовини у стоці, що спричиняє преципітацію речовини та пониження концентрації у зразку;

- Z2976 – аналіз афінності відбувається не дуже якісно (крива фітінгу не проходить через точки графіку). Візуально залежність отриманого сигналу від концентрації нагадує лінійну;

- Z5571 – спостерігаємо якісний фітінг, за умови виключення 100 мкМ концентрації. Суттєве збільшення сигналу для 100мкМ може бути обумовлено розчинністю сполуки чи різною активністю білка на момент тестування. Тому гіпотетично речовина може бути потенційним хітом;

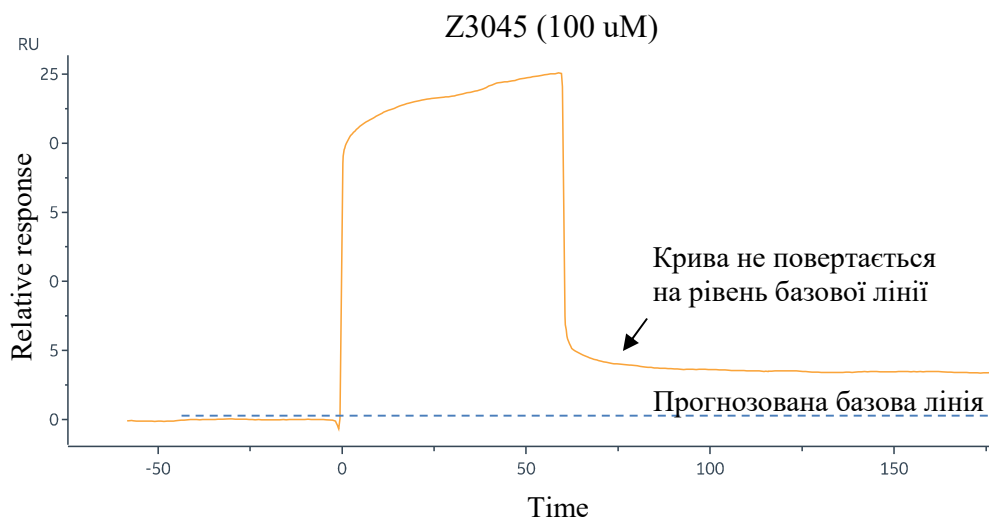
- Z0500 – спостерігаємо однаковий рівень сигналу для 50 та 100 мкМ концентрації речовини, що може бути обумовлене різною активністю білка.

**Додаток М.** Репрезентативний графік аналізу афінності речовин, що демонструють лінійну концентраційну залежність.



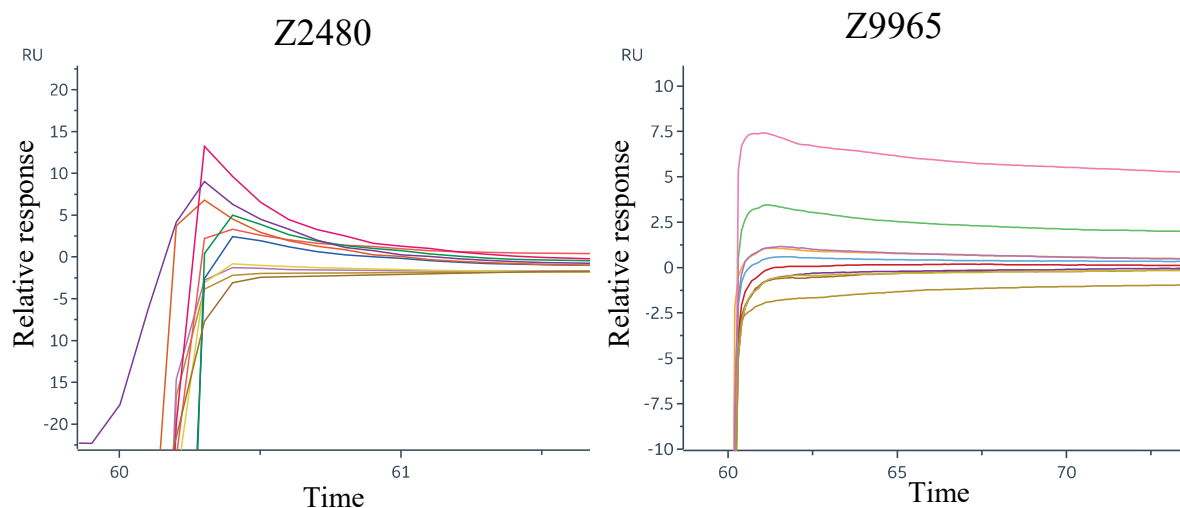
Порівнюючи отриманий графік з продемонстрованим на Рисунку 3.6 спостерігаємо очевидну лінійну залежність взаємодії речовини з білком-мішенню залежно від концентрацій. Це свідчить про неспецифічну активність речовини. Речовини даного характеру не задовольняють умову селективності відносно BRD4, тому не можуть бути відібрані до наступних етапів досліджень.

**Додаток Н.** Репрезентативна сенсорграма взаємодії речовини Z3045 (100 мкМ) з референтною лункою, що свідчить про її налипання на поверхню чіпа.



Спостерігається зміна рівня базової лінії, що був до моменту заколу тестованої речовини та після – після завершення заколу крива сенсорграми (жовта лінія) не повертається на прогнозований рівень базової лінії (синя пунктирна лінія). Крім того з часом не спостерігається пониження сигналу, що свідчило б про повільну дисоціацію. Тому робимо висновок про налипання речовини на поверхню чіпа. За появи даного ефекту рекомендовано виключати дану сполуку з вибірки для проведення наступних етапів дослідження, через складність визначення характеру налипання та впливу даного ефекту на взаємодію з BRD4.

**Додаток О.** Репрезентативна сенсорграма взаємодії речовин з референтною лункою, що демонструє дисоціацію від поверхні чіпа. Проілюстрований момент дисоціації речовин від референтної лунки у збільшеному масштабі.



На сенсорграмах помітно область у якій спостерігається дисоціація речовини від референтної лунки. Після 60 секунди рівень сигналу поступово зменшується та крива спадає. Важливим є те, що даний ефект спостерігається для більшості концентраційних точок речовин (кожен колір сенсорграми – різна концентрація), що свідчить про неспецифічну властивість сполук. Отже, дані речовини не можуть бути відібрані до наступних етапів дослідження.