

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ильин Иван Сергеевич

**ПОИСК НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ДЛЯ ЗАДАНЫХ БЕЛКОВ-
МИШЕНЕЙ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Специальность 03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2020

Работа выполнена в лаборатории вычислительных систем и прикладных технологий программирования Научно-исследовательского вычислительного центра МГУ имени М.В. Ломоносова и на кафедре фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель **Сулимов Владимир Борисович**
доктор физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты **Тихонов Александр Николаевич**
доктор физико-математических наук, профессор, МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, профессор

Головин Андрей Викторович
доктор химических наук, МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел математических методов в биологии, старший научный сотрудник

Романов Алексей Николаевич
кандидат физико-математических наук, Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова РАН, лаборатория гетерогенного катализа, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «16» ноября 2020 г. в 17.30 на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ЦФА. E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/324005111/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,
кандидат технических наук

А.Э. Сидорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Поиск ингибиторов фактора Ха направлен на выявление новых хемотипов, которые могут стать основой для разработки более безопасных лекарств против тромботических состояний по сравнению с существующими препаратами на основе ингибиторов данного белка. Разработка аллостерических ингибиторов β -лактамаз также является актуальным с точки зрения борьбы с резистентностью бактерий. Воздействие на аллостерический сайт вместо каталитического центра призвано подавить консервативный механизм работы фермента, чтобы предупредить появление мутантных форм, устойчивых к ингибитору. Идентификация ингибиторов работы YB-1 может помочь с разработкой нового класса противоопухолевых агентов, способных излечивать неопластические заболевания, в развитии которых белок YB-1 играет ведущую роль. Центральное место в этих разработках играет суперкомпьютерное молекулярное моделирование, в том числе докинг и квантово-химический метод, которые призваны повысить эффективность разработок.

Степень разработанности избранной темы

На данный момент опубликованы работы, подтверждающие эффективность виртуального скрининга для поиска ингибиторов. Степень разработанности разная для классов соединений, выбранных для разработки в рамках данного исследования. В отечественной литературе нет работ, посвященных идентификации ингибиторов фактора свертывания Ха. На сегодняшний день существуют три лекарства на основе прямых ингибиторов фактора Ха. Однако данные препараты характеризуются большим спектром побочных эффектов, включающим в себя жизнеугрожающие состояния, что подчеркивает необходимость идентификации новых хемотипов с более безопасным профилем. Что касается аллостерических ингибиторов β -лактамаз, то в отечественной литературе есть работа Д.А. Бешновой с соавторами, которая посвящена виртуальному скринингу таких ингибиторов. Однако авторы используют лиганд-ориентированный скрининг, тогда как данная работа предполагает структурно-ориентированный дизайн, что дает возможность более эффективно исследовать химическое пространство, не ограничиваясь областью применимости модели, построенной на основе структур нескольких известных ингибиторов. Кроме

того, пока не существует аллостерических ингибиторов β -лактамаз в виде полноценных лекарств, одобренных к медицинскому применению. Как и в случае поиска ингибиторов фактора Ха, в отечественной литературе нет работ, в которых бы предпринимались попытки идентификации низкомолекулярных лигандов белка YB-1, способных ингибировать его функциональную активность. В мировой литературе есть одно исследование, в ходе которой использование виртуального скрининга позволило идентифицировать такой лиганд. Всего известно три таких лиганда, которые в целом характеризуются небольшим размером и химической простотой. Докинг и методы квантовой химии только начинают широко применяться для разработки ингибиторов заданных белков-мишеней. Особенности этой технологии в значительной степени определяются используемыми методами и программами. В данной работе применяется технология и программы, разработанные в МГУ имени М.В. Ломоносова, а также суперкомпьютерные вычислительные ресурсы, причем последние только начинают применяться в мире для докинга.

Цель исследования. Поиск ингибиторов, влияющих на работу трех терапевтических белков-мишеней: фактор Ха, β -лактамаза TEM-1, белок YB-1 – с использованием виртуального скрининга на основе молекулярного моделирования баз данных органических соединений.

Задачи

1. Построение оптимальной атомистической модели фактора свертывания Ха. Отбор кандидатов в ингибиторы фактора Ха с помощью виртуального скрининга библиотек химических соединений, сочетающего в себе докинг и квантовохимический постпроцессинг.
2. Оценка влияния постпроцессинга на основе полуэмпирического метода PM7 на способность выбранного протокола моделирования предсказывать ингибиторы фактора Ха.
3. Построение атомистической модели β -лактамазы TEM-1. Разработка возможного механизма аллостерического ингибирования этого фермента.
4. Идентификация потенциальных аллостерических ингибиторов β -лактамазы TEM-1 с использованием виртуального скрининга на основе докинга и квантовохимического постпроцессинга.

5. Построение обобщенной модели белка YB-1 на основе нескольких белковых конформации для неявного учета подвижности петлевого участка в районе центра связывания в рамках ансамбль докинга. Проведение процедуры виртуального скрининга на основе докинга и квантовохимического постпроцессинга для предсказания антагонистов перехода YB-1 в ядро клетки.
6. Экспериментальная проверка активности отобранных с помощью моделирования соединений против конкретных белков-мишеней в *in vitro* системе.

Объект и предмет исследований

В данном исследовании объектами выступают три белка в качестве терапевтических мишеней: фактор Ха, β -лактамаза TEM-1 и белок YB-1. Предметом является потенциальные ингибиторы этих белков, выявленные с помощью компьютерного молекулярного моделирования. Таким образом, исследование заключается в проведении процедуры виртуального скрининга с помощью методов докинга и квантовой химии выбранных библиотек химических соединений с целью идентификации молекул, влияющих на активность ряда терапевтически важных белков.

Новизна

Исследована способность разработанного протокола виртуального скрининга, сочетающего докинг с использованием программы SOL и последующее применение квантовохимического полуэмпирического метода, выявлять активные соединения для воздействия на выбранные белки-мишени. С использованием методов молекулярного моделирования впервые найдены новые ингибиторы фактора Ха на основе 1,2,3,4-тетрагидрохинолина. Экспериментально измеренное значение IC_{50} для лучшего найденного ингибитора фактора Ха составило 1.9 мкМ, а один из ингибиторов оказался селективным по отношению к фактору Ха и не оказал влияние на такие гомологически близкие сериновые протеазы, как трипсин, тромбин, фактор XIa и фактор IXa. Впервые разработана теоретическая модель аллостерического ингибирования β -лактамазы TEM-1, подразумевающая воздействие на консервативную область фермента. На основе данной модели идентифицированы потенциальные аллостерические ингибиторы β -лактамазы TEM-1 первые в своем

классе, относящиеся к химической группе гидразидов. Впервые идентифицированы потенциальные лиганды YB-1, относящиеся к производным триазолохиназолинона, которые нацелены на подавление процесса перехода данного белка в ядро клетки. Вещества проявили цитостатическое действие на опухолевых клетках и не влияли на рост нормальных клеток, а также ингибировали переход белка YB-1 в ядро *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Методология приведенного исследования может служить основой при разработке оригинального лекарственного средства. Использование методов молекулярного моделирования может способствовать повышению эффективности поиска молекул-«хитов» и их оптимизации в процессе создания лекарств. Кроме того, использование данных методов позволяет сократить материальные и временные затраты начальной стадии разработки нового лекарственного препарата.

Главная практическая ценность работы – идентификация новых классов ингибиторов таких белков-мишеней как фактор Ха, β -лактамаза TEM-1 и белок YB-1. Найденные структуры ингибиторов могут быть использованы в дальнейшем для получения лидерных соединений в ходе физико-химической оптимизации и проведения дополнительных доклинических испытаний.

Методология диссертационного исследования

Проведенное исследование позволило провести совершенствование методологии виртуального скрининга на основе докинга и квантовохимического постпроцессинга, которая продемонстрировала свою эффективность для выявления экспериментально подтвержденных ингибиторов фактора Ха. Для прогнозирования сродства к белку YB-1 разработана методология применения ансамбль докинга с использованием ансамбля белковых конформаций с их предварительной оптимизацией полуэмпирическим квантовохимическим методом PM7.

Положения, выносимые на защиту

1. Виртуальный скрининг на основе докинга и последующего расчета энтальпии связывания белок-лиганд полуэмпирическим методом PM7 для поиска потенциальных ингибиторов фактора Ха.

2. Влияние постпроцессинга на основе полуэмпирического метода РМ7 и модели растворителя COSMO на точность прогнозирования активности в отношении фактора X_a .
3. Модель аллостерического ингибирования β -лактамазы TEM-1, предполагающая изменение положения консервативного петлевого участка белка. Использование разработанной модели аллостерического ингибирования для поиска аллостерических ингибиторов β -лактамазы TEM-1 с помощью виртуального скрининга на основе докинга и квантовохимического постпроцессинга.
4. Модель домена холодового шока белка YB-1 на основе ансамбля белковых конформаций для поиска антагонистов перехода белка YB-1 в ядро клетки.

Степень достоверности

Степень достоверности следует из корректности постановки задачи и подтверждается тем, что разработанная методика опирается на апробированные процедуры молекулярного моделирования и методы вычислительной химии.

Личный вклад

Диссертант принимал непосредственное участие в сборе и анализе литературных данных, разработке путей решения поставленных задач, разработке белковых моделей для выбранных терапевтических мишеней, разработке механизма аллостерического ингибирования β -лактамазы TEM-1, выполнении виртуального скрининга в программе SOL для выбранных библиотек соединений, уточнении результатов докинга с помощью полуэмпирического метода РМ7 в программе МОРАС, отборе соединений на экспериментальное тестирование, процедуре оптимизации первичных кандидатов в аллостерические ингибиторы β -лактамазы TEM-1, подготовке публикаций, и докладов по теме исследования.

Публикации. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 10 статьях в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, RSCI, Scopus, и в 5 тезисах докладов на конференциях.

Апробация результатов. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на 5 международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 110 страниц текста, включая 23 рисунка и 14 таблиц. Список литературы состоит из 83 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** приводится описание стратегий поиска новых лекарств и общих концепций, характерных для начального этапа разработки лекарственных соединений. Дано сравнение трех главных методов идентификации биологически активных соединений: поиск на основе аналога, *de novo* дизайн и метод скрининга. Показано, что методы скрининга в последнее время становятся доминирующей методологией в поиске новых лекарств на начальном этапе разработки. Приводится сравнение экспериментального скрининга и виртуального скрининга. Описаны основные идеи методологии *in silico* скрининга. Рассмотрена актуальность темы исследования, степень её разработанности, объект, цели и основные задачи диссертационной работы, объект и предмет исследований. Также описана научная новизна работы, её теоретическая и практическая значимость, методология диссертационного исследования. Указаны положения, выносимые на защиту, и приведена степень достоверности и апробация результатов. Наконец, описан личный вклад диссертанта.

В **первом пункте первой главы** вводится понятие мишени в контексте поиска биологически активных соединений и описан общий подход дизайна лекарств на основе ингибиторов ферментов. Подчеркивается, что дизайн начинается с формулировки определенного молекулярного механизма, на основе которого можно достичь изменения активности мишени, участвующей в прогрессировании заболевания. Во **втором пункте** данной главы приводится обзор литературы по фактору Ха и существующим ингибиторам данного белка. Описана основная биохимическая роль фактора Ха и его участие в каскаде свертывания. **Третий пункт** посвящен β -лактамазе TEM-1 и её роли в такой глобальной проблеме здравоохранения как резистентность бактерий. В этом же пункте рассмотрены структурные и функциональные особенности Ω -петли – гибкого участка белка TEM-

1, обеспечивающего его каталитическую активность и являющегося потенциальной мишенью для аллостерического ингибирования β -лактамазы. В четвертом пункте первой главы приводится описание белка YB-1 и его роли в малигнизации. Описан молекулярный механизм воздействия на домен холодового шока этого белка за счет нарушения процесса фосфорилирования и остановки перехода белка YB-1 в ядро клетки.

Во **второй главе** рассматриваются методы виртуального скрининга. В **первом пункте** описаны некоторые примеры мишеней, для которых с помощью виртуального скрининга удалось идентифицировать соответствующие агонисты или антагонисты, а также приводится классификация существующих методов компьютерного поиска биологически активных соединений.

Во **втором пункте** второй главы приведено более подробное описание структурно-ориентированного виртуального скрининга на основе докинга. Рассмотрены отдельные аспекты типичного протокола *in silico* скрининга: подготовка и валидация полноатомной модели мишени, выбор методологии докинга и подготовка химической библиотеки низкомолекулярных соединений.

Третий пункт посвящен понятию комбинированного скрининга, когда после выполнения процедуры докинга выполняется определенный постпроцессинг, направленный на уточнение результатов докинга и снижению ошибки предсказания активности. В качестве примеров приводятся четыре базовых метода постпроцессинга: вычисление топологии комплекса, рескоринг на основе консенсус докинга, метод молекулярной динамики и расчеты на основе полуэмпирических методов квантовой химии.

Четвертый пункт второй главы содержит описание полуэмпирические методов квантовой химии. Описываются основные уравнения, лежащие в основе данной методологии. В частности, в рамках полуэмпирических расчетов орбитальные коэффициенты, необходимые для вычисления волновой функции в приближении ЛКАО, вычисляются с помощью упрощенной формы уравнения Рутаана, в котором игнорируется матрица перекрытия[1]:

$$FC = C\varepsilon, \quad (1)$$

где F , C , – матрица Фока и матрица орбитальных коэффициентов, соответственно. Матрица ϵ является диагональной матрицей, содержащей орбитальные энергии. Для коррекции ошибок, вызванных отсутствием матрицы перекрывания, было разработано несколько семейств полуэмпирических методов, и в этом же пункте второй главы дается история их развития. Описываются детали метода PM7, так как именно он был выбран для выполнения процедуры постпроцессинга.

В пятом пункте второй главы приведен метод постпроцессинга, использовавшийся в данном исследовании. Метод подразумевал расчет энтальпии связывания методом PM7 с учетом эффектов растворителя в рамках континуальной модели COSMO. Энтальпия связывания рассчитывалась согласно уравнению:

$$\Delta H_{bind} = \Delta H_{PL} - (\Delta H_P + \Delta H_L), \quad (2)$$

где ΔH_P , ΔH_L и ΔH_{PL} представляют собой энтальпию образования свободного белка, энтальпию образования свободного лиганда и энтальпию образования комплекса, соответственно.

В третьей главе содержится описание методологии докинга в целом и детали метода докинга, непосредственно использовавшегося в исследовании, в частности. Первый пункт данной главы описывает на примерах существующих программ докинга два главных аспекта данного метода моделирования: алгоритм конформационного поиска и алгоритм скоринг-функции. Приводится классификация существующих скоринг-функций и отдельные уравнения для описания несвязевых взаимодействий, используемых в оценочных функциях на основе силовых полей. Во втором пункте описана программа докинга SOL – основной инструмент для симуляции докинга, использовавшийся в ходе данного исследования. Рассмотрены приближения, используемые в программе и позволяющие ускорить время расчетов и работа генетического алгоритма с описанием процесса генерации первого поколения и аспектов, лежащих в основе формирования следующего поколения, таких как процедура «кроссовера» и «нишинг». Также описана скоринг-функция и её отдельные вклады[2]:

$$\Delta G = \alpha E_{Vdw} + \beta E_{Coulomb} + \beta E_{GB-complex} + \gamma E_{GB-protein} + \delta E_{GB-ligand} + \mu N_{torsions}, \quad (3)$$

где E_{Vdw} и $E_{Coulomb}$ – ван-дер-ваальсовое и электростатическое взаимодействие между белком и лигандом, рассчитываемое, в рамках силового поля

MMFF94; $E_{GB-complex}$, $E_{GB-protein}$, $E_{GB-ligand}$ – отдельные вклады энергии сольватации, рассчитанные, соответственно, для комплекса, белка и лиганда на основе упрощенного метода для обобщенной Борновской модели; $N_{torsions}$ – число торсионных лиганда. Этот вклад добавлен для учёта потери конформационной подвижности лиганда при связывания в качестве энтропийного члена скоринг-функции. Коэффициенты α , β , γ , δ , μ подобраны таким образом, чтобы лучше соответствовать экспериментальным значениям свободной энергии связывания для известных лигандов.

В **четвертой главе** описано применение комбинированного виртуального скрининга на основе докинга и квантовой химии для поиска ингибиторов фактора Ха. **Первый пункт** данного раздела посвящен созданию модели данного белка на основе комплекса 3CEN и валидации созданной модели с помощью кросс-докинга известных ингибиторов. Кроме того, выполнен расчет энтальпии связывания известных ингибиторов фактора Ха для формирования критериев отбора активных молекул против данной мишени.

Первой химической базой данных, где выполнялся поиск ингибиторов фактора Ха, стала сфокусированная библиотека соединений, содержащая 244 соединения и разработанная на основе структур лучших ингибиторов, которые были найдены на предыдущих этапах разработки. Виртуальный скрининг этой базы рассматривается во **втором пункте** четвертой главы. После докинга в программе SOL два класса соединений: производные пиррологидрохинолинона и тетрагидрохинолина, показали лучшие расчетные характеристики, а также положения в активном центре близкие к тем, что показывают известные ингибиторы фактора Ха. Для 40 соединений, лучших по значению скоринг-функции программы SOL, был выполнен расчет энтальпии связывания методом PM7 с помощью программы MOPAC[3]. По результатам моделирования 20 соединений были отобраны на экспериментальное тестирование активности в отношении фактора Ха. Тестирование, выполненное Еленой Николаевной Липец, было основано на амидолитической пробе, в ходе которой оценивалось влияние потенциальных ингибиторов на скорость расщепления хромогенного субстрата фактором Ха, детектируемое с помощью спектрофотометра. Семь из двадцати отобранных кандидатов проявили активность в отношении фактора

Ха в концентрации 30 мкМ. Лучшим ингибитором стало соединение VGY 0224950, полностью подавившее работу белка в данной концентрации. Для этого вещества были сделаны дополнительные измерения, которые позволили определить его значение IC_{50} , которое составило 1.9 мкМ.

В **третьем пункте** четвертой главы рассматривается дополнительный скрининг выборки соединений на основе 2,4-триметил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина – того центрального ядра, которое было обнаружено у VGY 0224950. После отбора на основе докинга экспериментальное тестирование было выполнено для 16 соединений, содержащих данное центральное ядро. Среди них четыре вещества проявили ингибирующее действие в отношении фактора Ха в концентрации 5 мкМ. В этом же пункте описывается отбор кандидатов в ингибиторы с помощью того же протокола моделирования из выборки производных тетрагидрохинолина, извлеченных из полной базы Воронежского государственного университета (ВГУ). Четыре соединений из этой выборки, показавшие удовлетворительные расчетные характеристики и предсказанный профиль связывания, были отобраны на эксперимент. Два соединения заметно ингибировали фактор Ха в концентрации 5 мкМ. Одним из них оказалось соединение VGY 0224989, которое содержит тетрагидрохинолиновый фрагмент конденсированный с пираноном. Экспериментальное значение IC_{50} для VGY 0224989 составило 3 мкМ.

Для двух лучших обнаруженных ингибиторов, VGY 0224950 и VGY 0224989, были выполнены дополнительные эксперименты с другими сериновыми протеазами, являющимися физиологически близкими к фактору Ха, чтобы оценить их селективность. Оказалось, что VGY 0224950 помимо фактора Ха также ингибирует трипсин и фактор XIa, но не влияет на активность тромбина и фактора IXa. При этом VGY 0224989 – селективный ингибитор фактора Ха, не влияющий на активность других протестированных протеаз. Структуры данных ингибиторов, найденных с помощью молекулярного моделирования, приведены на рисунке 1.

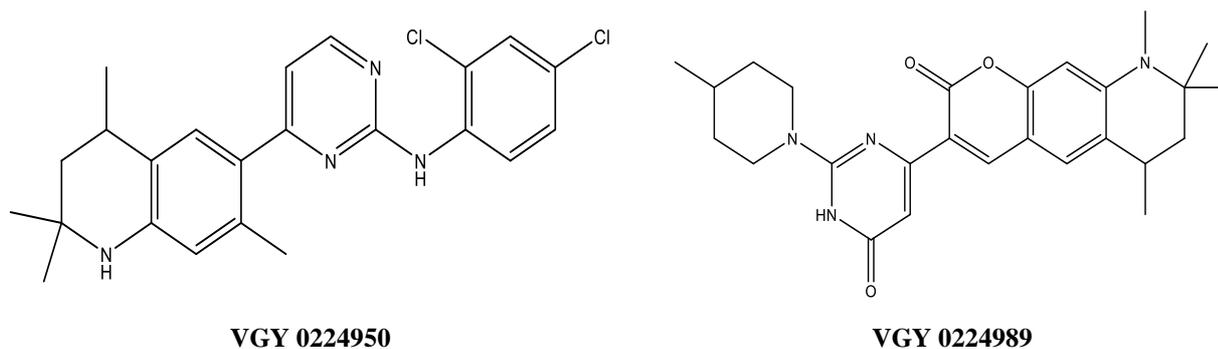


Рисунок 1. Структуры лучших подтвержденных ингибиторов фактора Ха, предсказанных в ходе настоящей работы.

В четвертом пункте приведено сравнение двух методов прогнозирования активности в отношении фактора Ха: только на основе скоринг-функции программы SOL и метод прогнозирования на основе комбинированного подхода – и с учетом скоринг-функции, и с учетом энтальпии связывания, предсказанной методом PM7. Сравнение выполнялось на основе расчетов для выборки из 129 веществ: 28 подтвержденных ингибиторов фактора Ха с микромолярной активностью и 101 соединение с подтвержденным отсутствием активности в отношении фактора Ха в эксперименте. В ходе первого метода предсказания использовался только критерий по скору на уровне -5.3 ккал/моль (соединения со скором ниже, т.е. более отрицательным, -5.3 ккал/моль предполагаются активными). Второй метод подразумевал соединение активным, если оно показывало скор ниже -5.3 ккал/моль и энтальпию связывания ниже -35 ккал/моль. Результаты сравнения показаны в таблице 1.

Таблица 1. Сравнения двух подходов по способности прогнозировать активность в отношении фактора Ха.

Подход	TP	TN	FP	FN	Точность	Чувствительность	Специфичность	F1-мера
SOL	22	34	67	6	43,4%	0,78	0,33	0,376
SOL + энтальпия связывания	16	73	28	12	69%	0,57	0,72	0,444

Из приведенной таблицы видно, что комбинированный подход, учитывающий энтальпию связывания, позволяет сильно снижать долю ложноположительных предсказаний, заметно повышая специфичность отбора, хотя и ценой нескольких

дополнительных ложноотрицательных ошибок. Таким образом, прогнозирование активности на основе и скоринг-функции программы SOL, и энтальпии связывания, рассчитанной методом PM7, оказывается более точным с точки зрения метрики точности и F1-меры. Это, прежде всего, связано с сильным снижением (более чем на 40%) числа ошибок I рода.

Пятая глава посвящена поиску аллостерических ингибиторов β -лактамазы TEM-1 с помощью того же протокола моделирования, который использовался для поиска ингибиторов фактора Ха. В **первом пункте** приведена разработка теоретического механизма ингибирования белка TEM-1 за счет связывания низкомолекулярного соединения внутри полости, образуемой С-концевой частью Ω -петли. Предполагается, что такое связывание может вызвать смещение положения ключевых остатков в N-концевой части (прежде всего, Glu166 и Asn170), ответственных за стадию деацилирования – вторую стадию процесса гидролиза антибиотика. Пространственное отклонение этих остатков может привести к сильному замедлению этой стадии, а значит, катализ будет остановлен на первой стадии, и β -лактамаза будет ингибирована антибиотиком, ковалентно связанным внутри активного центра. Построение полноатомной модели β -лактамазы TEM-1, которая использовалась для прогнозирования сродства лигандов к описанному аллостерическому сайту, было выполнено на основе структуры, взятой из комплекса 1XPВ (разрешение: 1.9 Å).

Второй пункт пятой главы описывает результаты поиска аллостерических ингибиторов белка TEM-1 в базе NCI Diversity set V, содержащей 1593 полочных соединений, отобранных из нескольких десятков тысяч соединений полной химической базы NCI с учетом химического разнообразия. Одно соединение из этой базы оказалось потенциальным лигандом аллостерического сайта белка TEM-1 согласно результатам докинга и квантовохимического постпроцессинга. В этом же разделе был сформулирован молекулярный профиль потенциальных ингибиторов. Была предложена концепция «якорной» группы – структурного мотива возможного ингибитора, которая способна связываться в узком кармане, расположенном на «дне» аллостерического сайта. В **третьем пункте** рассматриваются дополнительные процедуры *in silico* скрининга, выполненные для химической базы ВГУ (15 000 соединений) и библиотеки HitFinder (18 000 соединений). В результате первого

скрининга были отобраны 10 веществ для проверки активности *in vitro*, которые содержали метоксигруппу в качестве якорного фрагмента. Экспериментальное тестирование, проведенное в группе Егорова А.М. Виталием Георгиевичем Григоренко, для всех 10 веществ не выявило соединений, имеющих какое-либо влияние на функциональность белка TEM-1 в растворе. Более того, многие вещества не смогли раствориться в условиях эксперимента. Для нескольких растворившихся веществ была проведена общая оценка их способности связываться с β -лактамазой на основе УФ-спектрометрии, которая подтвердила, что вещества неспособны формировать с ней устойчивые комплексы. Полученные результаты говорят о том, что, во-первых, требуются дополнительные методы оценки влияния лигандов на положение Ω -петли (в идеале – методы молекулярной динамики), и, во-вторых, выбор якорных фрагментов должен фокусироваться на более сложных группах, имеющих повышенное сродство к остаткам внутри полости выбранного сайта связывания. Кроме того, важным следствием экспериментального тестирования является понимание того, какие группы могут быть связаны с хорошим показателем скоринг-функции, однако не влиять на реальное связывание - группы, которые ассоциированы с ложноположительной ошибкой предсказания активности. Виртуальный скрининг для базы HitFinder позволил идентифицировать соединение с новым хемотипом якорной группы. Ей оказался гидразидный мотив, который позволяет соединению в заданном состоянии формировать две водородные связи на «дне» аллостерического сайта: одну с остатком Asp177, другую – с Arg178. В этом же разделе описан дополнительный поиск гидразид-содержащих соединений в библиотеке HitDiscover (53 000 соединений). По результатам моделирования для 284 обнаруженных соединений было предсказано еще два потенциальных лиганда аллостерического сайта. Структуры трех лучших кандидатов в аллостерические ингибиторы β -лактамазы TEM-1 приведены на рисунке 2.

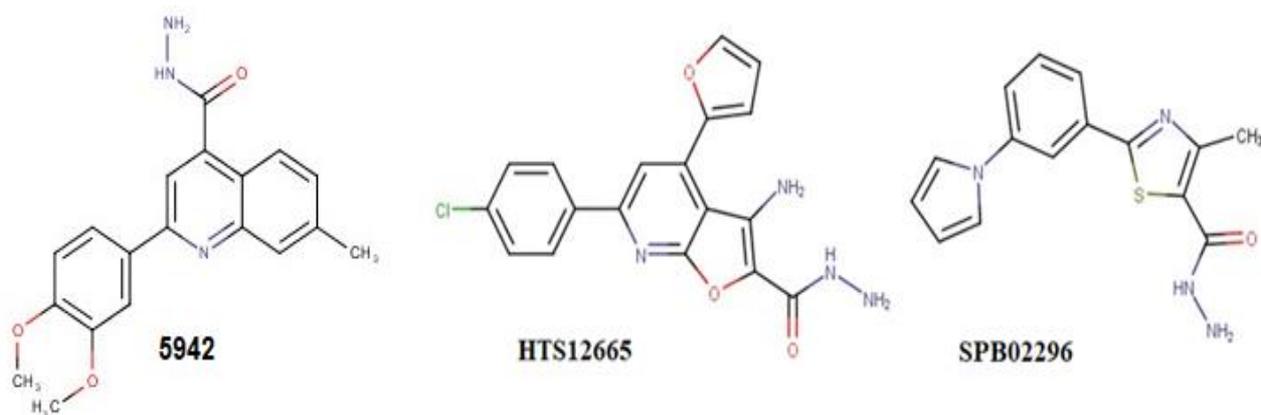


Рисунок 2. Структуры потенциальных ингибиторов β -лактамазы TEM-1, содержащих концевую гидразидную группу.

Четвертый пункт пятой главы посвящен применению молекулярной динамики для проверки аллостерического эффекта лучших предсказанных лигандов. Моделирование выполнялось в группе Егорова А.М. Игорем Владимировичем Упоровым с помощью программы AMBER16. Рассчитанные методом MM-GBSA свободные энергии связывания получились равными -17.2 ккал/моль, -25.8 ккал/моль, -18.2 ккал/моль для соединения 5942, HTS12665 и SPB02296, соответственно. Соединение SPB02296 оказалось способным смещать С-концевую часть Ω -петли белка TEM-1 в растворитель, однако не влияя на положение ключевых для катализа остатков Glu166/Asn170. Структура данного соединения может быть использована в качестве «стартовой точки» для генерации аналогов – потенциальных аллостерических ингибиторов данной мишени. Все три соединения имеют приоритет для тестирования *in vitro*.

Шестая глава посвящена поиску аллостерических антагонистов белка YB-1, ингибирующих процесс перехода данного белка в ядро клетки. В **первом пункте** описан процесс создания модели белка YB-1 для проведения виртуального скрининга. В качестве сайта докинга был выбран сайт фосфорилирования, так как модель ингибирования предполагала, что связывание в данном месте низкомолекулярного соединения должно привести к снижению уровня фосфорилирования YB-1 и нарушить процесс перехода в ядро. Так как выбранный сайт содержал гибкую петлю, то был сгенерирован ансамбль белковых конформаций, призванный неявно учесть подвижность данной петли за счет проведения докинга в разные конформации YB-1, отличающиеся положением петли. Конформации были подготовлены на основе структуры 1N95 с дополнительной оптимизацией геометрии

полуэмпирическим методом РМ7. Отбор полностью оптимизированных и оптимизированных по положению атомов водорода моделей был сделан с помощью докинга известных антагонистов YB-1. Всего было взято 4 конформации для скрининга.

Второй пункт данного раздела содержит описание процесса виртуального скрининга базы ВГУ и небольшой химической библиотеки из 295 соединений, предоставленной Athina Geronikaki (Emeritus professor, Aristotle University of Thessaloniki). По результатам моделирования было отобрано 15 лучших соединений на эксперимент. Экспериментальная часть разработки антагонистов перехода белка YB-1 в ядро рассматривается в **третьем пункте** шестой главы. Проверка активности предсказанных антагонистов YB-1 на клеточной линии карциномы кишечника (HCT-166) с помощью МТТ-теста выполнялась Моисеевой Натальей Ивановной. Эксперимент выявил цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток у четырех соединений: двух производных триазолохиназолинона (VGY 0018645, VGY 0018615), производного дигидрохинолина (VGY 0002274) и соединения на основе 2-аминобензотиазола (AthinaYB1). Выявленное значение IC_{50} составило, соответственно, 44, 5, 16 и 51 мкМ. Для соединений на основе триазолохиназолинона были также проведены дополнительные эксперименты в группе Овчинникова Л.П., направленные на проверку механизма действия. На основе метода флуоресцентной микроскопии определялась локализация YB-1 в клетке без добавления каких-либо соединений и с инкубацией с одним из веществ: актиномицином D (индуктор перехода YB-1 в ядро), физетином (положительный контроль), кверцетином (положительный контроль), VGY 0018645 (исследуемое вещество) и VGY 0018615 (исследуемое вещество). На рисунке 3 показан подсчет количества клеток с разной локализацией YB-1.

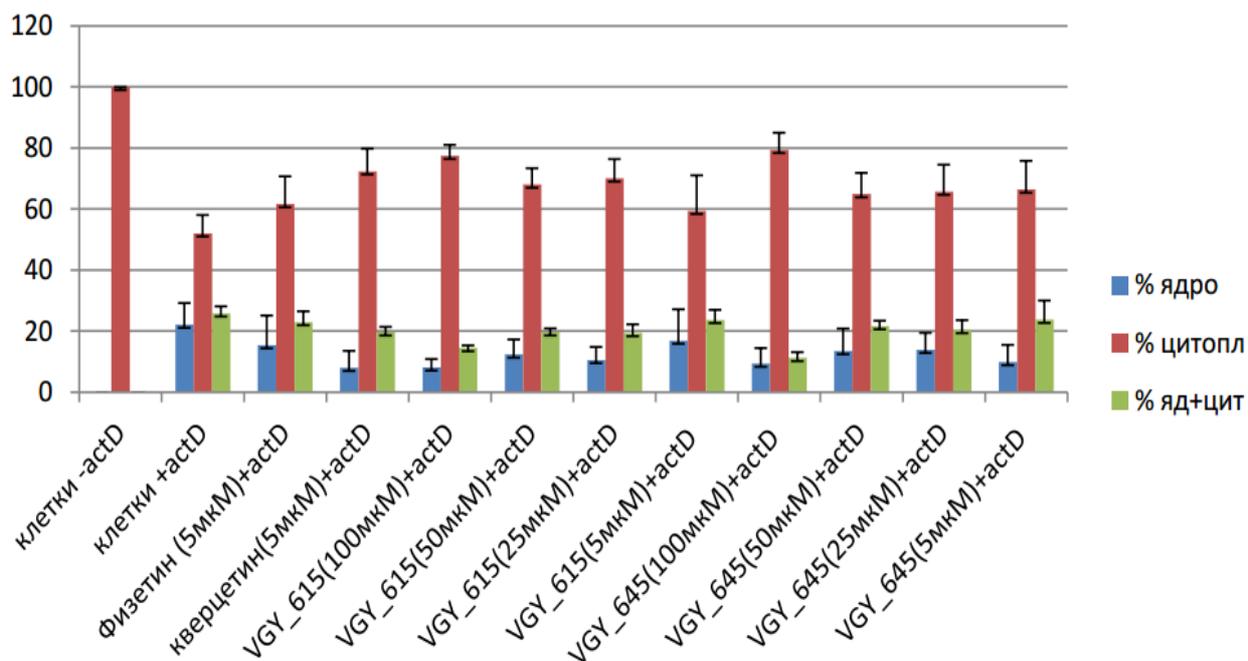


Рисунок 3. Распределение белка YB-1 в клеточных компартментах. Процентное содержание в ядре, цитоплазме и смешанная локализация. Планки погрешности показывают стандартную ошибку, рассчитанную по результатам 3-х повторов.

Согласно подсчетам клеток с разной локализацией YB-1, вещества VGY 0018615 и VGY 0018645 препятствуют переходу белка YB-1 в ядро на уровне физетина и кверцетина, а в некоторых случаях даже лучше. Интересно, что дополнительная проверка зависимости уровня фосфорилирования YB-1 от присутствия исследуемых веществ в клеточной среде не выявило у соединений способности нарушать процесс фосфорилирования этого белка. По-видимому, соединения влияют на более поздние этапы транспорта YB-1 в ядро клетки.

В заключении рассмотрено возможное применение выявленных классов ингибиторов для дальнейшей разработки, а также потенциальное использование разработанного метода виртуального скрининга для поиска новых кандидатов в лекарства.

Тестирование активности в отношении факторов свертывания крови выполнялось в группе Пантелеева М.А. в лаборатории клеточного гемостаза и в лаборатории биофизики НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Соединения из базы ВГУ предоставлены сотрудниками кафедры органической химии ВГУ. Экспериментальное тестирование для предсказанных ингибиторов β-лактамазы и симуляция молекулярной динамики для их комплексов с белком TEM-1 проводилось в группе Егорова А.М. на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ.

Оценка активности предсказанных антагонистов белка YB-1 на опухолевых клетках выполнялась в лаборатории генетики опухолевых клеток НМИЦ имени Н.Н. Блохина. Дополнительная проверка механизма действия подтвержденных противоопухолевых соединений проводилась в Институте белка РАН в группе Овчинникова Л.П.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. С помощью докинга и последующего постпроцессинга с использованием квантовохимического метода отобран новый класс ингибиторов фактора свертываемости крови Ха на основе 2,2,4-триметил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина.
2. Применение постпроцессинга на основе полуэмпирического метода RM7 и модели растворителя COSMO более чем на 40% снижает число ложноположительных предсказаний при прогнозировании активности в отношении фактора Ха.
3. Разработана теоретическая модель аллостерического ингибирования β -лактамазы TEM-1. Модель подразумевает воздействие на консервативную часть фермента – Ω -петлю, которая играет ключевую роль для каталитической активности данного фермента.
4. На основе виртуального скрининга, сочетающего докинг и последующий квантовохимический постпроцессинг, идентифицированы три гидразид-содержащих кандидата в аллостерические ингибиторы β -лактамазы TEM-1.
5. На основе докинга с использованием ансамбля белковых конформаций отобраны молекулы, связывающиеся с доменом холодового шока белка YB-1 *in silico*.
6. Выполнено лабораторное подтверждение активности. Для 12 из 40 предсказанных ингибиторов фактора Ха наблюдалось ингибирование данного фермента в концентрации 5 и 30 мкМ. Значение IC_{50} для лучшего ингибитора фактора Ха составило 3 мкМ. Это соединение оказалось селективным ингибитором фактора Ха и не влияло на активность трипсина, тромбина, фактора IXa и фактора XIa. Четыре соединения из 15 предсказанных антагонистов процесса перехода YB-1 в ядро клетки проявили противоопухолевое действие на клеточных культурах. Значение IC_{50} для лучшего из выявленных веществ составило 5 мкМ.

Дополнительные эксперименты для двух соединений подтвердили их способность затруднять переход белка YB-1 в ядро.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в журналах,
индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:**

1. **Ilin Ivan**, Lipets Elena, Sulimov Alexey, Kutov Danil et al. New factor Xa inhibitors based on 1,2,3,4-tetrahydroquinoline developed by molecular modelling // Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2019. Vol. 89. N. June 2019. pp. 215-224. Импакт-фактор по WoS 1,863
2. Sulimov Alexey, Kutov Danil, Katkova Ekaterina, **Ilin Ivan**, Sulimov Vladimir. New generation of docking programs: Supercomputer validation of force fields and quantum-chemical methods for docking // Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2017. Vol.78 N. November 2017. pp. 139-147. Импакт-фактор по WoS 1,863
3. Novichikhina N., **Ilin I.**, Tashchilova A., Sulimov A. Synthesis, Docking, and In Vitro Anticoagulant Activity Assay of Hybrid Derivatives of Pyrrolo[3,2,1-ij]Quinolin-2(1H)-one as New Inhibitors of Factor Xa and Factor XIa // Molecules. 2020. Vol. 25. N. 8. pp. 1889-1889. Импакт-фактор по WoS 3,06
4. Sulimov A.V., Kutov D., **Ilin I.**, Zheltkov D. et al. Supercomputer docking with a large number of degrees of freedom // SAR and QSAR in Environmental Research. 2019. Vol. 30. N. 10. pp. 733-749. Импакт-фактор по WoS 2,287
5. Sulimov A.V., Kutov D.K., **Ilin I.S.**, Sulimov V.B. Docking with combined use of a force field and a quantum-chemical method // Biomeditsinskaya Khimiya. 2019. Vol. 65. N. 2, pp. 80-85. Импакт-фактор по Scopus (SJR) 0,24
6. Sulimov V.B., **Ilin I.S.**, Kutov D.C., Sulimov A.V. Development of docking programs for Lomonosov supercomputer // Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry. 2020. Vol. 7, N. 1, pp. 259-276. Импакт-фактор по Scopus (SJR) 0,22
7. Alexey Sulimov, Danil Kutov, Anna Gribkova, **Ivan Ilin** et al. Search for Approaches to Supercomputer Quantum-Chemical Docking // *Russian Supercomputing Days*. 2019. Vol. 1129. pp. 363-378. Импакт-фактор по Scopus (SJR) 0,19

8. Сулимов А.В., Кутов Д.К., Тащилова А.С., **Ильин И.С.** и др. Современные методы разработки новых лекарственных средств, влияющих на систему гемостаза, журнал - Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019 г. Импакт-фактор (РИНЦ) = 0,26
9. Подоплелова Н.А., Сулимов В.Б., Тащилова А.С., **Ильин И.С.** и др. Свертывание крови в XXI-м веке: новые знания, методы и перспективы для терапии, журнал - Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2019 г. Импакт-фактор (РИНЦ) = 0,26
10. Сулимов А.В., Кутов Д.К., **Ильин И.С.**, Шихалиев Х.С. и др. Докинг олигопептидов, журнал - *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2019 г. Импакт-фактор по WoS 0,423

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА МЕЖДУНАРОДНЫХ И ВСЕРОССИЙСКИХ
НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ, опубликованные в журналах:**

1. Ilin I., Moiseeva N., Shikhaliev K., Tarasov A. et al. «Search for the new class of anticancer drugs on the basis of yb-1 cold shock domain inhibitors» в сборнике *XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry. Book of abstracts in 6 volumes, серия Book 6. Satellite symposia*, том 6, тезисы, с. 68-68. 2019 г.
2. Ильин И.С., Липец Е.Н., Сулимов А.В., Кутов Д.К. и др. «Разработка новых антикоагулянтов с использованием методов молекулярного моделирования ингибиторов белков системы свертывания крови» в сборнике *Сборник материалов XXV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов/ Главный редактор Чучалин А.Г, серия Секция "Разработка и создание новых лекарственных препаратов"*, с. 69-70. 2018 г.
3. Vladimir Sulimov, Alexey Sulimov, Danil Kutov, Ivan Ilin. «Development of docking programs for Iomonosov supercomputer» в сборнике *Asian Federation of Medicinal Chemistry 12th International Medicinal Chemistry Symposium 2019*
4. Sulimov A.V., Kutov D.K., Ilin I.S., Zheltkov D. «Supercomputer docking with a large number of degrees of freedom» в сборнике *10th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources СМТПИ-2019*, тезисы, с. 24-24, 2019 г.

5. Сулимов А.В., Кутов Д.К., Ильин И.С., Сулимов В.Б. «Суперкомпьютерный докинг: численные эксперименты» в сборнике *Сборник материалов XXVI Российский национальный конгресс "Человек и Лекарство"*. Тезисы докладов, с. 88-88, 2019 г.

СПИСОК КОНФЕРЕНЦИЙ, НА КОТОРЫХ БЫЛИ ДОЛОЖЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ДАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ:

1. XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, г. Санкт-Петербург, Россия, 9-13 сентября 2019. Доклад «Search for the new class of anticancer drugs on the basis of yb-1 cold shock domain inhibitors»
2. Ломоносовские чтения – 2019. Секция «НИВЦ», Москва, Россия, 15-25 апреля 2019. Доклад «Разработка ингибиторов белка YB-1 – нового класса противоопухолевых лекарств»
3. Ломоносовские чтения – 2018. Секция «Вычислительная математика и кибернетика», Москва, Россия, 16-27 апреля 2018. Доклад «Новые синтетические антикоагулянты: молекулярное моделирование и экспериментальная проверка»
4. XXV Российский национальный конгресс "Человек и лекарство", Москва, Россия, 9-12 апреля 2018. Доклад «Разработка новых антикоагулянтов с использованием методов молекулярного моделирования ингибиторов белков системы свертывания крови»
5. XXVII Российский национальный конгресс "Человек и лекарство", Москва, Россия, 6-9 апреля 2020 (онлайн). Доклад «Компьютерное моделирование аллостерических ингибиторов бета-лактамазы TEM-1»

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christensen A.S., Kubař T., Cui Q., Elstner M. Semiempirical Quantum Mechanical Methods for Noncovalent Interactions for Chemical and Biochemical Applications // Chem. Rev. American Chemical Society, 2016. Vol. 116, № 9. P. 5301–5337.
2. Романов А.Н., Кондакова О.А., Григорьев Ф.В., Сулимов А.В., Луцкекина С.В., Мартынов Я.Б., Сулимов В.Б. Компьютерный дизайн лекарственных средств: программа докинга SOL // Вычислительные методы и программирование. 2008.

Vol. 9, № 2. P. 213–233.

3. Stewart J.J.P. Stewart Computational Chemistry. MOPAC2016 [Electronic resource]. Colorado Springs, CO, USA, 2016. URL: <http://openmopac.net/MOPAC2016.html> (accessed: 30.07.2020).