

## Основные результаты проекта, полученные на первом этапе

Проведен анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов по теме исследований. Подготовлен обзор, в котором проанализировано строение PARP1, каталитическая, ДНК-связывающая активность, репарационная и транскрипционная активность PARP1, механизмы регуляции активностями PARP1. Детально рассмотрено вовлечение PARP1 в процесс канцерогенеза и перспективы использования ингибиторов PARP1 в противо-опухолевой терапии. В обзоре подробно описаны три поколения ингибиторов PARP1 и исследование их терапевтического потенциала на примере проведения доклинических и клинических испытаний.

**PARP1 – «сенсор» разрывов ДНК.** Одной из перспективных молекулярных мишеней для поиска противоопухолевых лекарственных соединений является фермент **поли(АДФ-рибозо)полимераза 1 (PARP1)**. PARP1 является распространенным ядерным белком (1-2 миллиона молекул на клетку) и выполняет функцию «сensors» разрывов ДНК. Одно из самых ранних событий, происходящих при повреждениях ДНК, является узнавание PARP1 разрывов ДНК и запуск репарации. Поли-АДФ-рибозилирование является одной из ключевых посттрансляционных модификаций ядерных белков, участвующей в процессе ответа клетки на генотоксический стресс (рисунок 1).

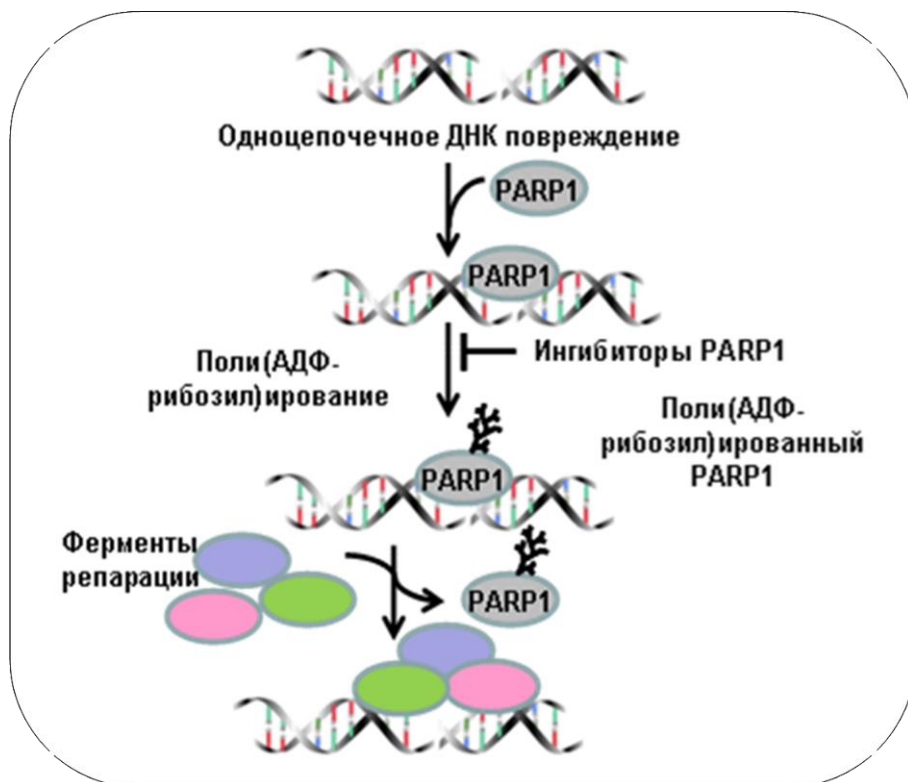


Рисунок 1 PARP1 – «сенсор» разрывов ДНК. При возникновении разрывов ДНК, вызванных, PARP1 связывается с местами разрывов за счет так называемых «цинковых пальцев», и одновременно активируется. В результат происходит

*деконденсация хроматина в месте разрыва, что облегчает доступ ферментов репарации*

