

# Лиганды сигнальных белков Ерас как инструменты для изучения их биологической активности и создания новых оригинальных лекарственных средств

Мокров Г. В., Никифорова Т. Д., Крыжановский С. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Аннотация.** В обзоре рассмотрены современные представления о строении и функциях белков Ерас (exchange proteins directly activated by cAMP, обменные белки, напрямую активируемые циклическим аденозинмонофосфатом). Вовлечённость белков Ерас как в регуляцию физиологических функций организма, так и в инициацию различных патологических процессов позволяет рассматривать их как принципиально новую биомишень для создания оригинальных, высокоэффективных лекарственных средств. Собраны сведения о существующих агонистах и антагонистах белков Ерас, проанализировано влияние строения лигандов Ерас на значения их аффинности и селективности. Представлены предполагаемые механизмы взаимодействия лигандов с белками Ерас.

**Ключевые слова:** белки Ерас; Ерас1; Ерас2; агонисты Ерас; антагонисты Ерас; cAMP

## Для цитирования:

Мокров Г.В., Никифорова Т.Д., Крыжановский С.А. Лиганды сигнальных белков Ерас как инструменты для изучения их биологической активности и создания новых оригинальных лекарственных средств // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 3–17.  
DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-3-17

## Ерас signaling protein ligands as tools for studying their biological activity and creating new original drugs

Mokrov GV, Nikiforova TD, Kryzhanovskiy SA

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** The review discusses modern views about the structure and functions of Ерас proteins (exchange proteins directly activated by cyclic adenosine monophosphate). The involvement of Ерас proteins both in the regulation of the physiological functions of the body and in the initiation of various pathological processes allows to consider them as a fundamentally new biological target for creating original, highly effective drugs. Information on existing Ерас protein agonists and antagonists was collected, and the influence of Ерас ligands structure on the values of their affinity and selectivity was analyzed. Presumptive mechanisms of the interaction of ligands with Ерас proteins are presented.

**Keywords:** Ерас proteins; Ерас1; Ерас2; Ерас agonists; Ерас antagonists; cAMP

## For citations:

Mokrov GV, Nikiforova TD, Kryzhanovskiy SA. Ерас signaling protein ligands as tools for studying their biological activity and creating new original drugs. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:3–17. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-3-17

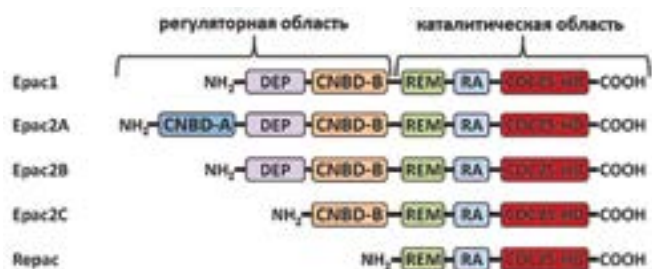
## Введение

Исторически полагали, что единственным аллостерическим эффектором cAMP является фермент – cAMP-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа А (РКА). Однако в конце 1998 г. был идентифицирован cAMP-зависимый белок, который без участия РКА активировал малые GEF-азы (cAMP-GEFs) Rap суперсемейства белков Ras [1], получивший название cAMP-регулируемый фактор обмена гуанидиновых нуклеотидов (cAMP-GEF) или обменный белок, напрямую активируемый cAMP (exchange protein directly activated by cAMP, Ерас) [2]. Несколько позже появились сообщения о том, что РКА и белки Ерас в одной и той же клетке могут иницировать независимые друг от друга, в том числе избыточные и/или противоположные, эффекты [3]. Выделяют две изоформы сигнальных белков Ерас – Ерас1 или cAMP-GEF-I (молекулярная масса около 100 kDa) и Ерас2 или cAMP-GEF-II (молекулярная масса около 110 kDa), которые кодируются различными генами [4].

Сигнальные белки Ерас (Ерас1 и Ерас2) близки к друг другу и по своей структуре являются мультидо-

менными белками, содержащими NH<sub>2</sub>-концевую регуляторную область и COOH-концевой каталитический регион (рис. 1). Полагают, что NH<sub>2</sub>-концевая регуляторная область ЕРАС произошла из R субъединицы РКА, в то время как COOH-концевой каталитический регион по своей структуре наиболее тесно связан с представителями суперсемейства Ras – факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (guanine-nucleotide-exchange factors, GTFs) [5].

Каталитический регион у всех белков Ерас имеет идентичную структуру и состоит из Ras-обменного домена – REM, Ras-ассоциированного домена – RA и C-концевого CDC25-гомологичного домена – CDC25-HD (рис. 1). Домен REM необходим для поддержания стабильности каталитического региона [6]. Домен RA выполняет двоякую функцию – инициацию биологического эффекта и цитозольную локализацию белка, а в случае белка Ерас2С обеспечивает его фиксацию на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Домен CDC25-HD ответственен за обмен гуаниновых нуклеотидов белков Rap и локализацию белков в области ядерных поровых комплексов [7].



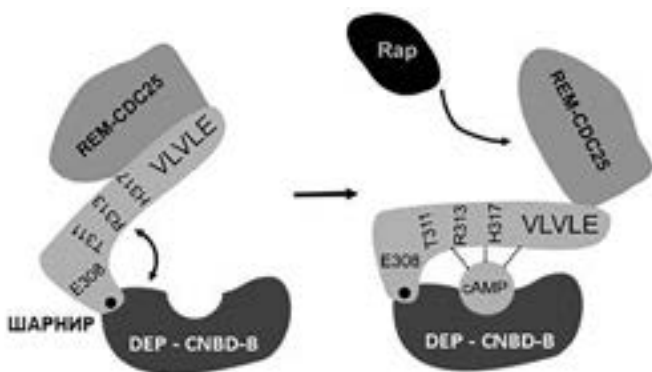
**Рис. 1.** Структура белков Ерас1, Ерас2А, Ерас2В и Ерас2С

Регуляторный регион белка Ерас1 содержит в своем составе сАМР-связывающий домен CNBD-B (или CBD-B), который помимо взаимодействия сАМР обеспечивает контакт белка Ерас1 с микротрубочками [8], и N-концевой домен DEP (Disheveled/Egl-10/pleckstrin domain), ответственный за локализацию белка в области внутренней поверхности клеточной мембраны, и обеспечивает транслокацию Ерас1 к митохондриям [9].

Регуляторный регион белка Ерас2А также содержит CNBD-B и DEP домены (рис. 1), однако N-концевым доменом этого белка является не DEP домен, а присоединенный к нему дополнительный низкоафинный CNBD-A (CBD-A) домен, который в отличие от CNBD-B домена обладает меньшим сродством к сАМР и не может индуцировать активность малых GTF-аз после связывания сАМР [9, 10]. CNBD-A и DEP домены принимают участие в регуляции внутриклеточной локализации белка Ерас2А [7].

Структура регуляторного региона белка Ерас2В аналогична таковой, известной для белка Ерас1 [7]. Регуляторный регион белка Ерас2С содержит только один N-концевой домен CNBD-B.

Между доменом CNBD-B регуляторного региона и REM доменом каталитической области белков Ерас располагается псевдо-β-складка, так называемый «шарнир» или «коммутатор», содержащий в своем составе консервативную последовательность (мотив) VLVLE (321VLVLE325), состоящий из 4 доменов – E308, T311, R313 и H317 (рис. 2) [11]. Шарнир необхо-



**Рис. 2.** Схема действия «шарнира» белков Ерас, обеспечивающего механизм их автоингибирования

дим для автоингибирования белков Ерас. Домен E308 прилежит к CNBD-B домену регуляторного региона, а консервативная последовательность VLVLE – к REM домену каталитической области (рис. 2).