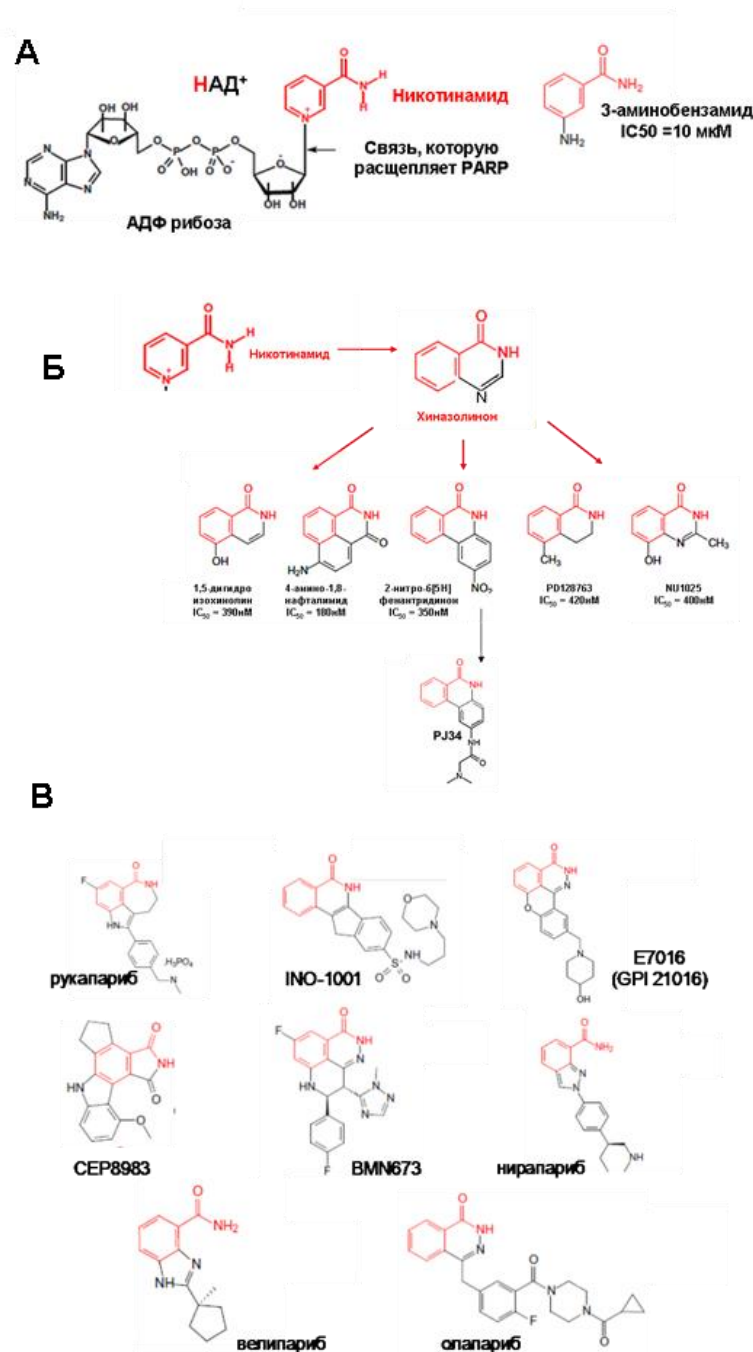
### **PARP1 – проопухолевый фактор.**

Участие PARP1 в репарации обеспечивает жизнеспособность опухолевых клеток. При той генетической нестабильности, которая наблюдается у опухолевых клеток, репарирующая активность PARP1 является дополнительным фактором выживания для них. Получено множество данных о вовлеченности PARP1 в процесс канцерогенеза. Повышенная экспрессия PARP1 наблюдается при меланомах, опухолях легких и молочной железы и др. При этом уровень экспрессии PARP1 является прогностическим признаком и связан с худшим прогнозом выживаемости. Кроме того, экспрессия PARP1 коррелирует с устойчивостью опухолей к терапии

### **Ингибиторы PARP1**

Первое поколение ингибиторов (классических) PARP1 – никотинамидных аналогов было создано около 30 лет назад. Данная разработка основывалась на наблюдениях, что второй продукт PARP-катализируемой реакции – никотинамид - вызывает умеренное ингибирование реакции. В ингибиторах PARP1 первого поколения гетероциклический азот в 3-ем положении был заменен на углерод, что привело к созданию класса бензамидных аналогов (рисунок 2 А). В 1990 годах различными подходами были разработаны более эффективные ингибиторы PARP1 на основе аналогов 1,5-дигидроизоквинолина. Эта группа соединений включала изоквинолины, квиназолины, квиназолин дионы, фталазионы и фенантридионы. Второе поколение ингибиторов PARP1 имело более высокую эффективность и направленную токсичность по отношению к терапевтическим мишеням (рисунок 2.Б). Некоторые из этих соединений были использованы в качестве основы для последующей разработки лекарственных средств различных групп. В частности, получение фенантридионов привели к разработке PJ-34, а затем INO-1001, который впоследствии был использован для клинических испытаний. На основании структурного анализа связывания 2-(4- гидроксифенил) бензамидазола 4-карбоксамидом (NU1085) были разработаны несколько трициклических лактамных индолов и бензамидазолов, в которых карбоксамидная группа была введена в благоприятной ориентации путем включения в 7-членное кольцо. Эти соединения, например, AG14361 способны образовывать критические водородные связи с Gly863 и Ser904, и важной каталитической Glu988 остатка (52). Дальнейшее совершенствование AG14361 привело к идентификации AG-14447 с константой взаимодействия 1,4 нМ с PARP1. В настоящее время на основе бензимидазолов синтезированы ингибиторы PARP1 третьего поколения,

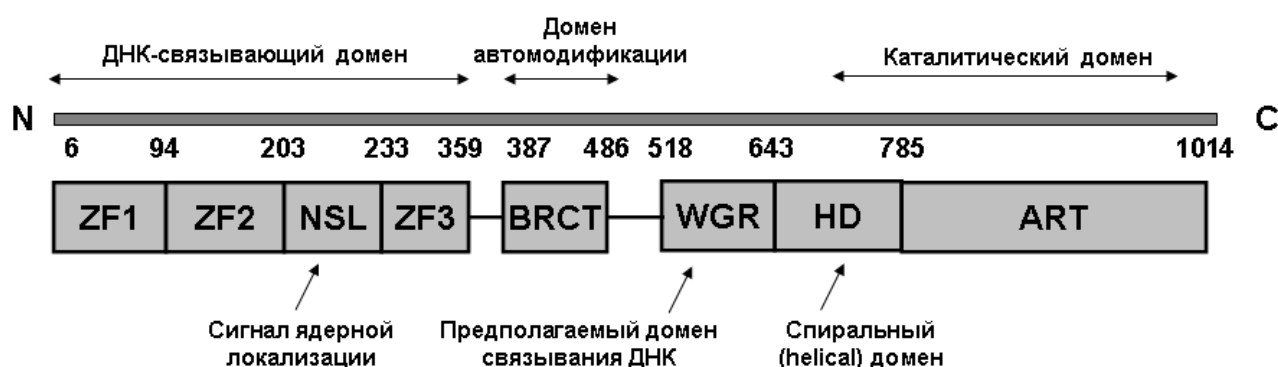
многие из которых проходят клинические испытания, такие как: рукапариб (CO-338; AG014699, PF-0367338), инипариб (BSI-201), олапариб (AZD-2281), велипариб (ABT-888); МК-4827, VMN-673, CEP- 9722, E7016 (GPI 21016) и др. На сегодняшний день, подавляющее большинство ингибиторов PARP взаимодействует со связывающим никотинамидным доменом фермента и ведут себя как конкурентные ингибиторы по отношению к НАД<sup>+</sup>.



**Рисунок 2.** А– Ингибитор PARP1 первого поколения – 3-аминобензамид (3-AB). Б– Ингибиторы второго поколения. В - Ингибиторы PARP1 третьего поколения. Красным обозначена никотинамидная фармакоформная группа