К настоящему времени известно, что белки Ерас, как минимум, экспрессируются в нейронах ЦНС (фронтальная кора, гиппокамп), клетках гладкой мускулатуры бронхиального дерева, иммунокомпетентных клетках, кортикальных нефронах, β-клетках поджелудочной железы, клетках гладкой мускулатуры сосудов (в том числе коронарных), клетках сосудистого эндотелия и кардиомиоцитах [12]. Показано, что белки Ерас играют ключевую роль в регуляции базисных внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за поддержание внутриклеточного гомеостаза, а их гипер/гипоэкспрессия лежит в основе патогенеза многих патологических процессов. Например, в сердечно-сосудистой системе в нормальных физиологических условиях белки Ерас1 регулируют барьерную функцию и, возможно, ангиогенез эндотелиальных клеток сосудов [13, 14]. Если роль белков Ерас1 в регуляции ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных клеток окончательно не ясна, то их место в регуляции пролиферации/ангиогенеза гладкомышечных клеток сосудов представляется достаточно определённым – белки Ерас1, действуя корпоративно с РКА, проявляют антиангиогенную активность [15]. Помимо этого, белки Ерас1 участвуют в регуляции тонической активности сосудистого русла – в крупных сосудах активация сопряжённых с белками Ерас1 сигнальных путей инициирует вазодилатацию, а в микрососудах кожи, напротив – вазоконстрикцию [16]. В условиях патологии, например сосудистой травмы, активированные белки Ерас1 стимулируют процессы миграции гладкомышечных клеток сосудов и пролиферацию их неоинтимы [17]. Несмотря на то что документально подтверждена экспрессия белков Ерас2 в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, их вклад в регуляцию функциональной активности сосудистого русла не известен. Не менее важен и вклад белков Ерас в регуляцию деятельности сердца. В физиологических условиях сопряжённые с белками Ерас1 сигнальные каскады регулируют инотропную и в определённой мере луситропную функцию кардиомиоцитов, а также процессы их межклеточного взаимодействия [18]. Помимо этого, как белки Ерас1, так и белки Ерас2 проявляют выраженную антиапоптотическую активность [19]. В условиях острой ишемии миокарда активация митохондриальной изоформы белков Ерас1 инициирует гибель кардиомиоцитов [20]. В условиях хронической сердечной патологии (хроническая сердечная недостаточность, постинфарктный коронарокардиосклероз и др.) сопутствующая ей избыточная активация β<sub>1</sub>-адренорецепторов и, соответственно, избыточная активация сАМР/Ерас1-сопряжённых сигнальных каскадов играет существенную роль в развитии гипертрофии, ремоделирования и фиброза

миокарда, а активация Ерас2-сопряжённых сигнальных каскадов инициирует развитие нарушений сердечного ритма [21–23].

Накопленный к настоящему времени литературный материал свидетельствует о важной роли белков Ерас не только в регуляции физиологических функций организма, но и в инициации различных патологических процессов, что позволяет рассматривать их как принципиально новую биомишень для создания оригинальных, высокоэффективных лекарственных средств.

Для решения этой проблемы, а также для изучения роли белков Ерас в регуляции функциональной активности органов и тканей организма был сконструирован и синтезирован ряд фармакологических модуляторов/агонистов и ингибиторов/антагонистов этих белков.

### Производные сАМР – агонисты белков Ерас

Первые синтетические агонисты белков Ерас были созданы на основе модификации структуры сАМР (структуры и значения аффинности представленных в обзоре лигандов белков Ерас представлены в табл. 1). Было установлено, что введение различных заместителей существенно влияет на сродство аналогов сАМР как к белкам Ерас, так и к РКА. Первая удачная попытка в создании селективных модуляторов белков Ерас относится к 2002 году, когда группой голландских и норвежских учёных в результате сравнения сайтов связывания сАМР с белком Ерас и РКА было показано, что гидроксильная группа в 2'-положении сАМР может образовывать водородную связь с остатком глутамата (Glu<sup>238</sup> в человеческом белке РКА) в сАМР-связывающем домене РКА, который отсутствует в сайте связывания сАМР/Ерас [24, 25]. Было высказано предположение, что взаимодействие между группой 2'-ОН и остатком глутамата является существенным для связывания сАМР с сАМР-связывающим доменом РКА, его модификация может привести к созданию селективных модуляторов белков Ерас [24, 25]. Изучение синтезированного набора соединений, модифицированных по 2'-положению углеводного цикла, подтвердило сделанную гипотезу. Так, например, соединение 2'-О-Ме-сАМР, в котором 2'-гидроксильная группа заменена на метокси-группу, оказалось в 10–100 раз более селективным по отношению к белкам Ерас, чем к РКА, при этом аффинность в отношении белка Ерас была лишь немного меньшей, чем таковая для сАМР (коэффициент диссоциации  $K_d = 24,2 \mu\text{M}$ ) [26].

Помимо модификации молекулы сАМР по 2'-положению, этими и другими исследователями был синтезирован набор производных сАМР с замещением по атому азота (N<sup>6</sup>) и 8 положению пуринового основания [24–27].

Изучение N<sup>6</sup>-производных сАМР показало, что введение заместителей в это положение приводит к незначительным изменениям в их способности связываться с белками Ерас, однако при этом происходит

существенное увеличение аффинности в отношении РКА. Так, например, фенильное и бензильное производные (N<sup>6</sup>-phenyl-сАМР и 6-Bnz-сАМР) имеют значения  $K_d$  (Ерас) 1,04  $\mu\text{M}$  и 2,23  $\mu\text{M}$ , соответственно, в то время как их  $K_d$  (РКА) составили 0,26  $\mu\text{M}$  и 0,73  $\mu\text{M}$ , соответственно [25]. Следует отметить, что аналог сАМФ с заменённой аминогруппой на атом кислорода в 6 положении (соединение цГМФ) обладает приблизительно в 10 раз меньшей аффинностью как к Ерас, так и к РКА [25, 26].

Наиболее широко в литературе представлен набор производных сАМР с модификацией в 8 положении аденинового цикла [24–27]. В качестве заместителей в этом положении использовались прежде всего галогены и аминокильные, арилтиольные и арилалкилтиольные группы. Установлено, что в большинстве случаев введение заместителей в 8 положение приводит к увеличению аффинности соединений к белкам Ерас и к существенному увеличению их селективности по отношению к РКА. Так, 8-бром производное (8-Br-сАМР) имело  $K_d$  (Ерас) 0,35  $\mu\text{M}$  и  $K_d$  (РКА) 2,23  $\mu\text{M}$ . Объёмные липофильные группы в 8 положении ещё более увеличивали сродство соответствующих молекул к белкам Ерас. Так, для структуры с п-хлорфенилтиольным заместителем (8-pCPT-сАМР) значение  $K_d$  (Ерас) составило 0,04  $\mu\text{M}$ , а  $K_d$  (РКА) 0,74  $\mu\text{M}$ .