В опытах *in vitro*, а также во множестве доклинических и некоторых клинических испытаниях ингибиторы PARP1 достаточно хорошо зарекомендовали себя как противоопухолевые средства. Однако при проведении более систематических, контролируемых, расширенных клинических испытаний ингибиторов PARP1 вскрылся целый ряд проблем. Во-первых, соединения, ингибирующие связывание НАД<sup>+</sup>, имеют довольно низкую специфичность к PARP1, а также блокируют другие ферментативные пути с участием НАД<sup>+</sup>. Следует отметить, что НАД<sup>+</sup> это кофактор, который взаимодействует со многими ферментами, вовлеченными в ряд клеточных процессов, поэтому конкуренция с НАД<sup>+</sup> приводит к высокой токсичности. Во-вторых, ферментативные ингибиторы PARP1 активируют репликацию вирусов и противопоказаны больным, инфицированным такими вирусами, как вирус Т-клеточного лейкоза человека (HTLV) или вирус, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV). В-третьих, вопрос о безопасности длительного применения существующих ингибиторов PARP1 остается открытым. Известно, что опухолевые клетки обладают способностью быстро приобретать устойчивость к препаратам, применяемым в качестве длительной монотерапии [93]. Эти проблемы стали причиной того, что многие ингибиторы PARP1 не прошли длительные систематические клинические испытания. Испытания некоторых ингибиторов PARP1 прекращены уже на I и II стадиях из-за высокой токсичности и ряда побочных эффектов. Показательной в этом отношении является история инипариба (BSI-201), который дальше всех других ингибиторов PARP1 продвинулся в разработке и дошел до рандомизированного клинического испытания фазы III.

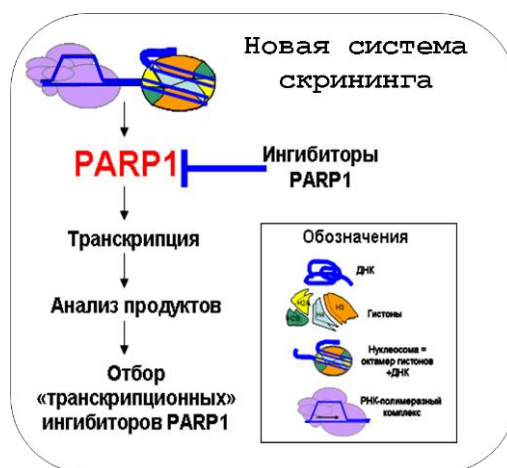
Поскольку PARP1 состоит из нескольких функциональных доменов (рисунок 3) и обладает дополнительными активностями, помимо ферментативной, то активность PARP1 можно регулировать ингибированием данных функциональных доменов.



**Рисунок 3 Структура PARP1.** На N-конце PARP1 располагаются два домена «цинковые пальцы» -ZF (от англ. zinc-finger) За двумя доменами цинковых пальцев у PARP1 обнаружена последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) в области 203-233 а.о. Линкер между двумя основными мотивами содержит сайт расщепления

каспазы-3 (DEVD211-214). Во время апоптоза, PARP1 расщепляется каспазой-3 на два фрагмента: С-концевой фрагмент 89 кДа и 25 кДа N-концевой фрагмент. Кроме того, в данной области есть сайты расщепления нескольких протеаз, включая плазмин, трипсин и гранзим А; вероятно, они могут участвовать в регуляции активности PARP1 путем расщепления полноразмерного белка. Третий домен цинковый палец (ZF3), обнаружен в области 250-350 а.о, является уникальным и отличается по структуре и функциям от ZF1 и ZF2. Домен ZF3 вносит вклад также в формирование междоменных контактов и способствует сборки PARP1 доменов. В области 387-486 а.о. содержится домен содержит BRCT мотив, который обеспечивает белок-белковое и белок-нуклеиновое взаимодействие. Далее, у PARP1 в области 518-643 а.о. располагается мотив WGR, который определяется по консервативным остаткам Trp, Gly и Arg аминокислот. Предположительно, эта область вовлечена в ДНК-связывающую активность. Также есть предположение, что эта область, также как и ZF3, может быть задействована в формирование междоменных контактов. На С-конце PARP1, в области 785-1014 локализуется каталитический домен. Он обладает всеми тремя каталитическими активностями полноразмерного фермента, а именно: инициацией, удлинением и разветвлением PAR. Остатки 859-908 PARP1 филогенетически консервативны и являются «визитной карточкой» всех членов суперсемейства PARP.

В частности, разрабатываются препараты, направленные на ингибирование связывания PARP1 с ДНК. PARP1 играет также ключевую роль в регуляции транскрипции. По мнению авторов, поиск соединений, способных предотвращать участие PARP1 в процессе транскрипции, может привести к разработке нового класса лекарственных средств, имеющих более высокую специфичность и менее выраженные побочные эффекты. Нуклеосомные поверхности можно использовать в качестве основы для разработки способа скрининга соединений, вызывающих изменение транскрипционной активности различных белков, в частности PARP1 (рисунок 4) . Есть конкурентные преимущества данной системы: Во-первых, она собрана из высокоочищенных компонентов и достаточно проста в интерпретации получаемых результатов. Во-вторых, воспроизводит многие эффекты процесса эукариотической транскрипции, наблюдаемые в клетке, что позволяет проводить функциональные транскрипционные тесты. В-третьих, не требует сложного высокотехнологичного оборудования для проведения анализа



**Рисунок 4** Сборка системы: отдельно осуществляется сборка нуклеосомы из очищенных гистонов и коротких фрагментов ДНК определенной последовательности, затем происходит лигирование нуклеосом с РНК полимеразным комплексом; затем добавляют нуклеотиды и анализируют продукты транскрипции. Методы анализа могут быть как биохимические, так и флуоресцентные

2. Проведены патентные исследования в соответствии с требованиями ГОСТ 15.011-96. Проанализировано, согласно Заданию на проведение патентных исследований и Регламенту поиска, около 300 источников информации. Большое количество научных публикаций свидетельствует о растущем интересе к использованию ингибиторов PARP1 в качестве перспективных противо-опухолевых препаратов. Большинство известных ингибиторов PARP направлены на ингибирование его каталитической активности. Изобретения, патентующие ингибиторы других некаталитических активностей PARP1, отсутствуют. При этом есть научные публикации, свидетельствующей о перспективности направления поиска некаталитических ингибиторов PARP1. В целом, география патентирования показывает, что преобладают патенты, выполненные в США. Не обнаружено действующих патентных документов, полностью идентичных исследуемому объекту «макету функциональной системы скрининга противоопухолевых препаратов на основе анализа PARP1». Все это в целом, создает благоприятные условия для патентования изобретений в области получения функциональной системы скрининга противоопухолевых препаратов на основе анализа PARP1, а сам объект исследований обладает патентной привлекательностью в отношении Российской Федерации и за рубежом

3. Представлено обоснование выбора методов и средств, направлений исследований и способов решения поставленных задач. Проведена сравнительная оценки

вариантов возможных решений исследуемой проблемы. Исполнители проекта остановились на двух методах анализа интермедиатов, которые будут использованы при выполнении настоящего проекта. Это различные модификации метода биохимического анализа и метод FRET. Этот выбор обусловлен с одной стороны, подходов необходимостью использования сравнительно недорогих, количественных и информативных методов анализа. С другой стороны, у авторов проект достигнут очевидный прогресс при использовании данных методов для анализа тонких механизмов транскрипции, что позволяет надеяться на успешное применение данных методик в исследованиях влияния PARP1 и его ингибиторов на процесс транскрипции

4. Осуществлен подбор и разработка биохимических методов идентификации и определения структур ключевых интермедиатов, формирующихся в присутствии PARP1, в том числе адаптированы для целей проекта такие методы, как электрофорез в нативных условиях, электрофорез в денатурирующих условиях, футпринтинг ДНКазой1 и гидроксильный, рестрикционный анализ и др.

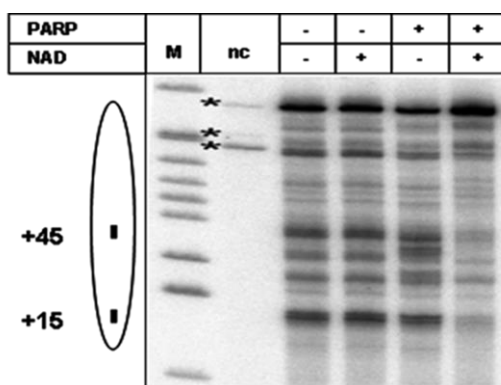


Рисунок 5 – Позиция нуклеосом отмечена овалом. В отсутствии PARP1, процесс транскрипции идет с ярко выраженным паузированием РНКполимеразы, в положениях 15 и 45 п.н. от промотер-проксимальной границы. При внесении PARP1 и НАД<sup>+</sup> процесс транскрипции значительно усиливается, паузирование снижается, выход транскриптов увеличивается.