Как и следовало ожидать, одновременная модификация 2' и 8 положений сАМР в соответствии с вышеуказанными данными приводило к созданию высокоаффинных и Ерас/РКА селективных соединений [24–26]. При этом в положении 2' использовалась метокси-группа, а в 8 положении – липофильные заместители. Среди наиболее выдающихся примеров можно привести структуры 8-pCPT-2'-O-Ме-сАМР ( $K_d$  (Ерас) 0,63  $\mu\text{M}$ ) и 8-pMeOPT-2'-O-Ме-сАМР ( $K_d$  (Ерас) 0,41  $\mu\text{M}$ ), для которых  $K_d$  (РКА) составляла более 70  $\mu\text{M}$ . Поскольку соединение 8-pCPT-2'-O-Ме-сАМР, которое в научной литературе обозначается следующими аббревиатурами – 8-CPT, D-007 и 007, проявляло наибольшую аффинность и селективность по отношению к белкам Ерас, его стали широко использовать при изучении спектра биологической активности белков Ерас [28]. Однако соединение 8-CPT имело и свои недостатки, поскольку плохо проникало через биологические мембраны. С целью улучшения проницаемости был синтезирован аналог соединения 8-CPT – соединение 8-pCPT-2'-O-Ме-сАМР-АМ (8-pCPT-АМ), в котором один из атомов кислорода фосфатной группы соединения 8-pMeOPT-2'-O-Ме-сАМР был этерифицирован ацетоксиметилловым эфиром [29]. В результате этой модификации соединение 8-pCPT-АМ, в отличие от прототипа, легко преодолевает клеточную мембрану [29]. Соединение 8-pCPT-АМ действует как пролекарство – после проникновения в клетку оно может гидролизироваться эстеразами до прототипа 8-pMeOPT-



2'-O-Me-cAMP. Биологические эффекты соединения 8-pCPT-AM реализуются в концентрации более чем в 100 раз меньшей, чем у прототипа, при этом его селективность в отношении белков Ерас сохраняется. Вместе с тем соединение 8-pCPT-AM является и хорошим субстратом для фосфодиэстераз (PDE) и действует как их ингибитор [30].

Ещё одним вариантом модификации структуры сAMP была замена одного из атомов кислорода в фосфатной группе на атом серы [25, 26, 31]. Следует отметить, что такое превращение ведёт к образованию двух диастереомеров: аксиальному (Sp) и экваториальному (Rp). В том случае, когда введение атома серы было проведено для молекулы 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, полученное производное Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS являлось высокоспецифичным агонистом белков Ерас и обладало высокой липофильностью и, следовательно, легко преодолевало клеточную мембрану [31]. Однако, также как и соединение 8-pCPT-AM, оно являлось ингибитором PDE.

В исследовании Schwede F с соавт. была предпринята попытка получения производных сAMP, обладающих Ерас1/Ерас2-селективностью [27]. С использованием вышеописанных структурных модификаций авторами была получена молекула Sp-8-BnT-cAMPS (аббревиатуры: Sp-8-BnT-cAMPS; S-220), содержащая атом серы в фосфатной группе в аксиальном положении и бензилтиольную группу в 8 положении пуринового основания, обладающая 100-кратной селективностью к Ерас2 в сравнении с Ерас1 (константа полуактивации  $AC_{50}$  (Ерас2) 0,1  $\mu$ M,  $AC_{50}$  (Ерас1) 13  $\mu$ M), поскольку имеет тропность к представленному в его сAMP-связывающем домене (CNBD-B) регуляторного региона  $Lys_{405}$  аминокислотному остатку. Хотя соединение S-220 рассматривают как селективный агонист белка Ерас2A, имеются сообщения о том, что оно может оказывать и незначительное модулирующее действие в отношении белка Ерас1 [27].

В ряде исследований показано, что в качестве селективных агонистов белка Ерас2A могут быть использованы гипогликемические препараты – производные сульфонилмочевины (глибенкламид, глипизид и др.), применяемые в клинике для лечения сахарного диабета 2-го типа [32, 33]. Связывание производных сульфонилмочевины с белками Ерас2A зависит от концентрации сAMP. Для глибенкламида и глипизида взаимодействие с белками Ерас2A наблюдалось при их концентрации порядка 10  $\mu$ M. Производные сульфонилмочевины и сAMP совместно активируют белки Ерас2A путём связывания с доменами регуляторного региона CNBD-A и CNBD-B, соответственно.

Необходимо подчеркнуть, что имеющиеся в распоряжении исследователей агонисты белков Ерас, созданные на основе аналогов сAMP и широко используемые при изучении их биологических эффектов, обладают существенными недостатками, поскольку большинство из них, помимо белков Ерас, взаимодействуют

и с другими внутриклеточными мишенями [34, 35]. Это связано с тем, что при дизайне молекулярных инструментов для изучения функций белков Ерас авторы практически не уделяли внимания их селективности по отношению к другим мишеням, что, с одной стороны, позволяет говорить о необходимости более тщательного подхода к трактовке имеющихся результатов, а с другой стороны, ставит вопрос о необходимости создания новых фармакологических инструментов, обладающих сродством исключительно к белкам Ерас.

### Антагонисты белков Ерас

В исследованиях *Tsalkova T с соавт.* впервые был предложен метод высокопроизводительного скрининга для поиска антагонистов белков Ерас [36, 37]. Этот метод основан на способности молекул антагонистов конкурировать за место связывания на белке с флуоресцентной меткой, в качестве которой использовалось производное сAMP – 8-NBD-cAMP. Это соединение вызывает более чем 100-кратное увеличение флуоресценции при связывании с очищенным полноразмерным Ерас2 и может быть обращено путём добавления избытка сAMP. При этом увеличение флуоресцентного сигнала было существенно меньшим при связывании 8-NBD-cAMP с белком Ерас1 [38].

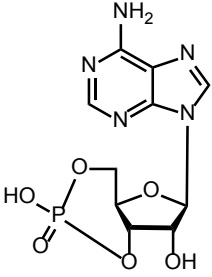
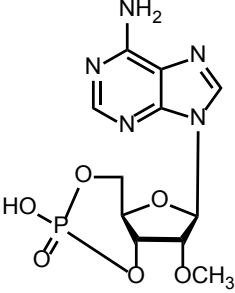
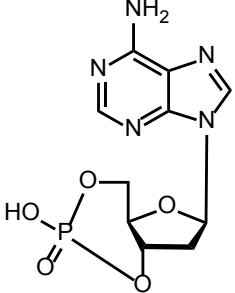
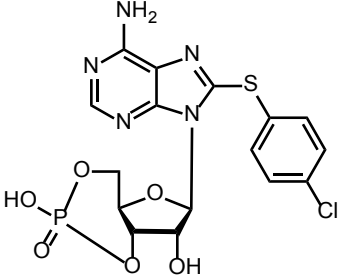
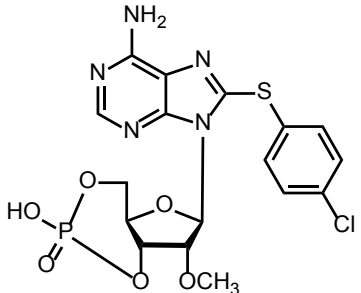
Первичный скрининг с использованием молекулярной библиотеки NCI DTP (Developmental Therapeutics Program) позволил выявить три высокоаффинных ингибитора белков Ерас различного химического строения: NSC45576, NSC119911 и NSC686365. Эти соединения не только ингибировали активность белков Ерас2 (константа полуингибирования  $IC_{50}$  1,7  $\mu$ M, 3,8  $\mu$ M и 7,9  $\mu$ M, соответственно), но также ингибировали Ерас1-опосредованный обмен нуклеотидов Rap1 при 25 мкМ. В то же время, эти соединения не блокировали активность PKA, опосредованную сAMP, то есть обладали Ерас-селективностью.

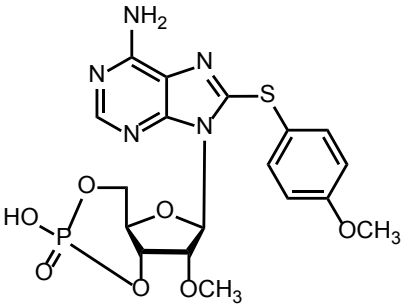
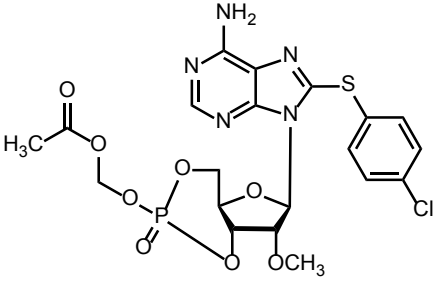
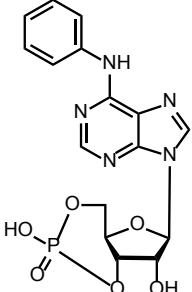
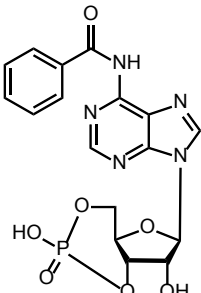
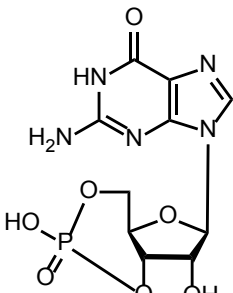
Дальнейший высокопроизводительный скрининг с использованием библиотеки соединений Maybridge Hitfinder, содержащей 14400 структур, позволил *Tsalkova T с соавт.* выявить ряд новых хитов (с шифром ESI), которые ингибировали белки Ерас2 в концентрациях не более 25  $\mu$ M в присутствии аналогичных концентраций сAMP [37].

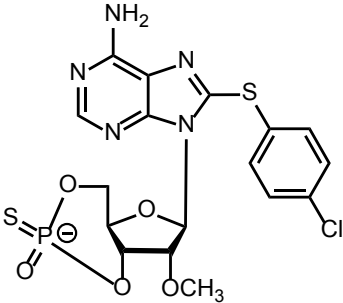
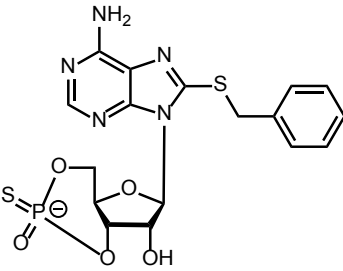
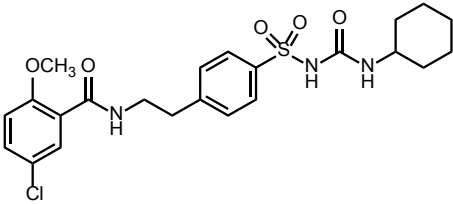
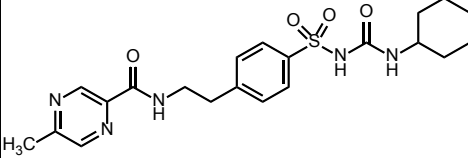
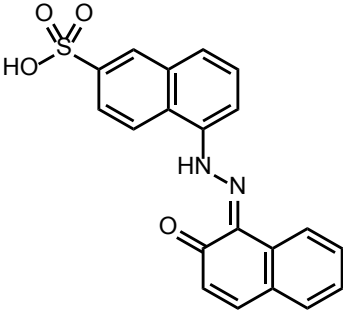
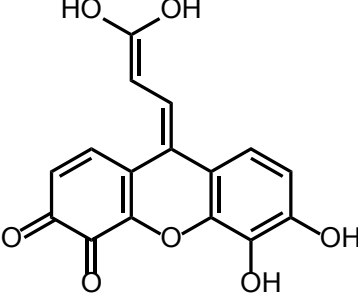
В первую группу хитов вошли биароматические соединения с одноатомной связкой: соединение ESI-05 с сульфонильной связкой, ESI-07 и ESI-10 с аминной связкой. Во второй группе оказались производные 5-циано-6-оксо-1,6-дигидропиримидина: соединения ESI-06 и ESI-08, отличающиеся заместителями при атоме серы во 2 положении. Отдельно стоят биароматические соединения ESI-04 и ESI-09.

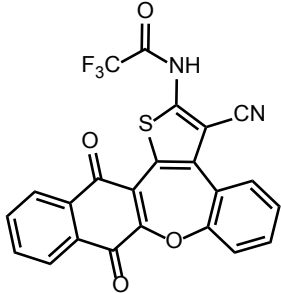
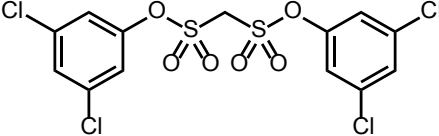
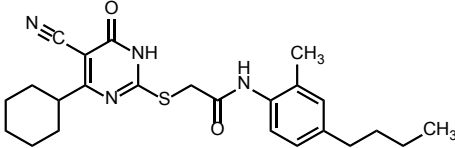
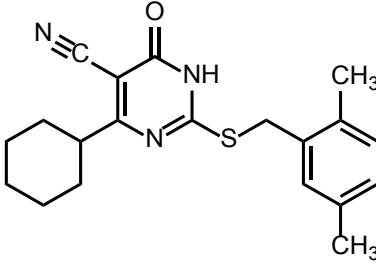
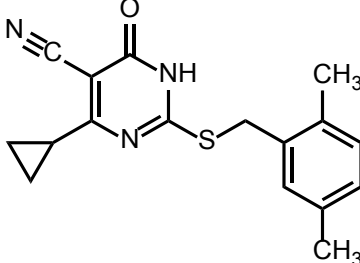
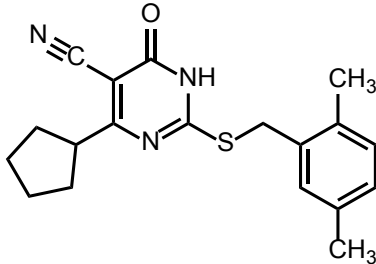
В одной из последующих работ *Tsalkova T с соавт.* описана оптимизация 5-циано-6-оксо-1,6-дигидропиримидиновых производных с целью под-

Структуры лигандов Ерас и значения их аффинности

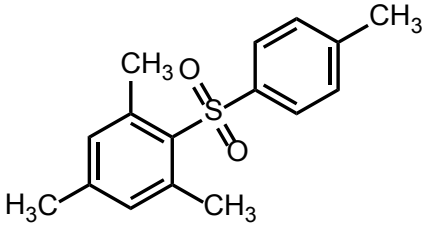
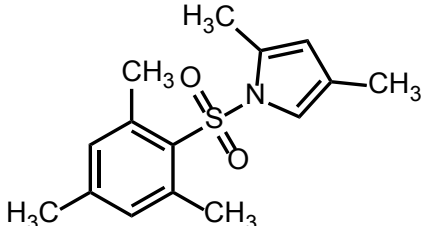
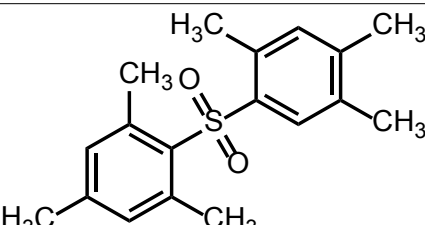
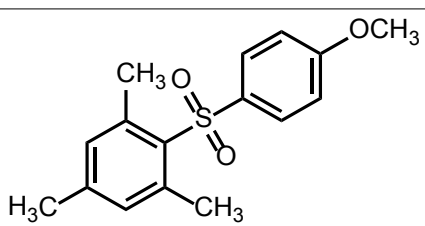
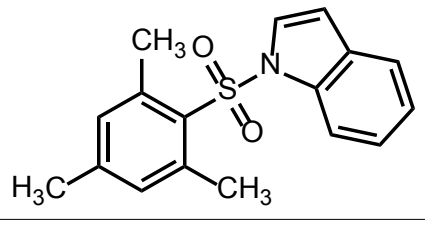
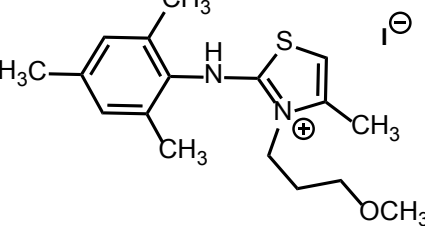
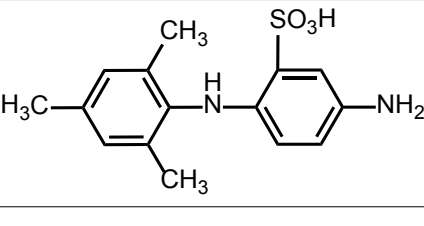
Класс	Шифр	Структура	Аффинность (Ерас)	Ссылка
Производные cAMP	cAMP		Kd 2,9 μM	25, 26
	2'-O-Me-cAMP		Kd 24,2 μM	26
	2'-deoxy-cAMP		Kd 1160 μM	25, 26
	8-pCPT-cAMP		Kd 0,04 μM	25, 26
	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP		Kd 0,63 μM	25, 26

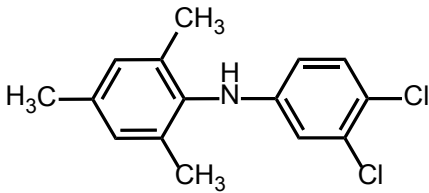
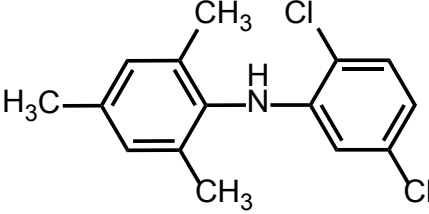
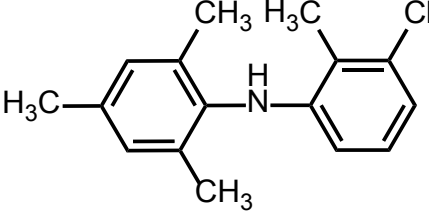
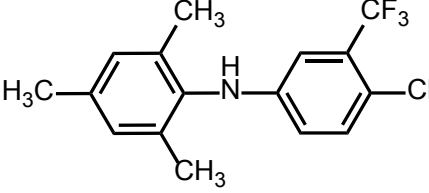
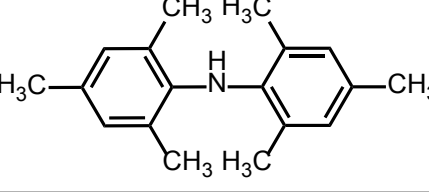
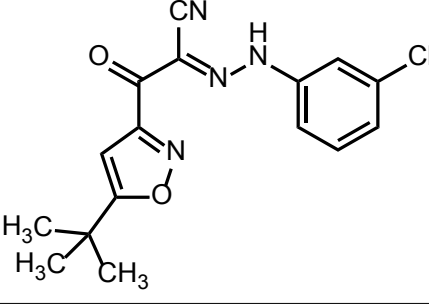
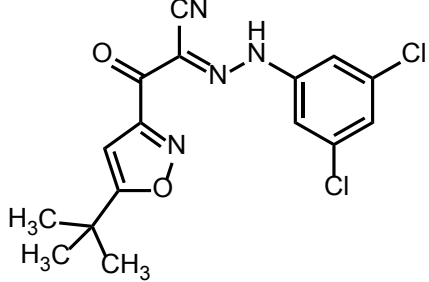
Производные cAMP	8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP		Kd 0,41 μM	25, 26
	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM		AC50 0,01 μM	29
	N <sup>6</sup> -phenyl-cAMP		Kd 0,36 μM	25
	6-Bnz-cAMP		Kd 0,77 μM	25
	cGMP		Kd 37,2 μM	25, 26

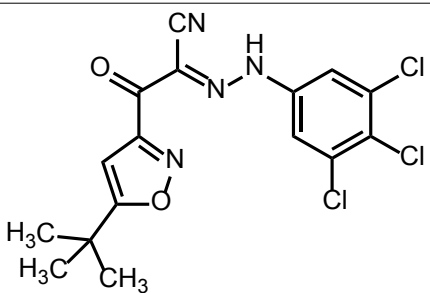
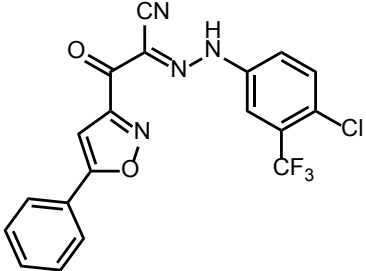
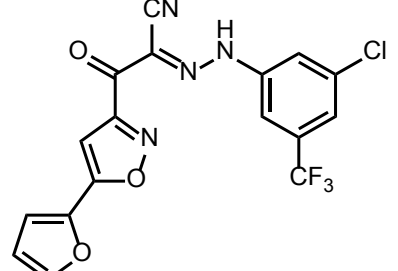
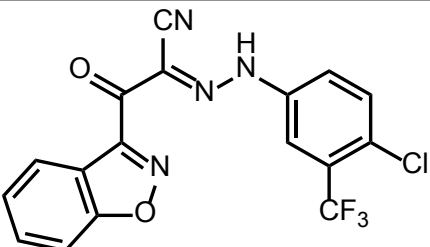
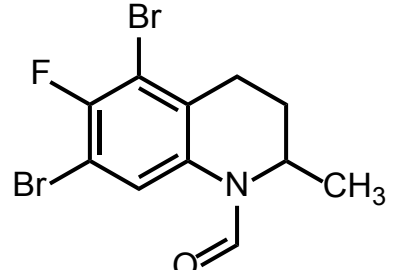
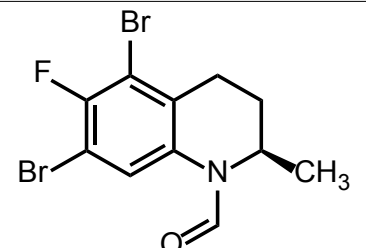
<p>Производные cAMP</p>	<p>Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS</p>		<p>Kd 6,1 μM</p>	<p>31</p>
	<p>Sp-8-BnT-cAMPS</p>		<p>AC50 (Epac2) 0,1 μM, AC50 (Epac1) 13 μM</p>	<p>27</p>
<p>Производные сульфонилмочевины</p>	<p>Глибенкламид</p>		<p>IC50~10 μM</p>	<p>32</p>
	<p>Глипизид</p>		<p>IC50~10 μM</p>	<p>32</p>
<p>Би-нафтильное производное</p>	<p>NSC45576</p>		<p>IC50 (Epac2) 1,7 μM</p>	<p>36</p>
<p>Производное ксантена</p>	<p>NSC119911</p>		<p>IC50 (Epac2) 3,8 μM</p>	<p>36</p>

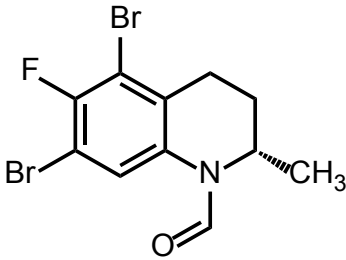
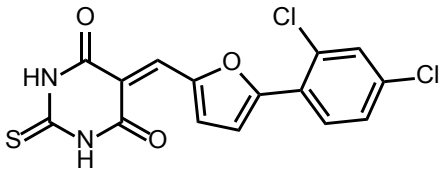
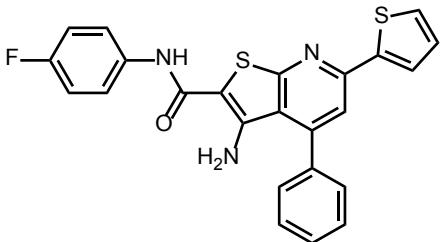
Полициклическое производное	NSC686365		IC50 (Epac2) 7,9 μM	36
Биароматическое дисульфонильное производное	ESI-04		IC50 (Epac2) 25 μM	37
Производные 5-циано-6-оксо-1,6-дигидро-пиримидина	ESI-06		IC50 (Epac2) 25 μM	37
	ESI-08		IC50 (Epac2) 8,4 μM	39
	HJC0198		IC50 (Epac2) 4,0 μM	39
	HJC0197		IC50 (Epac2) 5,9 μM	39



Биароматические сульфонильные производные	ESI-05		IC50 (Epac2) 0,5 μM IC50 (Epac1) > 25 μM	41
	HJC0350		IC50 (Epac2) 0,3 μM IC50 (Epac1) > 25 μM	41
	27		IC50 (Epac2) 0,7 μM	41
	28		IC50 (Epac2) 1,9 μM	41
	33		IC50 (Epac2) 1,2 μM	41
Биароматические азот-содержащие производные	ESI-07		IC50 (Epac2) 25 μM	37
	ESI-10		IC50 (Epac2) 25 μM	37

Биароматические азот-содержащие производные	MAY0132		IC50 (Epac2) 0,4 μM IC50 (Epac1) > 100 μM	41
	HJC0338		IC50 (Epac2) 0,4 μM	42
	A		IC50 (Epac2) 0,5 μM	42
	Б		IC50 (Epac2) 0,4 μM	42
	В		IC50 (Epac2) 0,4 μM	42
Гидразо-нитрильные производные с изоксазольным гетероциклом	ESI-09		IC50 (Epac1) 3,2 μM IC50 (Epac2) 7,0 μM	44
	HJC0726		IC50 (Epac2) 1,9 μM IC50 (Epac1) 2,4 μM	101

Гидразоно- нитрильные производные с изоксазольным гетероциклом	NY0123		IC50 (Epac2) 0,9 μM IC50 (Epac1) 2,4 μM	45
	14		IC50 (Epac2) 2,3 μM IC50 (Epac1) 3,4 μM	46
	26		IC50 (Epac2) 2,2 μM IC50 (Epac1) 3,6 μM	46
	33		IC50 (Epac2) 1,9 μM IC50 (Epac1) 3,1 μM	46
Производные тетрагидрохинолина	CE3F4		EC50 (Epac1) 10,7 μM	48
	R-CE3F4		EC50 (Epac1) 5,8 μM	48

Производные тетрагидрохинолина	S-CE3F4		EC <sub>50</sub> (Eras1) 56 μM	48
Производные тиобарбитуровой кислоты	5376753		IC <sub>50</sub> (Eras1) 4 μM	49
Производные тиено[2,3- <i>b</i> ]пиридинов	AM-001		IC <sub>50</sub> (Eras1) 47,8 μM IC <sub>50</sub> (Eras2) > 1000 μM	21

бора более высокоаффинных структур [39]. Изучение влияния строения заместителей во 2 и 6 положениях пиримидинового цикла с использованием метода молекулярного докинга в программе AutoDock Vina показало, что их наличие является критичным для связывания с белками Eras2. Так, было установлено, что липофильная группа в 6 положении взаимодействует с остатками Phe<sup>367</sup>, Ala<sup>415</sup> и Ala<sup>416</sup> белка, а гидрофобный заместитель во 2 положении – с Leu<sup>406</sup> и Leu<sup>449</sup> [40]. При модификации циклоалканового заместителя в 6 положении пиримидинового цикла ESI-08 путём его уменьшения были созданы соединения HJC-0197 (с циклопентановым циклом) и HJC-0198 (с циклопропановым циклом), продемонстрировавшие более высокое сродство к белкам Eras2, чем прототип (IC<sub>50</sub> 5,9 μM и 4,0 μM, соответственно; ESI-08: 8,4 μM) [39]. При концентрации 25 μM соединение HJC0198 селективно блокировало сАМР-индуцированную активацию белков Eras, но не ингибировало сАМР-опосредованную активацию РКА. В клеточных линиях НЕК293/Eras1 и НЕК293/Eras2 соединение HJC0198 полностью блокировало Eras1- и Eras2-опосредованное фосфорилирование АКТ в концентрации 10 μM.

В работах тех же авторов была предпринята попытка оптимизации структуры биароматических молекул ESI-05 и ESI-10 [41, 42]. С целью поиска более высокоаффинных и селективных соединений ими были проанализированы аналоги этих соединений, полученные заменой или модификацией ароматических групп. В качестве связующего элемента были сохранены сульфонильная или аминогруппы. В случае

модификации сульфонильного производного ESI-05 близкие к прототипу значения аффинности продемонстрировали соединения 27, 28 и 33, в которых 4-метилфенильная группа заменена на 2,4,5-триметилфенильную, 4-метоксифенильную и триптофанильную, соответственно (IC<sub>50</sub> (Eras2) 0,7; 1,9 и 1,2 μM, соответственно) [41]. При замене 4-метилфенильного заместителя в ESI-05 на 2,4-диметилпиррольный было получено соединение HJC0350, показавшее наилучшие характеристики по связыванию с белками Eras2 (IC<sub>50</sub> 0,3 μM) [41], при этом оно не ингибировало белки Eras1-опосредованный обмен нуклеотидов Rap1 и РКА в концентрациях не менее 25 μM, что свидетельствует о селективности соединения HJC0350. В ряду аналогов ESI-05 и ESI-10 с аминной связкой на базе мезидина лучшие результаты показали соединения, содержащие во втором фенильном кольце атомы хлора, метильные группы или трифторметильную группу [42]. Так, 2,5-дихлорфенильное производное HJC0338 имело IC<sub>50</sub> (Eras2) 0,4 μM, 2-метил-3-хлорфенильное производное А и 3-трифторметил-4-хлорфенильное производное Б имели IC<sub>50</sub> (Eras2) 0,5 и 0,4 μM, соответственно. Симметричное соединение В также имело высокое сродство к Eras2 (IC<sub>50</sub> 0,4 μM). Более детальное изучение соединений А и В показало, что эти соединения ингибируют сАМР-опосредованную активность Eras2 при 1 μM и не связываются с Eras1 в концентрациях до 100 μM, что свидетельствует об их высокой селективности [42].

Следует отметить, что при анализе причин селективности биароматических антагонистов белков Eras2 на примере ESI-07 была выдвинута гипотеза,

закрывающаяся в том, что это соединение блокирует белок Ерас2 в его аутоингибирующей конформации, связываясь одновременно с поверхностью двух сАМР-связывающих доменов [43]. Так как у белков Ерас1 только один с-АМФ-связывающий домен, то они не имеют такого сайта связывания, что и является причиной селективности соединения ESI-07.

Производное ESI-09, относящееся к группе изоксазол-содержащих гидразонитрильных соединений, хотя и обладает сродством к обоим изоформам белков Ерас, но в большей степени ингибирует белки Ерас1 ( $IC_{50}$  (Ерас1) 3,2  $\mu$ М;  $IC_{50}$  (Ерас2) 7,0  $\mu$ М) [44]. При этом это соединение обладает выраженной Ерас-селективностью, поскольку не связывается с РКА. Исследования, проведенные с помощью метода молекулярного докинга, позволили установить, что при взаимодействии ESI-09 с сайтом связывания белков Ерас2 трет-бутилизоксазолильная группа образует водородную связь с остатком Gly404 и взаимодействует с гидрофобными остатками Phe<sup>367</sup>, Leu<sup>406</sup>, Ala<sup>407</sup> и Ala<sup>415</sup>, а 3-хлорфенильный фрагмент образует гидрофобные взаимодействия с остатками Val<sup>386</sup>, Val<sup>394</sup> и Leu<sup>397</sup>.

Расширение группы гидразонитрильных производных с целью поиска более перспективных соединений привело к созданию молекул HJC0726 и NY0123, обладающих существенно большей аффинностью по отношению к белкам Ерас2 ( $IC_{50}$  (Ерас2) 1,9  $\mu$ М и 0,9  $\mu$ М, соответственно), отличающихся от прототипа наличием дополнительно одного или двух атомов хлора, соответственно [44, 45]. При этом эти соединения обладали также сродством к белкам Ерас1 ( $IC_{50}$  (Ерас1) 2,4  $\mu$ М). Изучение связи структура – действие показало, что модификация гидразонового линкера, изменение заместителя в изоксазольном цикле или удаление галогенов из фенильного кольца приводит к существенному падению активности [45]. В работе *Ye N с соавт.* более подробно рассмотрена возможность модификации изоксазольного фармакофора и заместителя в фенильном кольце [46]. Было установлено, что при использовании в качестве заместителей в фенильном кольце атома хлора и трифторметильной группы и введение в изоксазольное кольцо фенильного (соединение 14) или фурильного цикла (соединение 26) приводит к высокоаффинным соединениям по отношению как к белкам Ерас1, так и к белкам Ерас2 (для 14:  $IC_{50}$  (Ерас2) 2,3  $\mu$ М,  $IC_{50}$  (Ерас1) 3,4  $\mu$ М; для 26:  $IC_{50}$  (Ерас2) 2,2  $\mu$ М,  $IC_{50}$  (Ерас1) 3,6  $\mu$ М). Кроме того, к обоим изоформам белков Ерас высокую аффинность проявляло соединение 33, в котором изоксазольный цикл сконденсирован с бензольным кольцом ( $IC_{50}$  (Ерас2) 1,9  $\mu$ М,  $IC_{50}$  (Ерас1) 3,1  $\mu$ М). Данные молекулярного докинга позволили установить, что соединение 33 связывается с белком Ерас2 отличным от ESI-09 способом. В его взаимодействиях с Ерас2 преобладают три водородные связи и одна галогеновая связь, включая взаимодействие атома кислорода в бензо[d]изоксазольном фрагменте с

остатком Leu<sup>406</sup>, атома хлора в фенильном фрагменте с остатком Asn<sup>445</sup> и атома азота в цианогруппе линкера с Lys<sup>450</sup>, а также взаимодействие атома водорода линкера с Arg<sup>448</sup> [46].

Ещё одной группой Ерас-ингибиторов явились производные тетрагидрохинолина, выявленные группой *Courilleau D с соавт.* в 2012 году [47] путём высокопроизводительного скрининга библиотеки соединений «chimiothèque essentielle compound library». Данный скрининг был основан на способности белков Ерас катализировать активность нуклеотидного обмена Rap1. Тетрагидрохинолин CE3F4 блокировал Ерас1-индуцированную активацию Rap1 как в бесклеточных, так и в клеточных системах, и не влиял на активность РКА. Позже было установлено, что соединение CE3F4 обладает большей селективностью к белкам Ерас1, чем к белкам Ерас2 [48]. Кроме того, было установлено, что *R*-энантиомер соединения CE3F4 в 10 раз активнее, чем его *S*-энантиомер, который также обладает в 10 раз большей селективностью к белкам Ерас1. Изучение связи структура–активность показало, что наличие галогенов и формильной группы в тетрагидрохинолиновом ядре является необходимым для наличия аффинности по отношению к белкам Ерас1 [48].

С использованием компьютерного молекулярного моделирования *Brown LM с соавт.* было создано производное тиобарбитуровой кислоты – 5376753, которое аллостерически и селективно ингибировало активность белка Ерас1 ( $IC_{50}$  4  $\mu$ М) [49]. По расчётным данным, это соединение имеет сайт связывания на шарнирной области нуклеотид-связывающего домена белка Ерас1. Установлена ключевая роль остатков Trp<sup>283</sup>, Val<sup>337</sup>, Asp<sup>338</sup>, Phe<sup>342</sup> и Arg<sup>336</sup> во взаимодействии соединения 5376753 с этим сайтом связывания.

В 2019 г. были опубликованы результаты исследования *Laudette M с соавт.*, в котором они с использованием метода Ерас1-BRET (биолюминесцентный резонансный перенос энергии) выявили ингибитор белка Ерас1 AM-001, относящийся к группе производных тиено[2,3-*b*]пиридинов, содержащий три ароматических заместителя. Соединение AM-001 не проявляло антагонизма по отношению к белкам Ерас2 и РКА ( $IC_{50}$  (Ерас1) 47,8  $\mu$ М;  $IC_{50}$  (Ерас2) > 1000  $\mu$ М), но предотвращало активацию белков Rap1, инициированную агонистом белков Ерас1 соединением 8-СРТ [21].

Анализируя представленный в литературе набор синтетических антагонистов Ерас1 и Ерас2 можно сделать следующие выводы.

1. Большинство представленных антагонистов Ерас имеет в своей структуре два ароматических ядра, связанных достаточно коротким линкером в 2–6  $\sigma$ -связей, содержащем, как минимум, один гетероатом.

2. У селективных Ерас2 антагонистов два ароматических ядра связаны друг с другом посредством лишь одного гетероатома: азота или серы.

3. По данным метода молекулярного докинга связывание синтетических антагонистов Ерас происходит



либо в месте связывания нативного лиганда cAMP (для обоих подтипов), либо на шарнирной области нуклеотид-связывающего домена белка Epac1 (соединение 5376753), либо одновременно с поверхностью двух cAMP-связывающих доменов Epac2 в его аутоингибирующей конформации (ESI-07 и аналоги). Необходимо указать, что эти гипотезы требуют экспериментального подтверждения.

Вследствие того, что белки Epac являются достаточно новыми молекулярными мишенями на се-

годняшний день получен весьма небольшой набор их антагонистов, который можно отнести к приблизительно десяти химическим подгруппам. В то же время, понимание важнейшей роли белков Epac в биохимических процессах в организме и имеющиеся данные по биологической активности известных синтетических антагонистов Epac свидетельствует об актуальности дальнейшего поиска новых и селективных Epac-антагонистов с целью создания потенциальных лекарственных средств.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Мокров Григорий Владимирович**  
Автор, ответственный за переписку

e-mail: g.mokrov@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-2617-0334  
SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Mokrov Grigory**  
Corresponding author

e-mail: g.mokrov@gmail.com  
ORCID: 0000-0003-2617-0334  
SPIN code: 8755-7666

Candidate of Chemical Sciences, Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Никифорова Татьяна Дмитриевна**

ORCID: 0000-0003-1717-4659  
SPIN-код: 8593-9450

Лаборант-исследователь лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Nikiforova Tatiana**

ORCID: 0000-0003-1717-4659  
SPIN code: 8593-9450

Laboratory assistant-researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Крыжановский Сергей Александрович**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739  
SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., заведующий лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Kryzhanovskii Sergey**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739  
SPIN code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

## Литература / References

- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 1998 Dec;18;282(5397):2275–9. DOI: 10.1126/science.282.5397.2275
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998 Dec 3;396(6710):474–7. DOI: 10.1038/24884
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008 Jul;40(7):651–62. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x
- Banerjee U, Cheng X. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian *rapgef3* gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*. 2015 Oct 10;570(2):157–67. DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.063
- Dao KK, Teigen K, Kopperud R, et al. Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem*. 2006 Jul 28;281(30):21500–11. DOI: 10.1074/jbc.M603116200
- de Rooij J, Rehmann H, van Triest M., et al. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20829–36. DOI: 10.1074/jbc.M001113200
- Laurent AC, Breckler M, Berthouze M, Lezoualc'h F. Role of Epac in brain and heart. *Biochem Soc Trans*. 2012 Feb;40(1):51–7. DOI: 10.1042/BST20110642
- Borland G., Gupta M., Magiera M.M., et al. Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting. *Mol Pharmacol*. 2006 Jan;69(1):374–84. DOI: 10.1124/mol.105.016337
- Gloerich M., Ponsioen B., Vliem M.J., et al. Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins. *Mol Cell Biol*. 2010 Nov;30(22):5421–31. DOI: 10.1128/MCB.00463-10
- Kiermayer S, Biondi RM, Imig J, et al. Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Dec;16(12):5639–48. DOI: 10.1091/mbc.e05-05-0432
- Rehmann H, Rueppel A, Bos JL, Wittinghofer A. Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):23508–14. DOI: 10.1074/jbc.M301680200
- Robichaux WG, Cheng X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):919–1053. DOI: 10.1152/physrev.00025.2017

13. Sehrawat S, Hernandez T, Cullere X, et al. AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):708–18. DOI: 10.1182/blood-2010-02-268870
14. Hong J, Doebele RC, Lingen MW, et al. Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6; 282(27):19781–7. DOI: 10.1074/jbc.M700128200
15. Amano H, Ando K, Minamida S, et al. Adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor *in vivo*. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Nov;87(3):181–188. DOI: 10.1254/jip.87.181
16. Kawano Y, Yoshimura T, Kaibuchi K, Smooth muscle contraction by small GTPase Rho. *Nagoya J Med Sci*. 2002 May;65(1-2):1–8. PMID: 12083286
17. Wang H, Robichaux WG, Wang Z, et al. Inhibition of Epac1 suppresses mitochondrial fission and reduces neointima formation induced by vascular injury. *Sci Rep*. 2016 Nov 10;6:36552. DOI: 10.1038/srep36552
18. Pereira L, Rehmann H, Lao DH, et al. Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Mar 31;112(13):3991–3996. DOI: 10.1073/pnas.1416163112
19. Mangmool S, Hemplueksa P, Parichatikanond W, Chattipakorn N. Epac is required for GLP-1R-mediated inhibition of oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Endocrinol*. 2015 Apr;29(4):583–596. DOI: 10.1210/me.2014-1346
20. Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):645–657. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309859
21. Laudette M, Coluccia A, Sainte-Marie Y, et al. Identification pharmacological inhibitor Epac1 that protects heart against acute and chronic models cardiac stress. *Cardiovasc Res*. 2019 Mar 14. pii: cvz076. DOI: 10.1093/cvr/cvz076
22. Insel PA, Murray F, Yokoyama U, et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(2):447–456. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x
23. Pereira L, Cheng H, Lao DH, et al. Epac2 mediates cardiac  $\beta$ 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak and arrhythmia. *Circulation*. 2013 Feb 26;127(8):913–22. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.12.148619
24. Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, et al. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*. 2002;4:901–906. DOI: 10.1038/ncb874
25. Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, et al. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem*. 2003;278:35394–35402. DOI: 10.1074/jbc.M302179200
26. Dao KK, Teigen K, Kopperud R, et al. Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem*. 2006;281:21500–21511. DOI: 10.1074/jbc.M603116200
27. Schwede F, Bertinetti D, Langerijs CN, et al. Structure-guided design of selective Epac1 and Epac2 agonists. *PLoS Biol*. 2015;13:e1002038.
28. Wang P, Liu Z, Chen H, et al. Exchange proteins directly activated by cAMP (EPACs): Emerging therapeutic targets. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Apr 15;27(8):1633–1639. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.02.065
29. Vliem MJ, Ponsioen B, Schwede F, et al. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue. *ChemBioChem*. 2008;9:2052–2054. DOI: 10.1002/cbic.200800216
30. Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev*. 2013;65:670–709. DOI: 10.1124/pr.110.003707
31. Poppe H, Rybalkin SD, Rehmann H, et al. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods*. 2008;5:277–278. DOI: 10.1038/nmeth0408-277
32. Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, et al. Antidiabetic sulfonylureas and cAMP cooperatively activate Epac2A. *Sci Signal*. 2013 Oct 22;6(298):ra94. DOI: 10.1126/scisignal.2004581
33. Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, et al. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):607–610. DOI: 10.1126/science.1172256
34. Enyeart JA, Liu H, Enyeart J. cAMP analogs and their metabolites enhance TREK-1 mRNA and  $K^{+}$  current expression in adrenocortical cells. *J Mol Pharmacol*. 2010;77:469–482. DOI: 10.1124/mol.109.061861
35. Herfindal L, Nygaard G, Kopperud R, et al. Off-target effect of the Epac agonist 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP on P2Y12 receptors in blood platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437:603–608. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.007
36. Tsalkova T, Mei FC, Cheng X. A fluorescence-based high-throughput assay for the discovery of exchange protein directly activated by cyclic AMP (EPAC) antagonists. *PLoS One*. 2012;7:e30441. [PubMed: 22276201]. DOI: 10.1371/journal.pone.0030441
37. Tsalkova T, Mei FC, Li S, et al. Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:18613–18618. DOI: 10.1073/pnas.1210209109
38. Kraemer A, Rehmann HR, Cool RH, et al. Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *J Mol Biol*. 2001;306:1167–1177. [PubMed: 11237625]. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4444
39. Chen H, Tsalkova T, Mei FC, et al. Zhou 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *J Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:4038–4043. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.082
40. Chen H, Yang Z, Ding C, et al. Fragment-based drug design and identification of HJC0123, a novel orally bioavailable STAT3 inhibitor for cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2013;62:498–507. [PubMed: 23416191] DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.01.023
41. Chen H, Tsalkova T, Chepurny OG, et al. Identification and characterization of small molecules as potent and specific EPAC2 antagonists. *J Med Chem*. 2013;56:952–962. DOI: 10.1021/jm3014162
42. Wild CT, Zhu Y, Na Y, et al. Functionalized N,N-Diphenylamines as Potent and Selective EPAC2 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7:460–464. DOI: 10.1021/acsmchemlett.5b00477
43. Tsalkova T, Mei FC, Li S, et al. Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Nov 6;109(45):18613–8. DOI: 10.1073/pnas.1210209109
44. Chen H, Ding CY, Wild C, et al. Efficient Synthesis of ESI-09, A Novel Non-cyclic Nucleotide EPAC Antagonist. *Tetrahedron Lett*. 2013;54:1546–1549. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.01.024
45. Ye N, Zhu Y, Chen H, et al. Structure-Activity Relationship Studies of Substituted 2-(Isoxazol-3-yl)-2-oxo-N'-phenyl-acetohydrazoneoyl Cyanide Analogues: Identification of Potent Exchange Proteins Directly Activated by cAMP (EPAC) Antagonists. *J Med Chem*. 2015;58(15):6033–6047. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00635
46. Na Ye, Yingmin Zhu, Zhiqing Liu, Fang C. Mei, Haiying Chen, Pingyuan Wang, Xiaodong Cheng, and Jia Zhou. Identification of novel 2-(benzo[d]isoxazol-3-yl)-2-oxo-N-phenylacetohydrazoneoyl cyanide analogues as potent EPAC antagonists. *Eur J Med Chem*. 2017 July 07;134:2–71. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.04.001
47. Courilleau D, Bissierier M, Jullian JC, et al. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem*. 2012;287:44192–44202. DOI: 10.1074/jbc.M112.422956
48. Courilleau D, Bouyssou P, Fischmeister R, et al. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440:443–448. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.107
49. Brown LM, Rogers KE, Aroonsakool N, et al. Allosteric inhibition of Epac: computational modeling and experimental validation to identify allosteric sites and inhibitors. *J Biol Chem*. 2014;289(42):29148–29157. DOI: 10.1074/jbc.M114.569319