5. Проведен дизайн для создания матриц функциональной системы скрининга противоопухолевых препаратов на основе анализа PARP1. Осуществлен подбор оптимальных функциональных транскрипционных тестов для проверки активности PARP1 на основе биохимического анализа. В частности, функциональный тест для проверки эффективности транскрипции, тест с ограниченной транскрипцией, тест на определение констант скоростей.

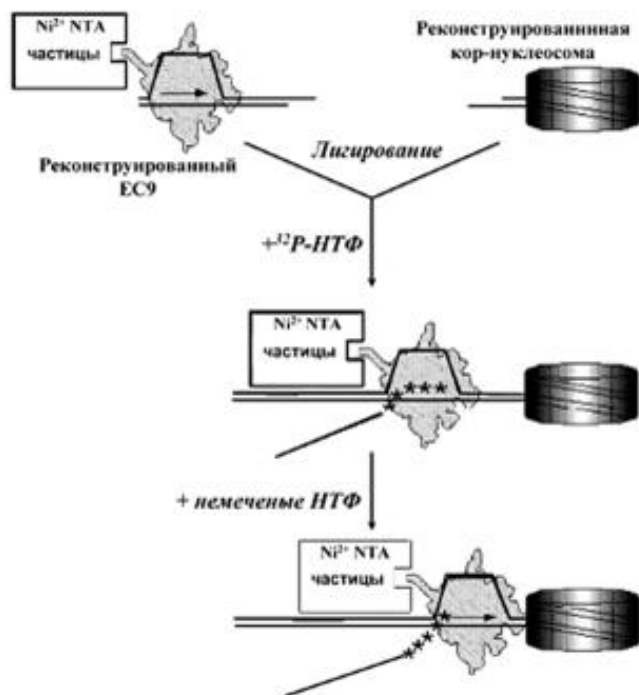


Рисунок 6 - Экспериментальный подход для анализа механизма транскрипции нуклеосом. Транскрипционный комплекс – слева (РНК полимераза, дигибридная смесь, нематричная ДНК иммобилизована на Ni<sup>2+</sup>+NTA гранулах). Нуклеосомы реконструировали отдельно (раздел 7.1.3), лигировали с транскрипционным комплексом, и удлиняли РНК в присутствии неполной комбинации меченых НТФ (РНКП2 останавливали до того, как она дойдёт до нуклеосомы. Меченые НТФ отмывали, и проводили дальнейшую транскрипцию через нуклеосому в присутствии всех немеченых НТФ. Цепи ДНК показаны как черные линии, РНК представлена линией со стрелкой на 3'-конце

6. Проведены теоретические исследования отдельных факторов влияющих на качество функциональной системы скрининга противоопухолевых препаратов на основе анализа PARP1.

7. Проведены необходимые мероприятия по достижению заданных значений программных индикаторов. Результаты проведенной работы, в частности, анализ научно-технической и патентной литературы, а также имеющийся практический задел исполнителей ПНИ были представлены индустриальным партнером в виде постеров на мероприятиях по демонстрации и популяризации результатов и достижений науки. Исполнитель ПНИ также участвовал в работе научно-практической конференции "Реализация прикладных научных исследований и экспериментальных разработок по приоритетному направлению Науки о жизни в 2014 году в рамках ФЦП (1-2 декабря 2014 года). В предварительных экспериментальных работах начато использование



оборудования центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова "Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование ". Также в начальных экспериментах использовали три установки зарубежной инфраструктуры. Показатели "Доля исследователей в возрасте до 39 лет в общей численности исследователей-участников проекта" и "Средний возраст исследователей – участников проекта", «Объем привлеченных внебюджетных средств» превышают запланированные.

Таким образом, полученные на этапе результаты соответствуют техническим требованиям к выполняемому проекту. Все работы на первом этапе были выполнены в полном объеме и в срок. Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом.