

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки, специальности)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль) / специализация)

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Молекулярный докинг ингибиторов Rho-киназы

Студент

Д.Д. Горбунова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

д.х.н., доцент, З.П. Белоусова

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Тольятти 2022

Аннотация

Целью данного исследования является анализ режимов связывания существующих ингибиторов ROCK1/2, конструирование и дизайн нового типа ингибиторов на основе полученных данных в программном обеспечении Schrödinger. Мутация в сигнальном пути Rho-киназы встречается в некоторых видах рака и патологий сердца.

В литературном обзоре был описан сигнальный Rho-киназы, ее строение. Большое внимание было уделено ингибиторам ROCK, разработанных за последние 10 лет.

В экспериментальной части описана методика проведенных расчетных исследований, заключающаяся в подборе кристаллических структур, загрузке этих структур в программу Maestro (программный пакет Schrodinger Suite), подготовке структур, а также в нативном и молекулярном докинге.

На основе литературного обзора были сделаны выводы о перспективности разработки ингибиторов тиазоло-пиперазинового типа. Анализ результатов молекулярного докинга проводился с помощью оценочной функции Glide с использованием протокола дополнительной точности (XP).

Работа изложена на 63 страницах, содержит 34 рисунка, 15 таблиц и приложение.

Abstract

The title of the graduation work is Molecular docking inhibitors of Rho-associated kinase.

The graduation work consists of an explanatory note, three parts, including 63 pages, 34 figures, 15 tables, the list of 37 references including 36 foreign sources.

The key issue in the thesis is the possibility of using 4-pyridine-containing piperazino-thiazoles as a new chemotype of Rho-associated kinase inhibitors.

The aim of this work is to search for new structural types of ROCK inhibitors and their design in Schrödinger software.

The object of the senior project is inhibitors of ROCK. Dysregulation of the Rho-mediated signaling pathway is common in cardiac pathologies and cancers.

The subject of the graduation project is molecular docking inhibitors of ROCK.

We first describe in details the mechanism of Rho-kinase action, then we study and analyze the structural features of existing ROCK inhibitors, and then we discuss such molecular design methods as docking and scoring functions.

Next we describe the methodology of protein structures search and preparation, docking. Here we concentrate on the principles of constructing a virtual combinatorial library of inhibitors based on 2-piperazino-4-(pyridin-4-yl)-thiazoles. This part describes the study of ultra-precise molecular docking (XP) for the developed compound library and the results of the study performed.

Finally, we present all experimental information about docking assay protocols. Based on the data obtained, the lead compound is found.

In conclusion we'd like to stress the hypothesis about the thiazol-piperazine motif being a promising scaffold as an inhibitor of ROCK is confirmed. The structure found during docking to be the most effective as a ROCK inhibitor is an excellent candidate for further optimization.

Содержание

Введение	7
1 Литературный обзор.....	9
1.1 Активный сайт ROCK I/II.....	11
1.2 Сигнальный путь ROCK I/II	13
1.3 Ингибиторы Rho-киназ на основе изохинолина.....	14
1.4 Ингибиторы Rho-киназ на основе пиридина	17
1.5 Ингибиторы Rho-киназ на основе пиразола	18
1.6 Ингибиторы Rho-киназ на основе тиазола.....	22
1.7 Ингибиторы Rho-киназ на основе 7-азаиндола	30
1.8 Ингибиторы Rho-киназ на основе хинозолинона.....	32
2 Результаты и их обсуждение	39
2.1 Выбор белковой мишени	39
2.2 Подготовка структур.....	40
2.3 Оценочные функции	40
2.4 Анализ результатов нативного докинга.....	42
2.5 Идентификация ключевых паттернов связывания	42
2.6 Докинг комбинаторной библиотеки.....	50
3 Экспериментальная часть	58
3.1 Подготовка молекулы белка	58
3.2 Нативный докинг.....	58
3.3 Подготовка комбинаторной библиотеки.....	58
3.4 Молекулярный докинг	59
Заключение	60
Список используемой литературы	61
Приложение А Результаты нативного и молекулярного докинга	65

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

АТФ	аденозинтрифосфат;
DFG-in	три аминокислотных остатка Asp-Phe-Gly;
CaM	кальций/кальмодулин;
CRD	богатый цистеином домен;
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов;
GDP	гуанозиндифосфат;
GPCR	рецептор, связанный с G-белком;
GTP	гуанозинтрифосфат;
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования;
K _i	константа ингибирования;
MBS	миозин-связывающая субъединица;
MLC	легкая цепь миозина;
MLCP	фосфатаза легкой цепи миозина;
PDB	банк данных трёхмерных структур белков;
RH	домен гомологии Плекстрина;
Ras	семейство малых ГТФаз, кодируемые одноименными генами.
Rab	семейство белков является членом Ras надсемейства малых G белков;
Ran	ГТФ-связывающий белок Ран;
RBD	Rho-связывающий домен;
Rho	семейство небольших сигнальных G-белков;
Rho-GAP	белок, активирующий ГТФазу Rho;

Rho-GDI	ингибитор диссоциации гуанина Rho;
Rho-GEF	фактор обмена гуаниновых нуклеотидов;
RMSD	среднеквадратичное отклонение;
ROCK	Rho-киназа;
SAR	соотношение структура-активность;
SP	протокол докинга со стандартной точностью;
VS	виртуальный скрининг;
XP	протокол докинга с высокой точностью.

Введение

На сегодняшний день одним из главных направлений современной медицинской химии является поиск и разработка низкомолекулярных органических соединений, способных к ингибированию протеинказ. Примерами таких структур могут послужить высокоэффективные ингибиторы Rho-киназы, которая реализует свои функции практически во всех клетках организма, несмотря на разнообразие протекающих в них процессов.

Мультифункциональность ROCK обусловлена, прежде всего, ее влиянием на организацию цитоскелета. Высокая активность ROCK характерна для пролиферирующих и мигрирующих клеток. В дифференцированных клетках ROCK участвует в регуляции специфических клеточных функций, таких как гладкомышечное сокращение или эндотелиальная секреция. Увеличение активности ROCK приводит к повышению тонуса сосудов, что создает риск нарушения кровоснабжения жизненно важных органов и повышения артериального давления с последующим развитием таких серьезных осложнений, как инсульт головного мозга, инфаркт миокарда, отек легких. Активность киназы включается, когда Rho-GTP связывается с Rho-связывающим доменом ROCK, нарушая аутоингибирующее взаимодействие внутри ROCK, которое высвобождает киназный домен, потому что ROCK больше не сворачивается внутримолекулярно [1].

Rho-киназа, одна из наиболее известных представителей семейства серин/треониновых протеинкиназ [2], является эффектором для GTPазы Rho. Ингибиторы Rho-киназы являются потенциальными терапевтическими агентами для лечения различных заболеваний, включая гипертензию, глаукому [3], эректильную дисфункцию и онкологические заболевания [4]. ROCK- важный регулятор клеточного роста, миграции, метаболизма и апоптоза. ROCK имеет две изоформы: ROCK-I и ROCK-II, которые являются

высокоомологичными. ROCK-I в основном экспрессируется в легких , печени , селезенке , почках и яичках . Однако ROCK-II распространяется в основном в головном мозге и сердце [5].

Цель работы:

Анализ структурных закономерностей связывания существующих ингибиторов ROCK1/2 и поиск новых типов, их конструирование.

Задачи:

1. подбор, ранжирование и подготовка белковых структур;
2. анализ особенностей связывания существующих ингибиторов ROCK;
3. конструирование виртуальной библиотеки ингибиторов ROCK;
4. молекулярный докинг и анализ его результатов.

1 Литературный обзор

Известно, что киназы ROCK-I и ROCK-II являются высококонсервативными, особенно в их киназном домене (92%) и активном центре. Это в значительной степени влияет на селективность ингибитора между двумя изоформами киназы. Они имеют только 20 различных остатков, семь из которых являются гомологичными заменами (рисунок 1 – А и В). Следовательно, их вклад в селективность ингибитора будет ограничен и будет связан только с косвенным аллостерическим эффектом, а не с прямым несвязанным взаимодействием. Значение RMSD между двумя доменами киназы составляет всего 1.4 Å, которое дополнительно снижается до 0.18 Å относительно активного центра. Активный центр обеих киназ состоит из 17 аминокислотных остатков; их конфигурации боковых цепей вполне согласуются между двумя киназами (с небольшими вариациями в некоторых атомах и группах) [6].

Rho-киназы повсеместно экспрессируются в большинстве тканей; однако ROCK-I экспрессируется преимущественно в ненервных тканях, таких как легкие, печень, селезенка, почки и яички, тогда как ROCK-II обогащен в мозге и сердце [7]. Предполагается, что ROCK-I и ROCK-II выполняют одни и те же функции, но недавние исследования показали, что они играют разные роли в клетках [8,9].

Путь ROCK является ключевым молекулярным переключателем для многих разнообразных клеточных процессов, участвующих в повышении риска и ухудшении исхода неврологических расстройств. Клинически ингибирование ROCK было признано привлекательной терапевтической стратегией для лечения болезни Альцгеймера, цереброваскулярной дисфункции и острого ишемического/геморрагического инсульта [10,11].

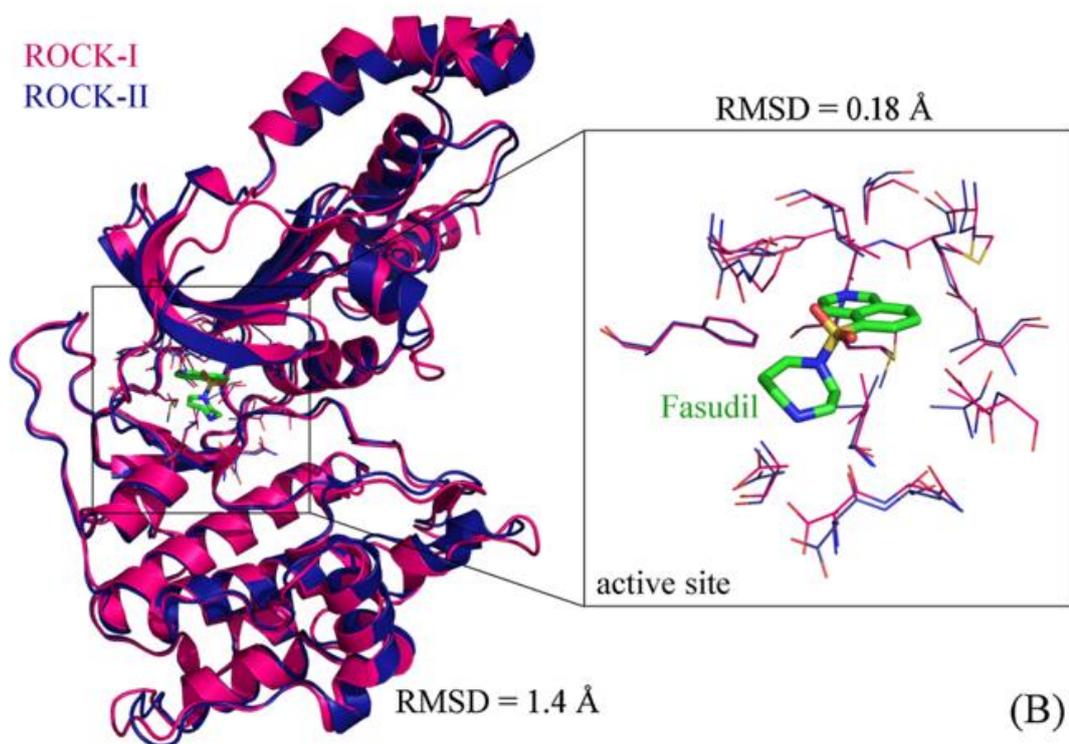
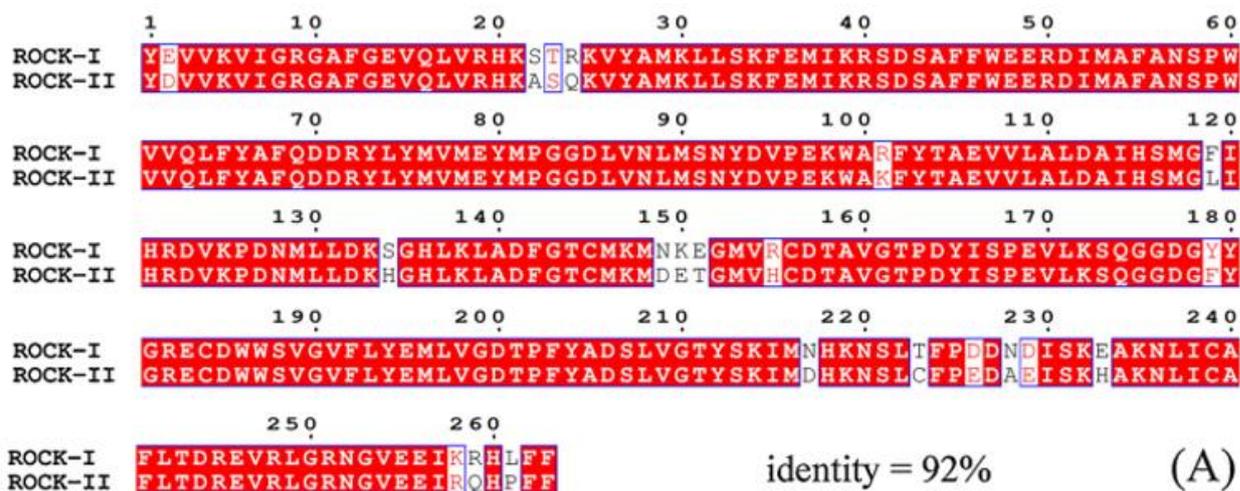


Рисунок 1 – Выравнивание аминокислотных последовательностей (A) и наложение структур (B) между киназными доменами для изоформ ROCK-I и ROCK-II

1.1 Активный сайт ROCK I/II

Деятельность ROCK регулируется нарушением внутримолекулярного аутоингибирования. В целом, структура белков ROCK состоит из N-концевого киназного домена, спиральной области и PH-домена, содержащего богатый цистеином домен (CRD) на C-конце. Rho-связывающий домен (RBD) расположен в непосредственной близости от PH-домена [12]. Киназная активность ингибируется внутримолекулярной связью между C-концевым кластером домена RBD и доменом PH с N-концевым киназным доменом ROCK (на рисунке 2 - А). Таким образом, киназная активность отключается при внутримолекулярном сворачивании ROCK. Киназная активность включается, когда Rho-GTP привязывается к Rho-связывающему домену ROCK, нарушая аутоингибирующее взаимодействие внутри ROCK, так как ROCK в этом случае больше не складывается внутримолекулярно [13, 14].

АТФ-связывающий карман ROCK окружен N-концевой и C-концевой долями, а сайт связывания в форме бороздки формируется на границе этих двух долей. Кроме того, он окружен шарнирной областью, богатой глицином петлей и петлей активации (рисунок 2 - В). АТФ-связывающий карман ROCK имеет три области: область аденина (область А), область фуранозы (область F) и дистальную область (область D). Адениновая область расположена на дне кармана и является гидрофобной. Между адениновой областью и адениновым кольцом АТФ существует водородная связь. Над областью аденина находится область сферической формы, область фуранозы, которая также является гидрофобной, и фуранозное кольцо АТФ может здесь связываться. Последняя - это дистальная область, в которой находится группа пиррофосфорной кислоты АТФ. Часть нуклеотид-связывающей петли также способствует определению формы дистальной области. Эта область открыта для молекулярной поверхности ROCK.

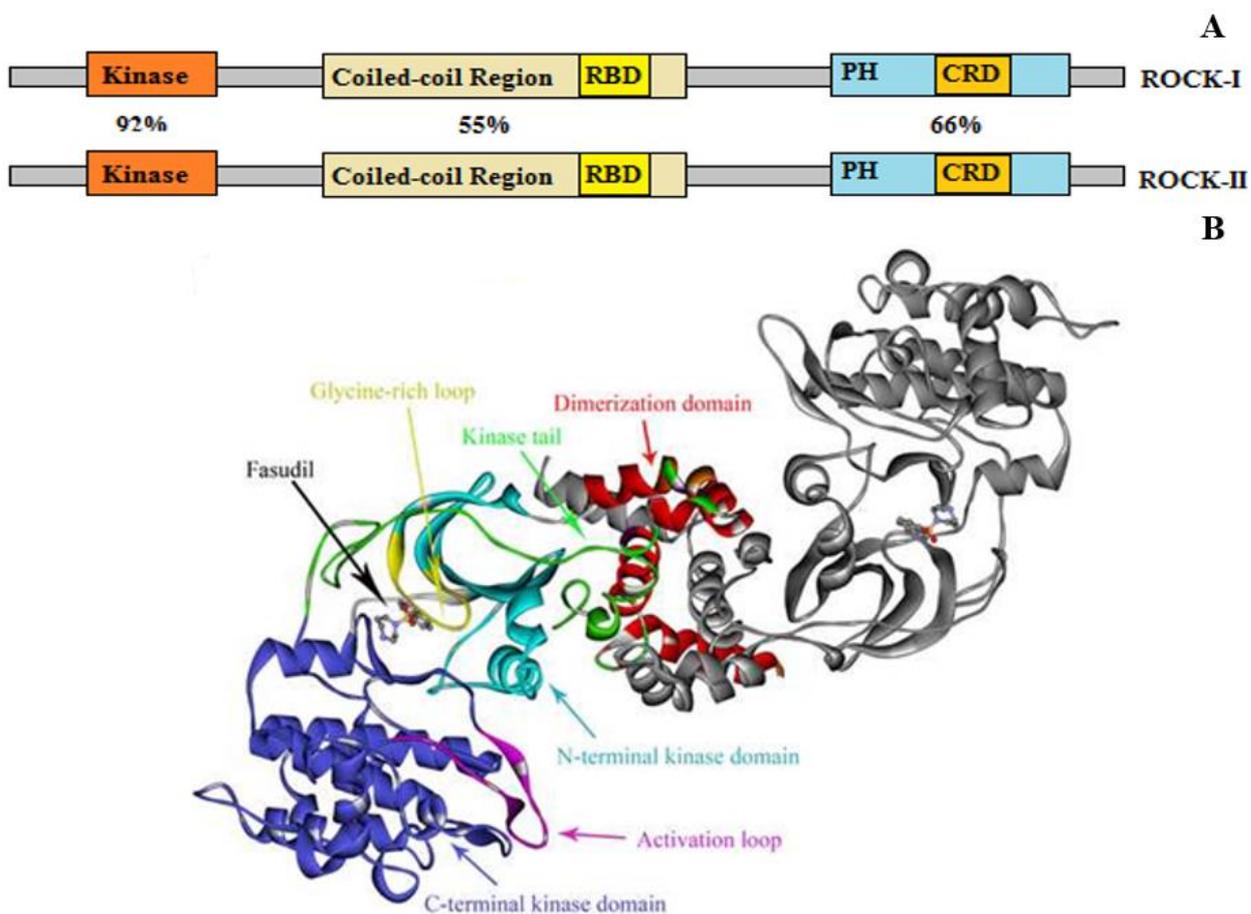


Рисунок 2 – Структуры ROCK (А) Функциональные домены ROCK-I и ROCK-II. (Б) Структура кармана для связывания ROCK-I с фасудилом

Общая структура димера показана в виде ленточной диаграммы. Один мономер окрашен в серый цвет. С-концевой домен киназы выделен синим цветом, а петля активации - розовым. N-концевой домен киназы показан голубым, а богатая глицином петля - желтым. Шарнирная область (светло-серый) не обозначена на рисунке и соединяет С-концевой и N-концевой киназный домен. Фасудил располагается в активном кармане рядом с шарнирной областью и петлей, богатой глицином.

1.2 Сигнальный путь ROCK I/II

Семейства малых G-белков, таких как Rho, Ras, Rab и Ran, в значительной степени участвуют во внутриклеточной сигнализации. Члены семейства Rho, включая Rho, Rac и Cdc42, регулируют как реорганизацию цитоскелета, так и экспрессию генов. Эффекторные домены RhoA, RhoB и RhoC (в совокупности, называемые здесь "Rho"). Как и другие Rho GTPases, Rho действует как молекулярный переключатель, циклически переключаясь между активным GTP-связанным состоянием и неактивным GDP-связанным состоянием. Обмен между активным и неактивным состояниями регулируется несколькими регуляторными белками, такими как ингибитор диссоциации гуанина, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов и белок, активирующий GTPase. В нестимулированных клетках Rho находится преимущественно в цитозоле в своей неактивной форме, связанной с GDP, а ингибитор диссоциации Rho-гуанина связывается с Rho-GDP и извлекает его из мембраны в цитозоль. Когда клетки стимулируются определенными агонистами, Rho-GDP превращается в Rho-GTP под действием Rho GEF. Затем Rho-GTP направляется на клеточную мембрану, где он взаимодействует со своими специфическими мишенями (рисунок 3). Белок, активирующий GTPase Rho, инактивирует Rho путем дефосфорилирования GTP в GDP. Лучшее всего охарактеризованным нижестоящим эффектором Rho является ROCK, который обеспечивает различные клеточные функции. Активированный ROCK фосфорилирует различные нижестоящие мишени, включая MBS MLCP. Фосфорилирование MBS ингибирует активность MLCP, что приводит к увеличению фосфорилирования MLC и активации актомиозина.

Путь Rho/ROCK является основным регулятором сокращения гладкомышечных клеток сосудов и играет важную роль в контроле миграции, пролиферации, дифференцировки, апоптоза, выживания и транскрипции генов. Основным медиатором сокращения гладкой

мускулатуры является фосфорилирование и дефосфорилирование легкой цепи миозина. MLC фосфорилируется Ca^{2+} -кальмодулин-активированной MLC-киназой и дефосфорилируется Ca^{2+} -независимой MLCP. Фосфорилирование и ингибирование MLCP ROCK увеличивает фосфорилирование MLC и сокращение клеток, облегчая взаимодействие миозина с F-актином (рисунок 3). Это опосредованное ROCK сокращение может происходить независимо от внутриклеточных изменений Ca^{2+} и известно, как сенсibilизация Ca^{2+} [16].

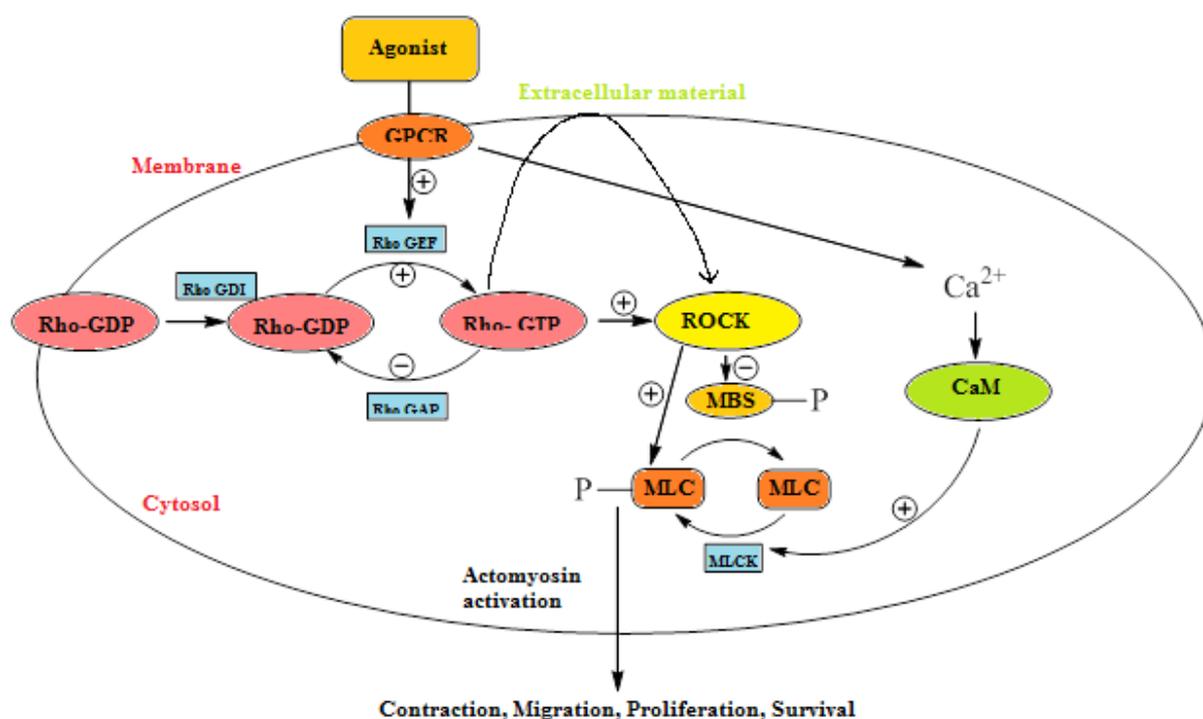


Рисунок 3 – Сигнальный путь Rho-GDP – Rho-GTP от мембраны к цитозолу

1.3 Ингибиторы Rho-киназ на основе изохинолина

Фасудил (рисунок 4 – А; также называемый HA1077) **1** состоит из изохинолина и гомопиперазинового кольца, соединенных сульфонильной группой. Фасудил, ингибирует ROCK посредством нацеливания на АТФ-зависимый домен киназы (рисунок 4 - В). В настоящее время фасудил

является единственным ингибитором ROCK, одобренным для использования FDA, обладает значительным сосудорасширяющим действием и проходит клинические испытания для лечения ишемической болезни сердца [17,18]. Некоторые данные показывают, что фасудил и его аналоги могут использоваться для лечения болезни Альцгеймера [19].

Некоторые исследования продемонстрировали более широкий спектр функций ROCK. Эти результаты показали, что ингибиторы ROCK могут быть лекарствами-кандидатами для лечения рака, воздействуя на стромальные, а не на опухолевые клетки [20].

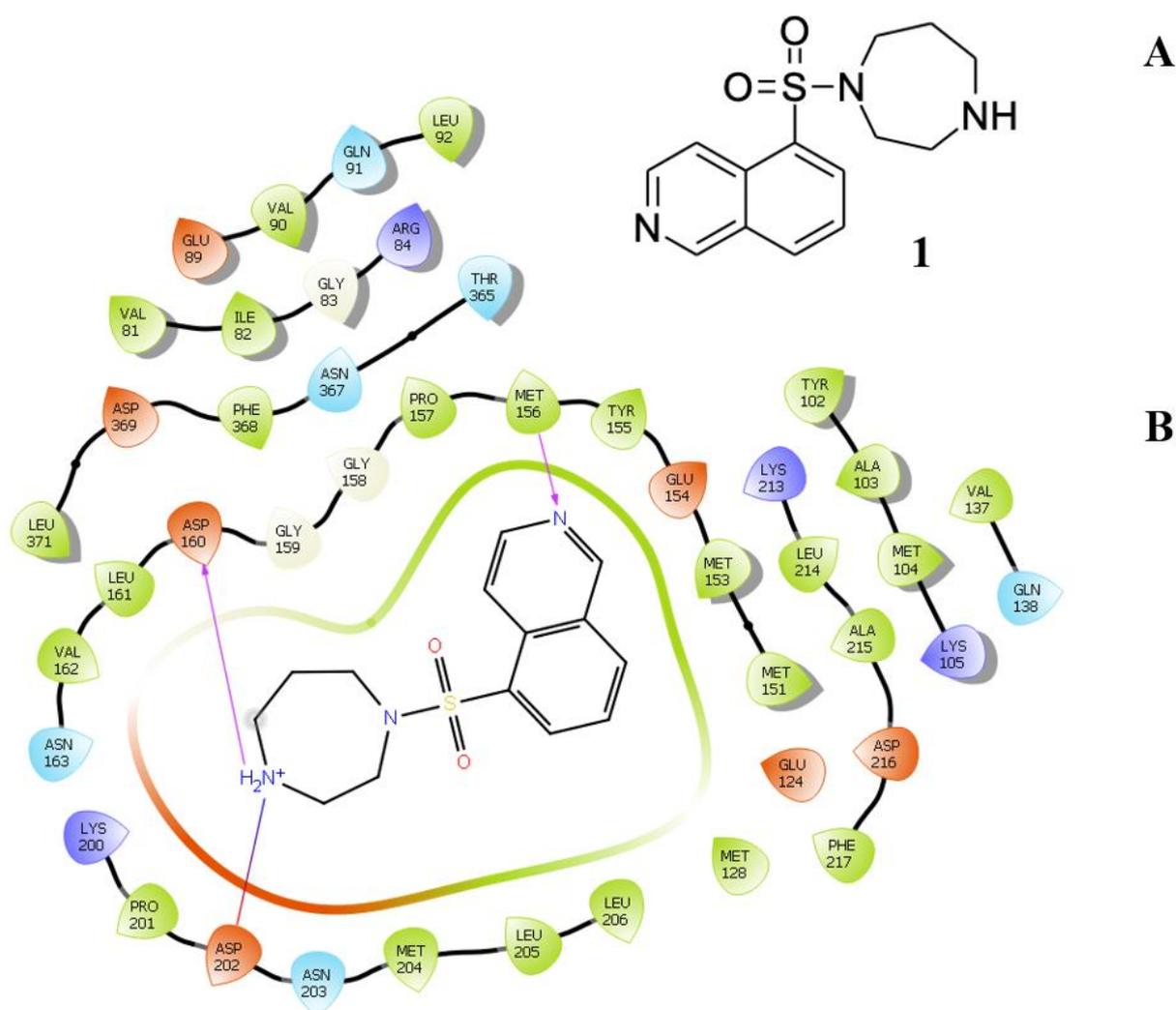


Рисунок 4 – Структура (А) и способ связывания (В) ингибитора 1 с ROCK-I (PDB ID: 2ESM) [21]

Как видно на рисунке 4, азот изохинолина образует водородную связь с Met156 ROCK-I. Гомопиперазин также образует водородную связь с Asp160. IC₅₀ для ROCK-I 10.7 (μM), для ROCK-II 1.9 (μM) [22].

Аналогом фасудила является гидроксифасудил **2** (рисунок 5 - А), который является неселективным ингибитором изоформ ROCK, т.к. имеет приблизительно сродство и к ROCK-I, и к ROCK-II. IC₅₀ для ROCK-I 0.73 (μM), для ROCK-II 0.72 (μM).

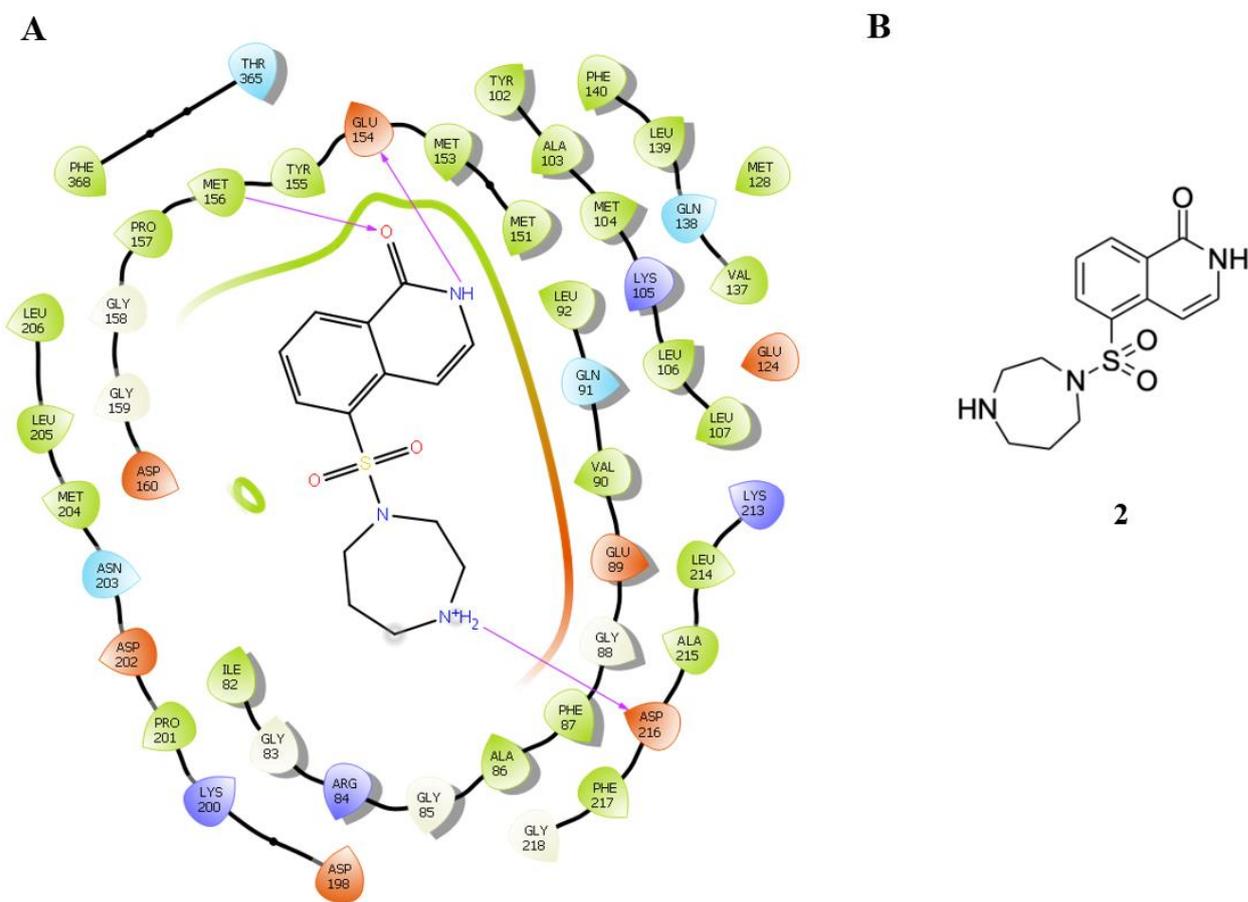


Рисунок 5 – Структура (В) и способ связывания (А) ингибитора **2** с ROCK-I (PDB ID: 2ETK) [21]

Карбонил служит акцептором водородной связи от амидного азота основной цепи Met156, а NH изохинолинона образует водородную связь с амидным карбонилем Glu154. В этой ориентации вторичный амин гомопиперазина взаимодействует с боковой цепью Asp216.

1.4 Ингибиторы Rho-киназ на основе пиридина

Reichen Pan и другие [23] исследовали влияние Y-27632 **3**, который является мощным ингибитором ROCK, способным контролировать артериальное давление у крыс со спонтанной гипертензией. Было обнаружено, что лечение низкомолекулярным ингибитором ROCK Y-27632 у мышей и крыс стимулирует регенерацию аксонов и восстановление функции задних конечностей.

Было показано, что вмешательство Y-27632 и некоторых нестероидных противовоспалительных препаратов в путь ROCK снижают распространенность болезни Альцгеймера, при которой снижается уровень длинного амилоида- β состоящего из 42 аминокислот (A β 42).

Наиболее эффективные и селективные ингибиторы ROCK являются АТФ-конкурентными. Фундаментальным шагом в разработке эффективных и высокоспецифичных ингибиторов ROCK является разработка молекулярных ограничений АТФ-связывающего сайта ROCK и взаимодействий между остатками связывающего кармана и ингибиторами.

В структуре комплекса Y-27632-ROCK-I (рисунок 6) пиридиновый азот соединения **3** взаимодействует с Met156 через водородную связь с амидом. Аминогруппа на конце Y-27632 взаимодействует с боковыми цепями Asp216 и Asn203.

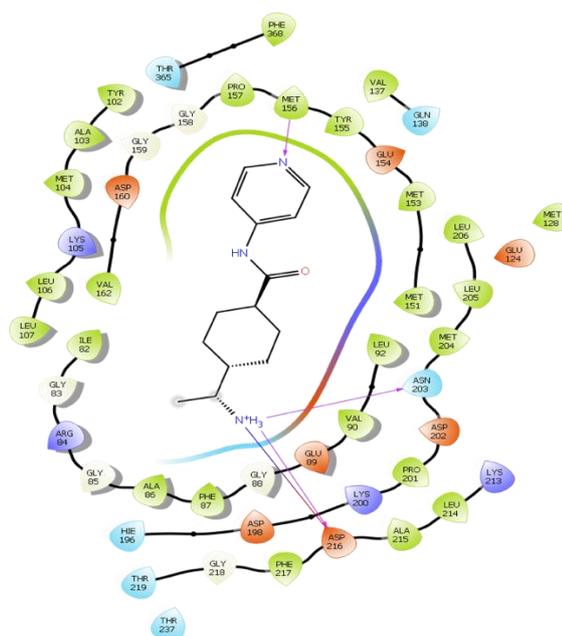


Рисунок 6 – Структура комплекса Y-27632-ROCK-I (PDB ID: 2H9V) [24]

1.5 Ингибиторы Rho-киназ на основе пиразола

Xingang Fang и другие [25] разработали серию ингибиторов ROCK с пиразольным scaффолдом, из них соединение **4** (рисунок 7 - **В**) показало отличную терапевтическую активность при глаукоме. Боковая цепь 2-(*N,N*-диметиламино)этокси связана с остатком Asp176 в кармане связывания ROCK-II. Соединение **4** проявило высокую активность ROCK в ферментных и клеточных анализах (IC_{50} 7 и 32 нМ). Чтобы лучше понять, как ингибиторы связываются в киназном домене ROCK-II, и, что более важно, чтобы направить стратегию оптимизации, соединение **4** было вставлено в модель ROCK-II человека. На рисунке 7 (А) продемонстрировано, что соединение **4**-ROCK-II образуют несколько ключевых взаимодействий ответственных за высокую эффективность и селективность. Пиразол образует 2 водородные связи с Met172 и Glu170. Карбонильная группа соединения **4** образует третью водородную связь с NH боковой цепи остатка Lys121. Последний важный элемент водородной связи был обнаружен между третичным амином на диметиламиноэтокси боковой цепи **4** с цепью Asp176, что объясняет высокую селективность **4** по сравнению с другими соединениями без

боковой цепи в центральном фенильном кольце. Кроме того, поза соединения **4** указывает на гидрофобное взаимодействие, при котором ароматическое кольцо погружено в гидрофобную область под гибкой Р-петлей, характеризующейся остатками Phe103, Ala102, Leu123 и Phe136. Это гидрофобное взаимодействие является основным фактором высокой эффективности ингибиторов ROCK.

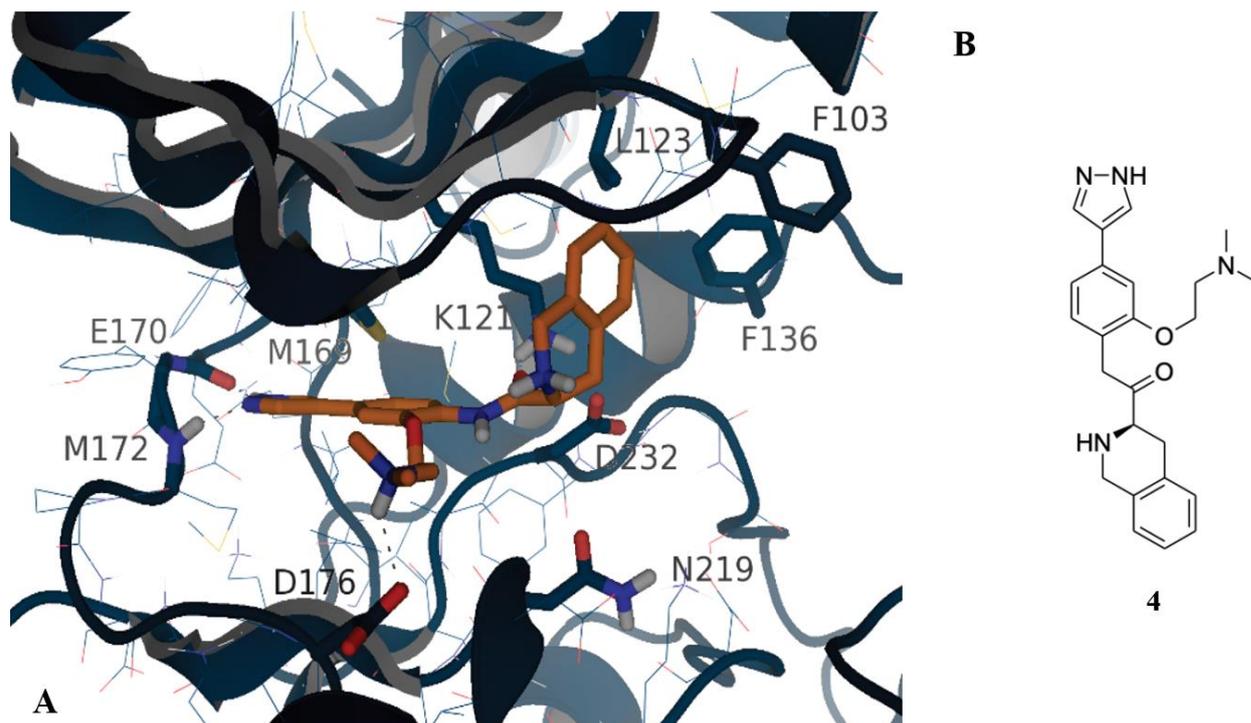


Рисунок 7 — Структура соединения **4** (**B**) и режим его связывания в сайте ROCK-II (**A**)

Zilun Hu с коллегами исследовали соединение **5** (рисунок 8), которое является двойным ингибитором ROCK-I/II со значениями IC_{50} ROCK-I и ROCK-II 5 нМ и 2.3 нМ [26].

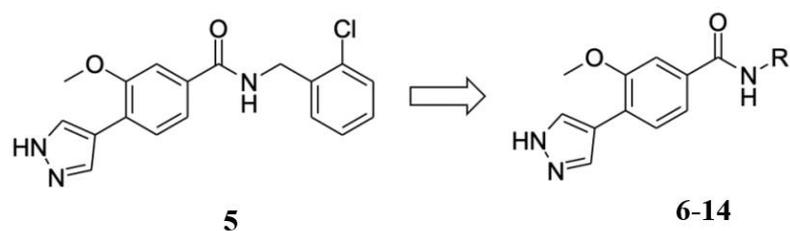


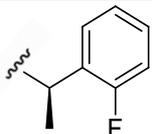
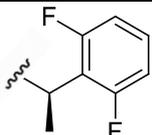
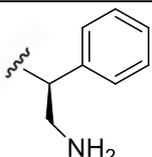
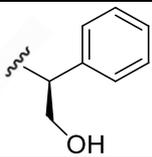
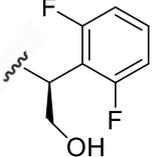
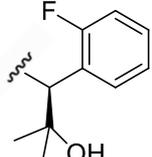
Рисунок 8 – Структурная формула соединения **5**, основа для SAR оптимизации **6-14** (таблица 1)

В таблице 1 представлены результаты исследования взаимосвязи структура-активность (SAR) бензамидов на основе **5**. Было замечено, что замена *орто*-хлорбензиламина на *орто*-метоксибензиламин привела к резкой потере активности (**6** против **5**). Однако *мета*-метоксибензиламид сохранял активность ингибирования ROCK-I/II (**7** против **6**). При введении метильного заместителя наблюдалось улучшение активности ROCK-I/II **8**. Введение F ухудшает ингибирующую активность. Аминозамещение **11** также увеличивало эффективность ROCK-I/II. Замена на гидроксильную группу улучшает метаболическую стабильность (**12**), но снижает активность ROCK-I в сочетании с фторзамещенной фенильной группой (**13, 14**).

Таблица 1 – Исследования SAR бензамидов на основе соединения **5**

Соединения	R	IC ₅₀ , мкМ	
		ROCK-I	ROCK-II
6		182	66
7		6.7	1.2
8		0.9	0.3

Продолжение таблицы 1

Соединения	R	IC ₅₀ , МКМ	
		ROCK-I	ROCK-II
9		3.1	1.3
10		5.4	1.6
11		0.8	0.3
12		7.9	2.3
13		24	2.1
14		16	2.1

Соединение **12** связывается в конформации DFG-in с пиразолом, а фенильное кольцо расположено под Р-петлей и против С-спирали. Карбонильная группа амида взаимодействует с Lys121, а гидроксигруппа связывается с аспарагиновой кислотой каждого мотива DFG фермента (рисунок 9).

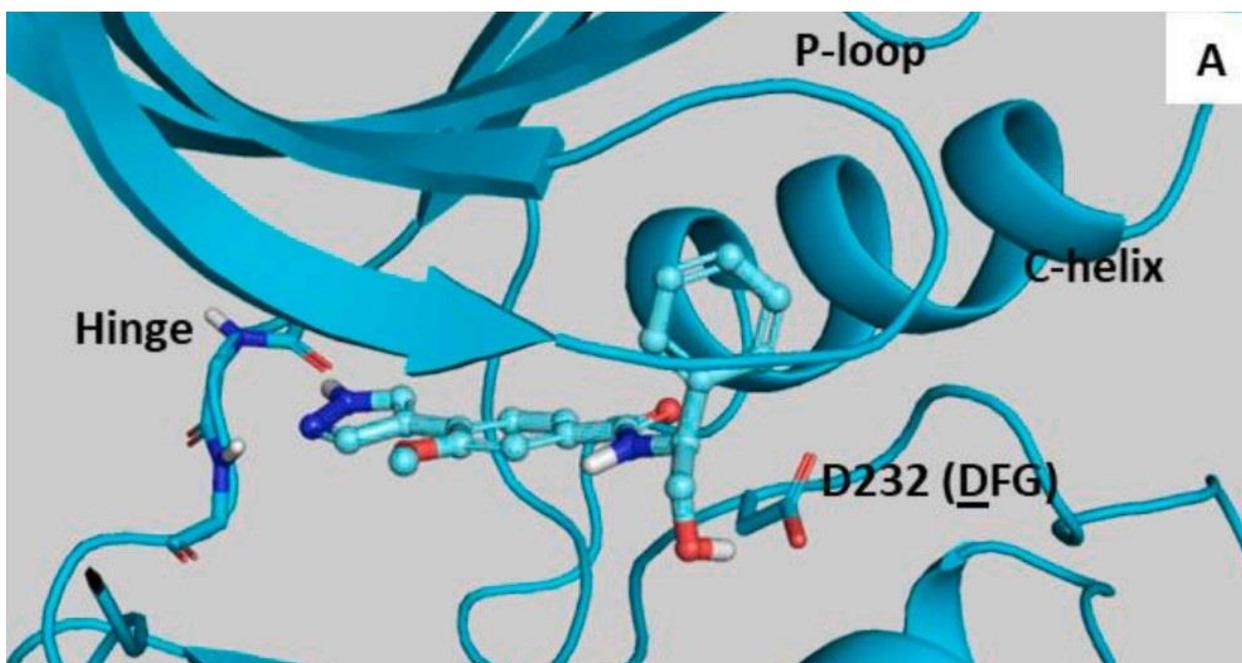


Рисунок 9 – Модель связывания соединения **12** с активным сайтом ROCK-II (PDB ID: 7JOV) [26]

1.6 Ингибиторы Rho-киназ на основе тиазола

J. Green и соавторы исследовали серию ингибиторов с тиазольным scaфолдом [27]. Рентгеновская кристаллографическая структура соединения **15**, связанного с ROCK-I (PDB ID: 4YVC) [27], представленная на рисунке 10, показала основные взаимодействия комплекса. Пиридиновая группа связана водородными связями с Met156, а кислород, входящий в состав амидной группы взаимодействует с Lys105. Также, было отмечено, что 2-фторфенильное кольцо непродуктивно лежит под богатой глицином петлей.

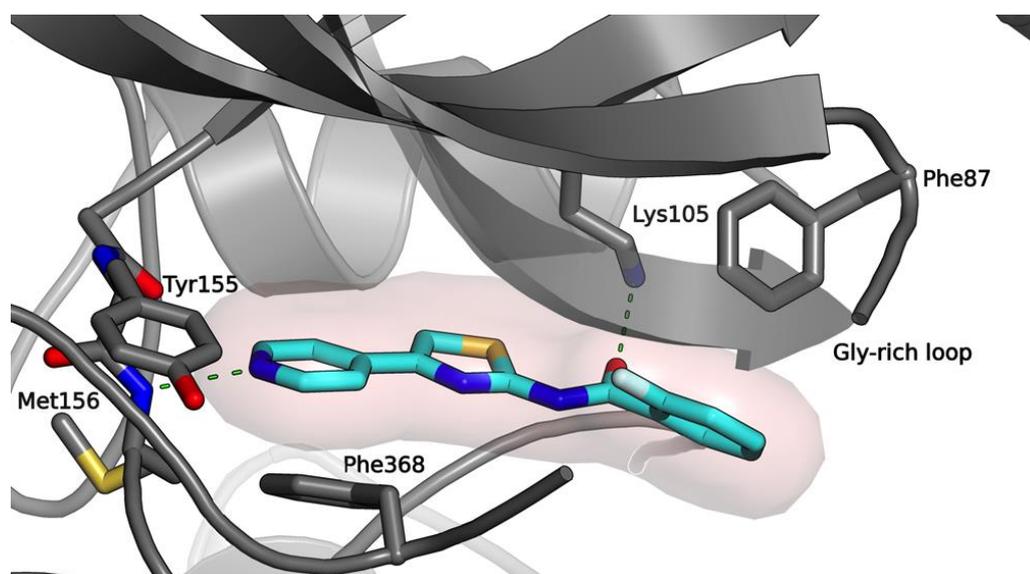
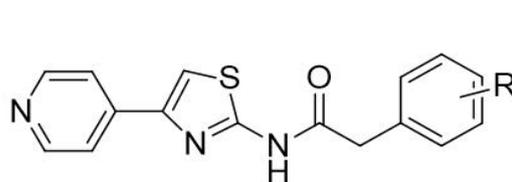
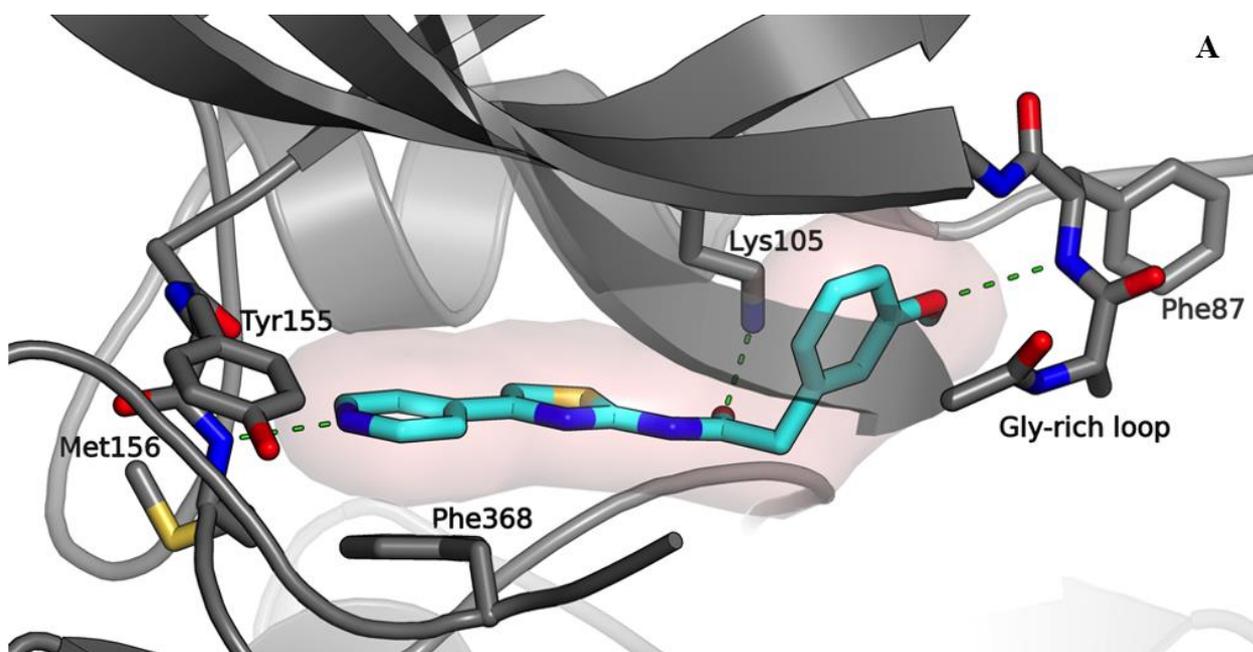


Рисунок 10 – Рентгеновская кристаллографическая структура **15**, связанного с ROCK-I (ID PDB: 4YVC) [25]

Было предложено, что вставка одного или нескольких sp^3 -гибридизированных атомов рядом с карбонилем позволит этому кольцу занимать пространство под богатой глицином петлей, а заместители совершат дальнейшие взаимодействия. Структура соединения **21** ($K_i = 100$ нМ) (рисунок 11 (A), PDB ID: 4YVE) [27] показывает, что 3-метоксигруппа в арильном заместителе способна к дополнительным взаимодействиям с богатой глицином петлей. Основа для SAR-оптимизации представлена на рисунке 11 (B), результаты SAR-исследования представлены в таблице 2. 2-Хлор-заместитель с 4,5-метилендиокси в соединении **27** дополнительно увеличивает эффективность до однозначного наномолярного числа. Соединение **29**, несущее 3-метансульфоаминогруппу, обеспечивало наилучшее общее сочетание активности ($K_i = 26$ нМ) и селективности (таблица 2).



16-29

Рисунок 11 – (А) Рентгеновская кристаллографическая структура **21**, связанного с ROCK-I (PDB ID: 4YVE) [27]; (В) – Основа для SAR-оптимизации заместителей бензольного кольца (таблица 2)

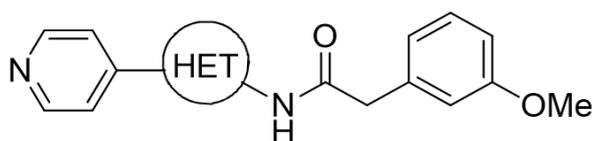
Таблица 2 – SAR исследование заместителей в ароматическом мотиве

Соединение	R	ROCK K_i , нМ
16	H	170
17	2-F	130
18	3-F	120
19	4-F	81
20	2-OMe	>2500
21	3-OMe	100
22	4-OMe	540
23	2-OH	900
24	3-OH	28

Продолжение таблицы 2

Соединение	R	ROCK Ki, нм
25	4-OH	70
26	3,4-OCH ₂ O-	100
27	2-Cl-3,4-OCH ₂ O-	7
28	3-NH ₂	350
29	3-NHSO ₂ CH ₃	26

Было исследовано замещение тиазольного кольца другими пятичленными кольцами, и результаты суммированы в таблице 3. Основа для оптимизации показана на рисунке 11, структура молекулы изображена на рисунке 12.

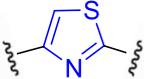
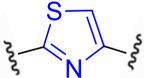
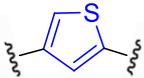
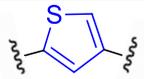
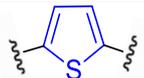
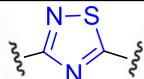
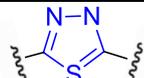


21, 30-36

Рисунок 12 – Структура для SAR-оптимизации гетероциклического мотива (таблица 3)

Несеросодержащие гетероциклы, показали относительно слабое ингибирование ROCK (данные не показаны), в то время как серосодержащие гетероциклы показали хорошую ROCK-активность. Для этих серосодержащих гетероциклов те, у которых NH, соседствует с атомом S (**21, 32, 35**), показали лучшую активность, чем соответствующие изомеры, в которых 4-пиридиновая система была смежна с серой (**30, 33**), тогда как системы, в которых сера, соединяющая два замещенных углерода, была наименее эффективной (**31, 34, 36**).

Таблица 3 – SAR исследование замещения центрального гетероцикла

Соединение	НЕТ	ROCK K_i , nM
21		100
30		530
31		490
32		10
33		61
34		140
35		89
36		>2500

Shuchao Ma с коллегами идентифицировали серию 4-арил-5-аминометилтиазол-2-аминов как новый класс мощных ингибиторов ROCK-II [28].

Ранее сообщалось о мощном и селективном ингибиторе ROCK-II **37**, селективность приписывалась аминоалкильной боковой цепи. Однако высокий клиренс и низкая биодоступность были нежелательны для перорального введения соединения **37**. **CID5056270 (38)** амид на основе пиридин-тиазола, показал сильную ингибирующую активность ROCK-II, но имел большой сдвиг в активности на клеточной основе (рисунок 13).

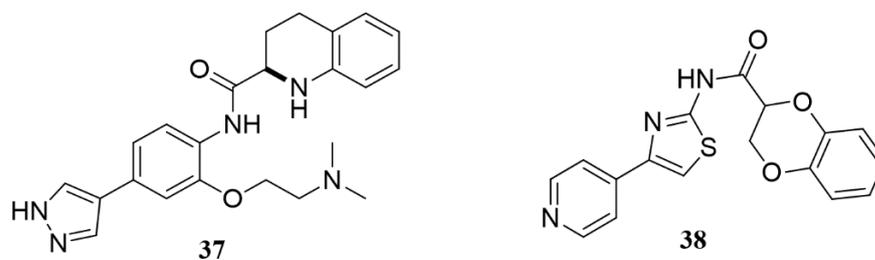


Рисунок 13 – Структурные формулы соединений **37** и **38**

Первоначально все соединения оценивали на предмет их процентного ингибирования против ROCK II. Соединения со значительным ингибированием ROCK-II были дополнительно оценены на предмет IC₅₀ (Результаты SAR – таблица 4, основа для скаффолд-хоппинга – структура на рисунке 14). В качестве контроля был выбран **38**.

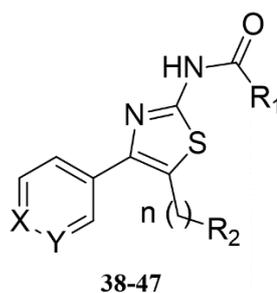
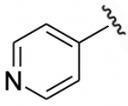
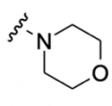
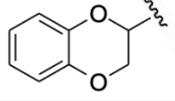
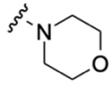
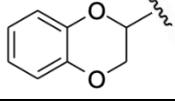
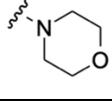
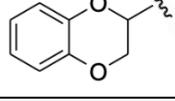
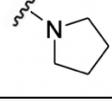
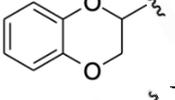
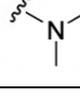
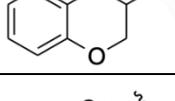
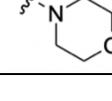
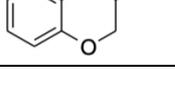


Рисунок 14 – Базовая структура для SAR (таблица 4)

Таблица 4 – Значения IC₅₀ соединений по отношению к ROCK II в зависимости от состава соединения

Соединение	X	Y	n	R ₁	R ₂	% Ингибирования ROCK-II	IC ₅₀ ROCK-II (μM)
39	N	C	1			56.9	8.83
40	N	C	2			78.5	0.09
41	N	C	1			52.2	9.12

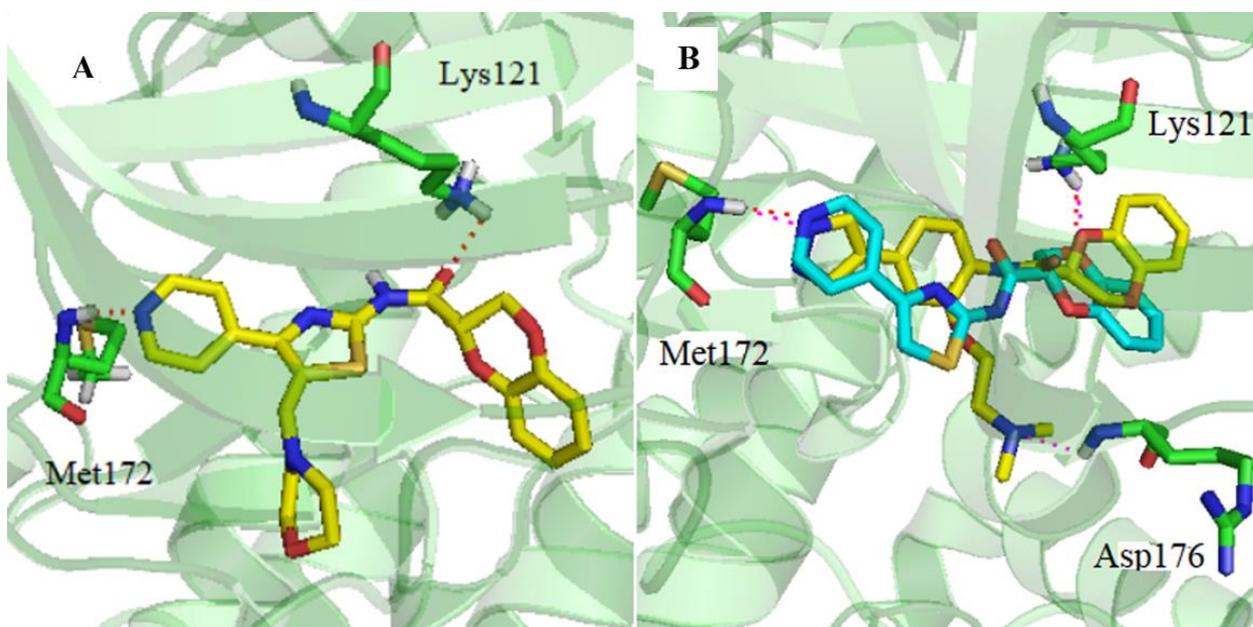
Продолжение таблицы 4

Соединение	X	Y	n	R ₁	R ₂	% Ингибирования ROCK-II	IC ₅₀ ROCK-II (μM)
42	N	C	1			58.1	8.56
43	N	C	1			87.4	0.02
44	C	N	1			63.8	1.73
45	C	N	1			61.3	1.56
46	C	N	1			58.1	4.96
47	N	C	0			76.3	0.13
38	N	C	/		/	91.3	0.01

Из приведенных выше результатов связь структура-активность этого ряда соединений наблюдалась следующим образом: Во-первых, для кислотной части (группа R₁) соединения с 2,3-дигидробензо[*b*]-1,4-диоксиновой группой обычно проявляет лучшую активность, чем соединения с пиридиновой группой. Во-вторых, для аминоалкильной боковой цепи (группа R₂) соединения с морфолиновой группой обычно были более эффективными. В-третьих, в отношении положения N в пиридиновом заместителе соединения с замещением в 4-м положении обычно были более эффективными, чем соединения с замещением в 3-положении. Основная группа третичного амина в боковой цепи благоприятно влияла на ингибирующую активность ROCK-II.

Соединение **43** показало наилучшую ингибирующую активность ROCK-II со значением IC_{50} 20 нМ.

Был проведен молекулярный докинг соединения **43** и двух основных соединений **37** и **38** для выяснения ключевых взаимодействий в активном центре ROCK-II. Как показано на рисунке 15 (**B**), стыковка соединений **37** и **38** в сайте связывания Rho-киназы указывает на ключевое взаимодействие водородных связей между азотом в пиридиновом или пиразольном кольце и Met172. Эта связь очень важна для стабилизации ориентации и конформации ингибиторов ROCK. 2,3-Дигидробензо[*b*]-1,4-диоксиновая группа образует водородную связь с Lys121. Эта связь полезна для стабилизации конформации соединения. Предполагается, что аминокислотная боковая цепь соединения **37** образует ключевую водородную связь с Asp176. Эта связь полезна для улучшения селективности соединения. На рисунке 15 (**A**) показан молекулярный докинг соединения **43**.



A - Прогнозируемый способ связывания соединения **43** (желтый) с ROCK-II (PDB ID:4L6Q) [28]; **B** - Прогнозируемый режим связывания **37** (желтый) и **38** (синий) с ROCK-II (PDB ID: 4L6Q) [28].

Рисунок 15 – Молекулярный докинг соединения **43**

Два ключевых взаимодействия водородных связей между соединением **43** с Met172 и Lys121 все еще сохранялись. Однако взаимодействие между аминоалкильной боковой цепью соединения **43** и Asp176 не наблюдались, что объясняет небольшое снижение ингибирующей активности.

1.7 Ингибиторы Rho-киназ на основе 7-азаиндола

Urup K. Vandanage и соавторы исследовали ещё одну серию ингибиторов ROCK на основе 7-азаиндола [29]. Аналоги 7-азаиндола являются ингибиторами ROCK-I со значениями K_i , как правило, ниже 20 нМ. 4-Замещенные соединения **48** и **49** показали наименьшую селективность и несколько меньшее сродство ROCK. В аналогичной серии 3-замещенных 7-азаиндолов общее сродство к ROCK было немного улучшено (рисунок 16).

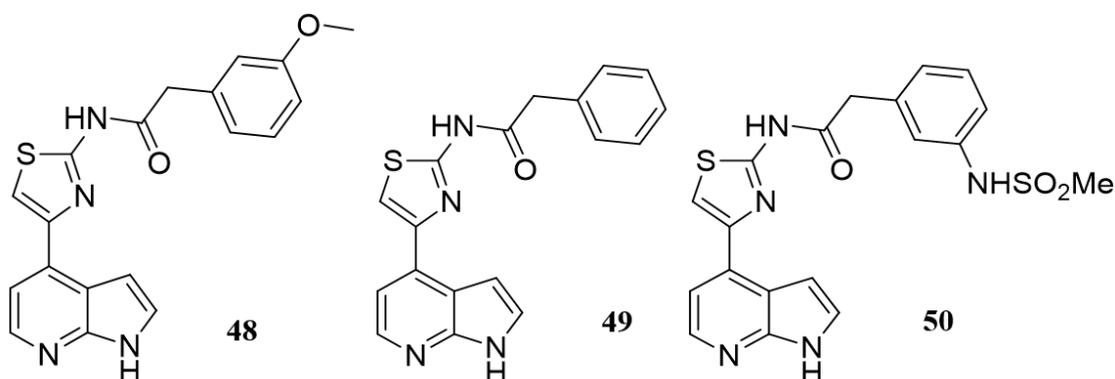


Рисунок 16 – Структурные формулы соединений **48,49,50**

Чтобы понять способы связывания этих соединений, была получена рентгеновская кристаллическая структура соединения **50** ($K_i = 2$ нМ), связанного с ROCK-I (PDB ID: 5KKS) [29] (рисунок 17). Как и ожидалось, 7-азаиндольный фрагмент **50** образует водородную связь между азотом 7-азаиндола и Met156. Кроме того, пиррол в азаиндольном фрагменте образует новую водородную связь с карбонилем Glu154. Дополнительными взаимодействиями между **50** и ROCK-I являются H-связывания с Lys105 и

две водородные связи между сульфонамидом и основной цепью NH остатков Phe87 и Ala86.

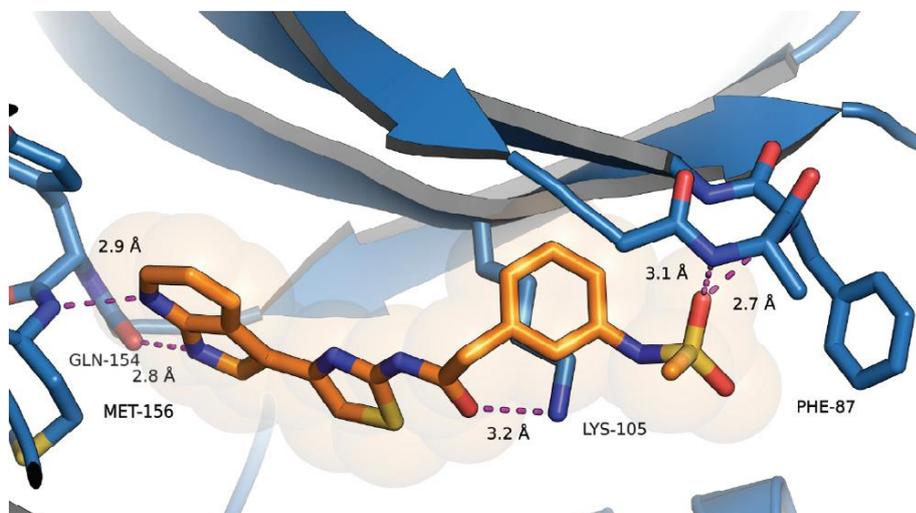


Рисунок 17 – Структура соединения **50**, связанного с активным сайтом ROCK-I (PDB ID: 5KKS) [27]

Также авторы работы описали, как добавление боковой солюбилизирующей группы, присоединенной к *мета*-положению фенилацетамида, может улучшать эффективность и селективность благодаря дополнительным взаимодействиям между дальним основным азотом и Asp117 внешнего цикла [30]. Структура для SAR-оптимизации представлена на рисунке 18.

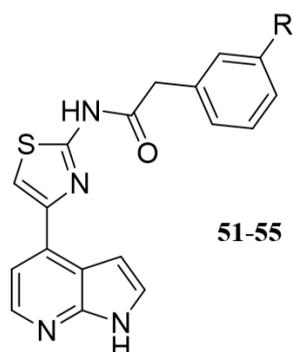
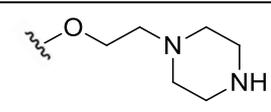
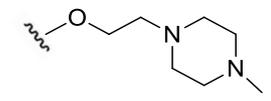
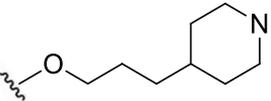
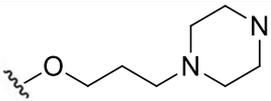
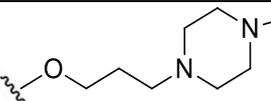


Рисунок 18 – Базовая структура для SAR- оптимизации (таблица 5)

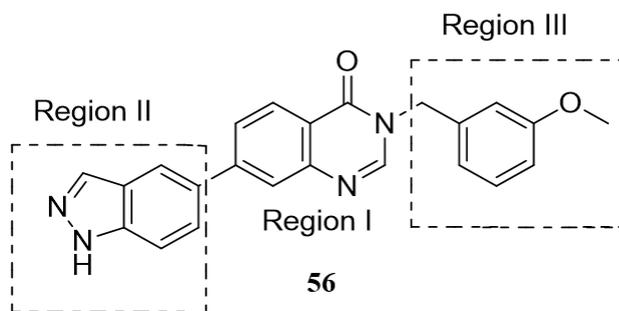
Из данных, представленных в таблице 5, можно видеть, что дальнейшее развитие SAR было достигнуто за счет добавления солюбилизирующей группы, способной взаимодействовать с Asp117, что привело к увеличению ингибирующей активности ROCK.

Таблица 5 – Зависимость константы ингибирования от состава R

Соединение	R	ROCK K_i , нМ
51		8
52		3
53		<5
54		10
55		<1

1.8 Ингибиторы Rho-киназ на основе хинозолинона

Zhuang Miao и соавторы работы [31] провели VS на основе молекулярного докинга, который дал удачное соединение, 3-(3-метоксибензил)-7-(1*H*-индазол-5-ил)хиназолин-4(3*H*)-он, которое проявляло умеренную ингибирующую активность против ROCK (ROCK-I 3.106 мкМ и ROCK-II 0.088 мкМ). Дальше были проведены структурные модификации сосредоточенные на трех областях: хиназолин-4(3*H*)-он (region I), индазол (region II) и метоксибензол (region III) [31] (рисунок 19).



ROCK- I IC₅₀ 3.106 μM

ROCK- II IC₅₀ 0.008 μM

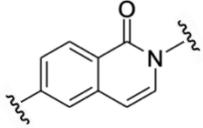
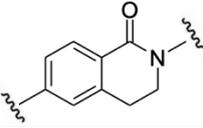
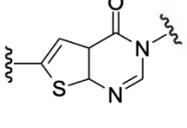
Рисунок 19 – Химическая структура соединения **56**. Основа для варьирования мотивов Region I (таблица 6).

В таблице 6 продемонстрированы структурные модификации region I. Удаление N из 1 положения не дало очевидного улучшения, а смещение его в положение 2 вовсе ухудшило эффективность (**57**, **58** против **56**). Также, снижение ингибирующей активности наблюдалось, когда изохинолин-1-(2H)-он в **58** был насыщенным (**59** против **58**). Стоит отметить, что соединение **60**, которое содержит фрагмент тиено[2,3-*d*]пиримидин-4(3H)-он, продемонстрировало значительное улучшение эффективности ингибирования ROCK. Поэтому тиено[2,3-*d*]пиримидин-4(3H)-он был выбран в качестве оптимального фрагмента в region I.

Таблица 6 – Химическая структура и активность соединений **57-60** по ингибированию ROCK

Соединение	Заместитель (region I)	IC ₅₀ (μM)	
		ROCK-I	ROCK-II
56		3.106	0.088
57		>10	0.398

Продолжение таблицы 6

Соединение	Заместитель (region I)	IC ₅₀ (μM)	
		ROCK-I	ROCK-II
58		1.877	0.107
59		2.062	0.632
60		0.020	0.002

В таблице 7 приведены модификации region II, основа для модификаций – на рисунке 20. Соединение **61** проявляет значительную эффективность против ROCK. Удлинение мотива пиридина путем введения бензольного кольца или изменения положения атома азота в пиридине привело к очевидной потере ингибирующей активности ROCK (**62**, **63** против **61**), что указывает на то, что атом азота должен быть зафиксирован в *para*-положении. Затем было исследовано влияние различных замещенных пиридинов, все соединения демонстрировали пониженную активность (**64-67** против **61**), за исключением **68**. При изменении положения атома азота и аминогруппы ингибирующая активность практически исчезла (**69** против **68**). Аналог с 7-азаиндольным фрагментом (**70**), проявлял более высокую активность ROCK-I (IC₅₀ 0.004 мкМ) и сопоставимую активность ингибирования ROCK-II (IC₅₀ 0.001 мкМ). Замена азаиндола на индол (**71** против **70**) значительно снизила активность, снова указывая на важность атома азота в *para*-положении. В совокупности 2-аминопиридин или 7-азаиндол могут быть лучшим выбором для region II.

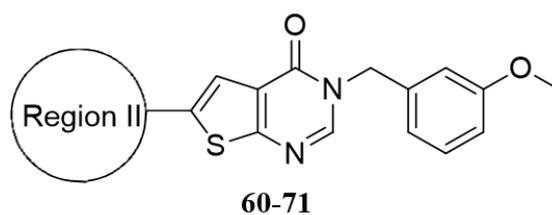


Рисунок 20 – Основа для SAR-исследования (таблица 7)

Таблица 7 – Химические структуры и активность **60-71** по ингибированию ROCK

Соединение	Заместитель (region II)	IC ₅₀ (μM)	
		ROCK-I	ROCK-II
60		0.020	0.002
61		0.045	0.006
62		>10	3.475
63		>10	>10
64		1.050	0.083
65		>10	0.501
66		2.515	0.042

Продолжение таблицы 7

Соединение	Заместитель (region II)	IC ₅₀ (μM)	
		ROCK-I	ROCK-II
67		>10	6.915
68		0.018	0.001
69		>10	>10
70		0.004	0.001
71		>10	0.583

На последнем этапе был оптимизирован region III, а I и II представлены в качестве наиболее эффективных групп. Результаты – в таблице 8, основа для оптимизации – на рисунке 21.

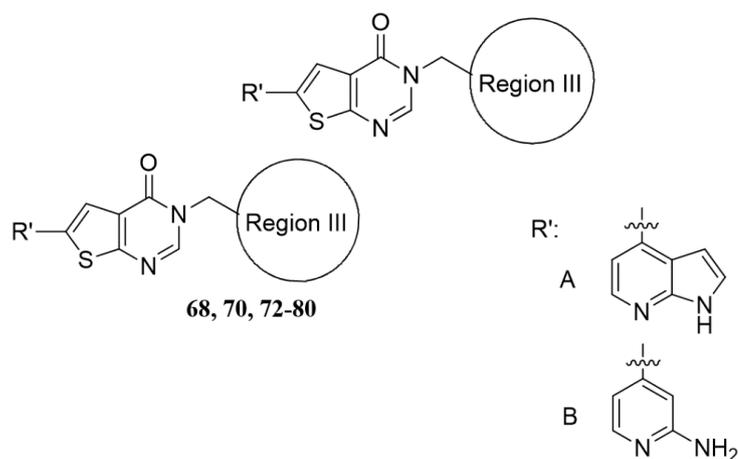
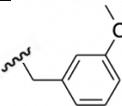
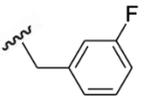
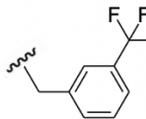
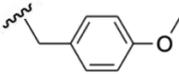
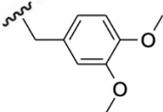
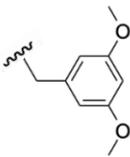
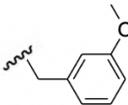
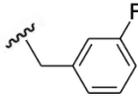


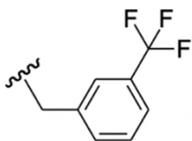
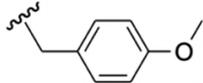
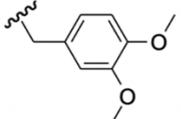
Рисунок 21 – Базовая структура для SAR-оптимизации Region III (таблица 8)

Все заместители из категории А (7-азаиндол в region II) показали хорошую ингибирующую активность. Заместители в категории В (2-аминопиридин в region II) также показали неплохую ингибирующую активность кроме (*n*-метоксибензола (**11d**) и диметоксибензола (**11e**)) (таблица 8).

Таблица 8 – Химическая структура и активность соединений **70-80** по ингибированию ROCK

Соединение	Группа	Region III	IC ₅₀ (μM)	
			ROCK-I	ROCK-II
70	А		0.004	0.001
71			0.013	0.001
72			0.013	0.002
73			0.025	0.004
74			0.074	0.004
75	В		0.018	0.001
76			0.034	0.005
77			0.490	0.025

Продолжение таблицы 8

Соединение	Группа	Region III	IC ₅₀ (μM)	
			ROCK-I	ROCK-II
78	B		1.445	0.046
79			>10	0.219
80			>10	0.058

2 Результаты и их обсуждение

Исследования последних двух десятилетий показали, что сигнализация ROCK играет важную роль во многих заболеваниях, включая сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и боковой амиотрофический склероз, а также рак. В терапии для онкологических заболеваний разрабатываются ингибиторы ROCK, такие препараты способны предотвратить распространение рака, блокируя миграцию клеток, останавливая распространение раковых клеток в соседние ткани.

2.1 Выбор белковой мишени

На данный момент в ProteinDataBank [32] охарактеризовано 30 кристаллических структур разного качества, представляющих из себя комплексы ROCK с низкомолекулярными лигандами-ингибиторами (таблица 9). Среди данных комплексов с хорошим кристаллографическим разрешением менее 3 Å, оказалось 22 комплексов для ROCK-I и 8 комплексов для ROCK-II.

Таблица 9 – Количество ингибиторов ROCK в PDB

Изоформа	Количество
ROCK-I	22
ROCK-II	8

2.2 Подготовка структур

После выбора комплексов из ProteinDataBank, все кристаллические структуры были загружены и подготовлены с помощью Maestro в программном пакете Schrödinger. В процессе подготовки во всех комплексах были достроены отсутствующие остатки аминокислот в боковых цепях, уточнены порядки связей, удалены молекулы воды, необходимые атомы белка были протонированы; проведена первичная оптимизация и минимизация структуры комплекса. Все вышеописанные процедуры выполнялись с помощью модуля подготовки белка ProteinPreparationWizard [33, 34].

С помощью инструмента генерации грид-бокса ReceptorGridGeneration в модуле Glide [35] были рассчитаны сетки свойств сайтов связывания, указаны предварительно определенные ключевые взаимодействия лиганда с белком.

Для валидации построенных моделей комплексов был выполнен нативный докинг в модуле стыковки Glide [35]. Достоверность моделей оценивали на основе RMSD финальных поз связывания и энергии стыковки нативных лигандов, используя при этом два протокола точности стыковки GlideScore: SP, протокол стандартной точности [36]; XP, протокол повышенной точности [37].

2.3 Оценочные функции

Для оценки результатов докинга нативных лигандов и дальнейшей стыковки библиотеки ингибиторов ROCK применялись значения энергии поз связывания, рассчитанные на основе скоринговых функций Glide [36].

В общем случае скоринговая функция представляет собой математическое выражение, косвенно позволяющее количественно определить сродство лиганда к рецептору [37]. Любая оценочная функция в

простейшем представлении представляет собой сумму вкладов различных молекулярных взаимодействий между малой молекулой и активном сайтом белка [38].

Функция оценки XP [37] содержит четыре основных компонента, которые учитывают: кулоновскую энергию взаимодействующих атомов - E_{coul} ; ван-дер-Ваальсову энергию атомов - E_{vdw} ; набор термов, благоприятствующих связывающим взаимодействиям - E_{bind} и набор термов, препятствующих связывающим взаимодействиям - E_{penalty} . Описание каждого из следующих терминов, кроме $E_{\text{hb_pair}}$ и $E_{\text{phobic_pair}}$, которые представляют собой стандартные термины с водородными связями и липофильными парами (формулы 1, 2 и 3).

$$\text{XP GlideScore} = E_{\text{coul}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{bind}} + E_{\text{penalty}}, \quad (1)$$

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{hyd_enclosure}} + E_{\text{h_bond}} + E_{\text{metal_binding}} + E_{\text{polar}}, \quad (2)$$

$$E_{\text{penalty}} = E_{\text{desolv}} + E_{\text{ligand_strain}}, \quad (3)$$

где $E_{\text{hyd_enclosure}}$ - функция, присваивающая липофильным атомам лиганда потенциал в зависимости от их расстояния до гидрофобных атомов белка;

$E_{\text{h_bond}}$ - функция потенциала взаимодействия, разделенная на несколько компонент, которые зависят от того, являются ли атомы донора и акцептора нейтральными, один нейтрален, а другой заряжен или оба заряжены;

$E_{\text{metal_binding}}$ - дополнительная потенциальная энергия лиганда с заряженными химическими группами в том случае, если в сайте связывания присутствует анион;

E_{polar} - дополнительная потенциальная энергия лиганда с полярными атомами (но не донорами водородов) вблизи гидрофобных областей;

$E_{\text{desolvation}}$ – функция, которая «штрафует» те лиганды, которые энергетически не выгодно расположены по отношению к молекулам воды в сайте белка;

$E_{\text{ligand_strain}}$ – штрафная функция, применяемая к лигандам, имеющим высокоэнергетическую конформацию.

2.4 Анализ результатов нативного докинга

С помощью модуля Glide Ligand Docking был проведен нативный докинг для всех импортированных из PDB комплексов. Протоколы SP и XP использовались в режимах с жестким (rigid) и подвижным (flexible) лигандами. Результаты суммированы в таблице A.1 (приложении A).

Для дальнейшей работы были выбраны комплексы 3NDM, 3WNG, 2ETK, 2ETR, 4YVC, 4YVE, 5KKS, 3TV7, 3TWJ, содержащие ROCK-I; комплексы 7JNT, 4WOT, 7JOU, 6ED6, содержащие ROCK-II.

2.5 Идентификация ключевых паттернов связывания

На основе комплексов, отобранных после нативного докинга, нами были установлены модели связывания лигандов с аминокислотным окружением активных сайтов ROCK I и II. В частности, было проведено сравнение аминокислотных секвенций (рисунок 22) и установлены ключевые взаимодействия, опосредующие связывание.

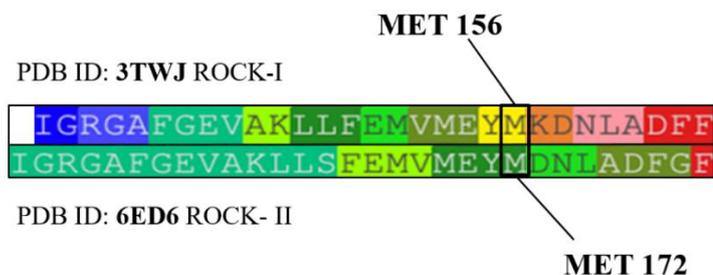
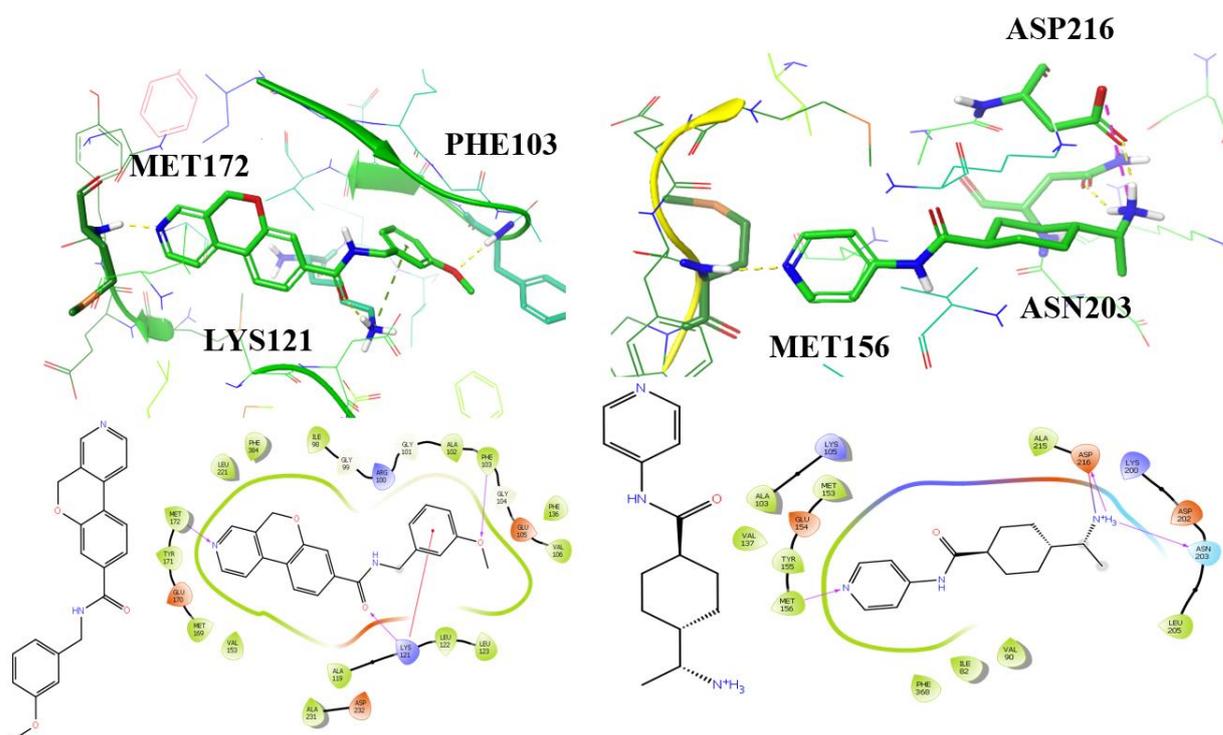


Рисунок 22 – Выравненные аминокислотные последовательности активных сайтов ROCK-I (PDB ID: 3TWJ, сверху) и ROCK-II (PDB ID: 6ED6, снизу)

Ключевой аминокислотой, опосредующей связывание малой молекулы и протеина является Met156 в случае I изоформы и Met172 в случае II. Соединения, которые могут образовывать достаточно низкоэнергетические комплексы с обеими изоформами в общем случае представляют собой следующее сочетание мотивов (Рисунок 23):



А – Структура ингибитора ROCK-II (PDB ID: 7JNT); В – структура ингибитора Y-27632 в активном сайте ROCK-I (PDB ID: 2ETR).

Рисунок 23 – Модели связывания ингибиторов I и II изоформы

Присутствие азота пиридина (или азота пиридинового типа – имидазолы) таким образом, является обязательным условием связывания. Отметим, что эта связь экранирована аминокислотами гидрофобного кармана (рисунок 23).

Сайты обеих изоформ являются высококонсервативными, однако отличаются, в частности, по размерам области, которая открыта для сольватации (рисунок 24).

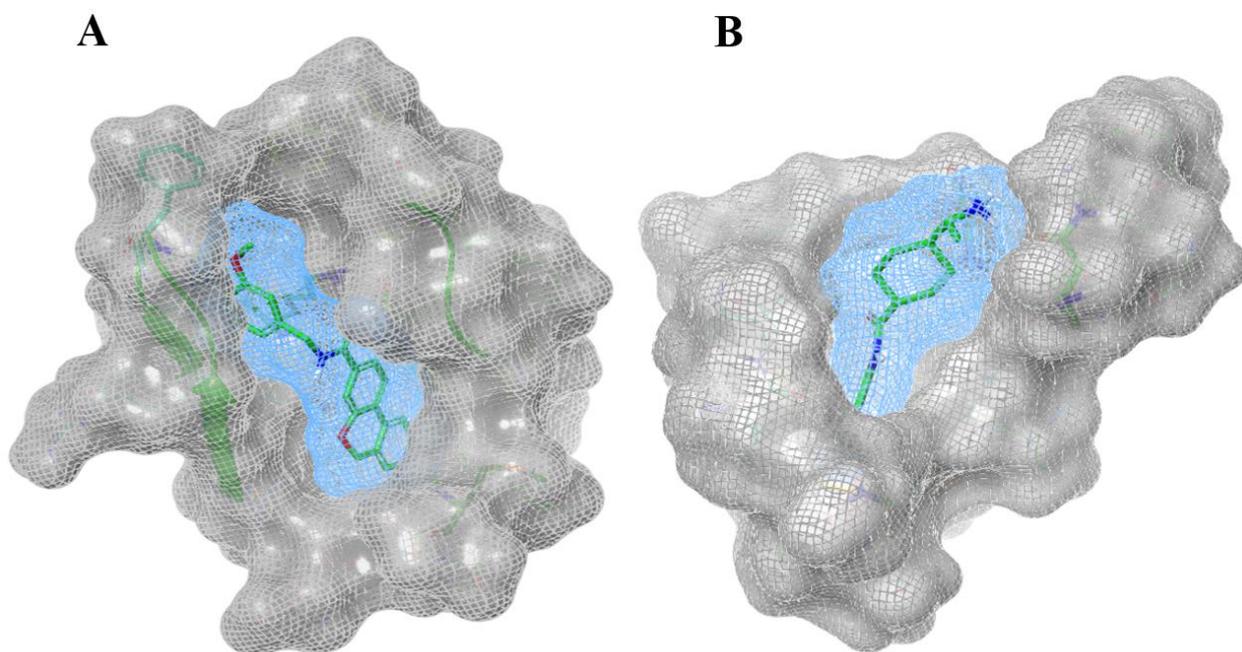


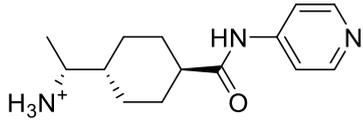
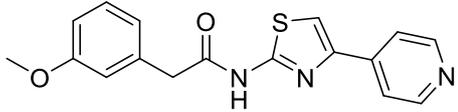
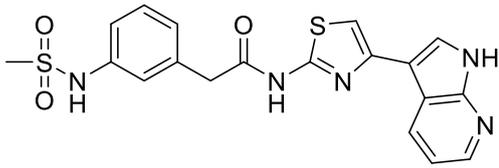
Рисунок 24 – Молекулярные поверхности сайта и лиганда

В целом сайты связывания и их геометрия вынуждают использовать достаточно “вытянутые” и относительно “плоские” структуры для успешного и энергетически выгодного связывания.

Остановимся подробнее на соединениях, содержащих в основе тиазоло-пиримидиновый скаффолд. В целом структуры, содержащие тиазольный мотив показывают лучшие значения величин энергии комплексов по результатам докинга для ROCK-I (таблица 10). Как видно из рисунка выше - тиазольный скаффолд обеспечивает приемлемую геометрию расположения

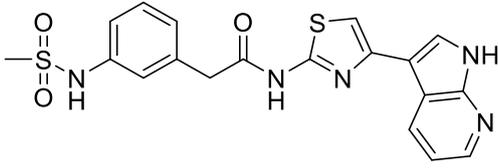
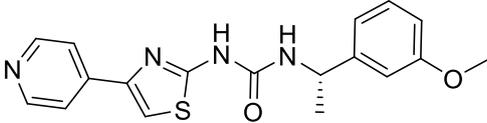
лиганда и нужную ориентацию 4-пиридиниевого заместителя независимо от оставшегося фрагмента молекулы.

Таблица 10 – ROCK-I

Структура	PDB ID:	XP GScore, ккал\моль
	2ETR	-7.096
	4YVC	-10.319
	5KKS	-13.861

Также был проведен кросс-докинг для каждого комплекса ROCK-I, результаты лидеров для комплексов 4YVC и 5KKS (как наиболее наглядные) представлены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 - Кросс-докинг лигандов ROCK-I в комплекс 4YVC

Структура	XP GScore, ккал\моль
	-8.542
	-8.366

Продолжение таблицы 11

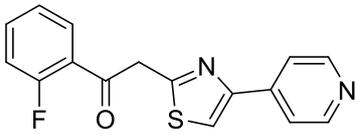
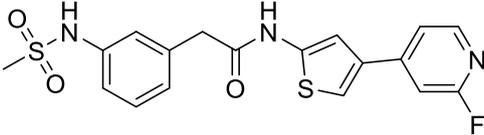
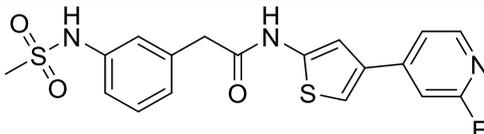
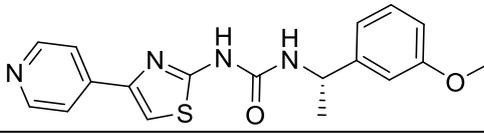
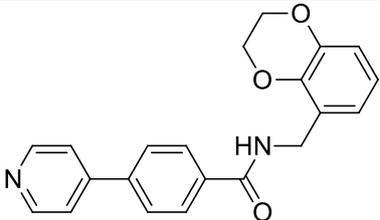
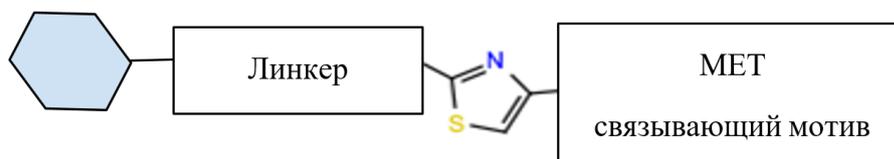
Структура	XP GScore, ккал\моль
	-8.101
	-8.071

Таблица 12 – Кросс-докинг лигандов ROCK-I в комплекс 5KKS

Структура	XP GScore, ккал\моль
	-9.847
	-9.578
	-9.496

Забегая вперед, отметим, что именно на основе тиазоло-пиримидинового скаффолда нами была построена виртуальная комбинаторная библиотека ингибиторов ROCK-I.

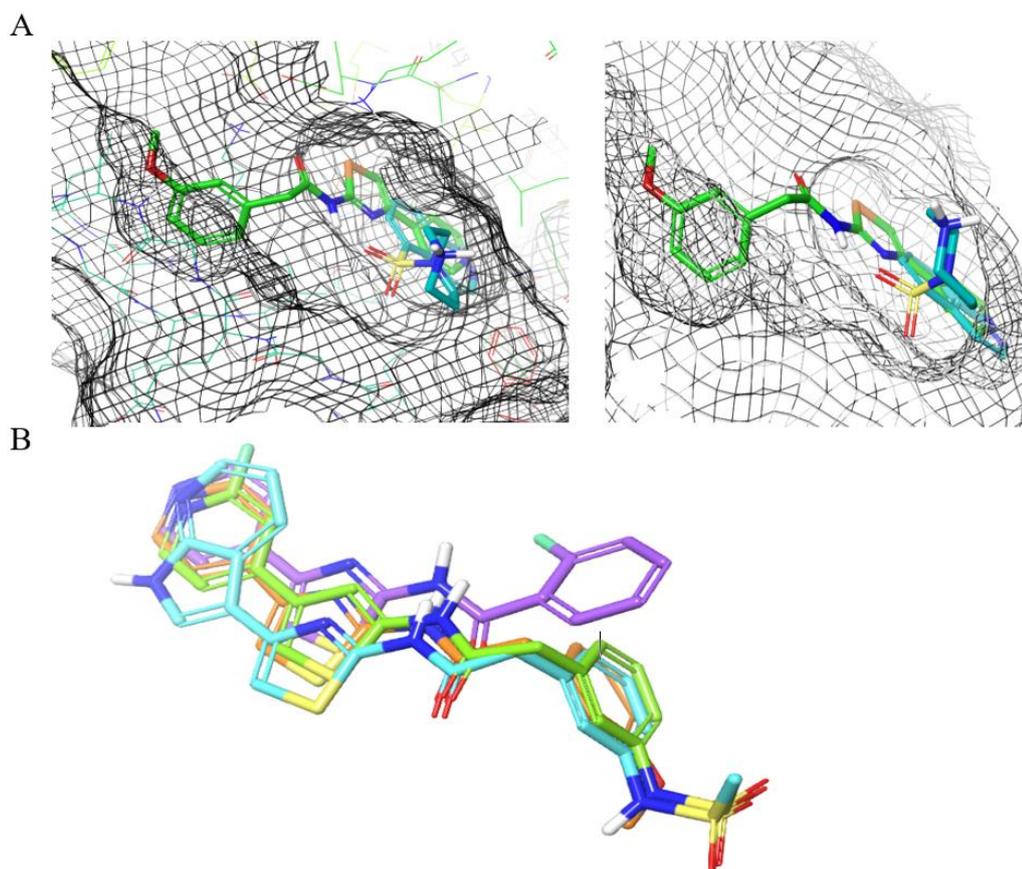
Причины таких хороших - с точки зрения энергии - показателей для тиазол-содержащих лигандов (рисунок 25) кроются в следующем.



Гидрофобный ароматический
мотив

Рисунок 25 – Принцип строения тиазолсодержащих лигандов

Тиазольный фрагмент позволяет наилучшим образом заполнить сайт связывания ROCK-I. Ориентация обеспечивается таким образом, что мотив, опосредующий связывание с МЕТ, всегда локализуется в сайте одинаково независимо от строения остальных фрагментов (рисунок 26).



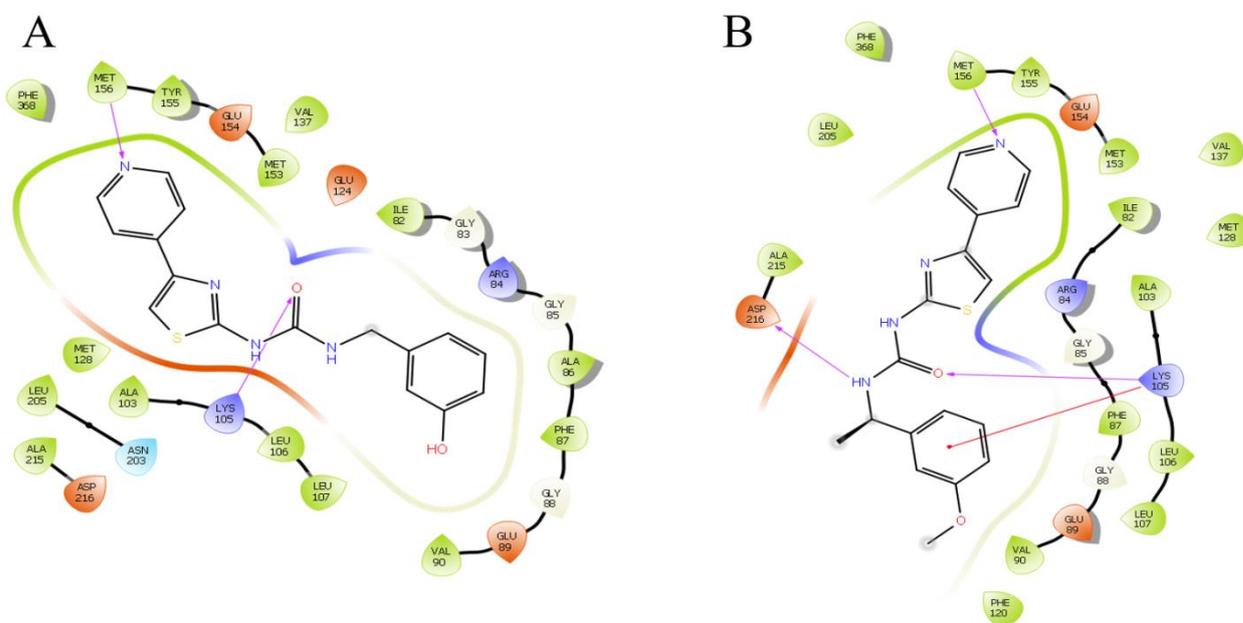
А – Связывание тиазольного фрагмента в активном сайте ROCK-I. В – Наложение структур нативных лигандов.

Рисунок 26 – Режим связывания тиазольного кольца.

Второй фрагмент лиганда призван содержать ароматический гидрофобный фрагмент для успешного связывания во втором малом гидрофобном кармане, а также образовывать π -стэкинг взаимодействия.

Для достижения подобного рода геометрии среди нативных лигандов используется амидный, амидно-метиленовый или мочевиновый мостиковые мотивы.

Как видно из рисунка 27, либо карбонильный кислород, либо амидный водород могут образовывать нековалентные взаимодействия с аминокислотным бэкграундом сайта.

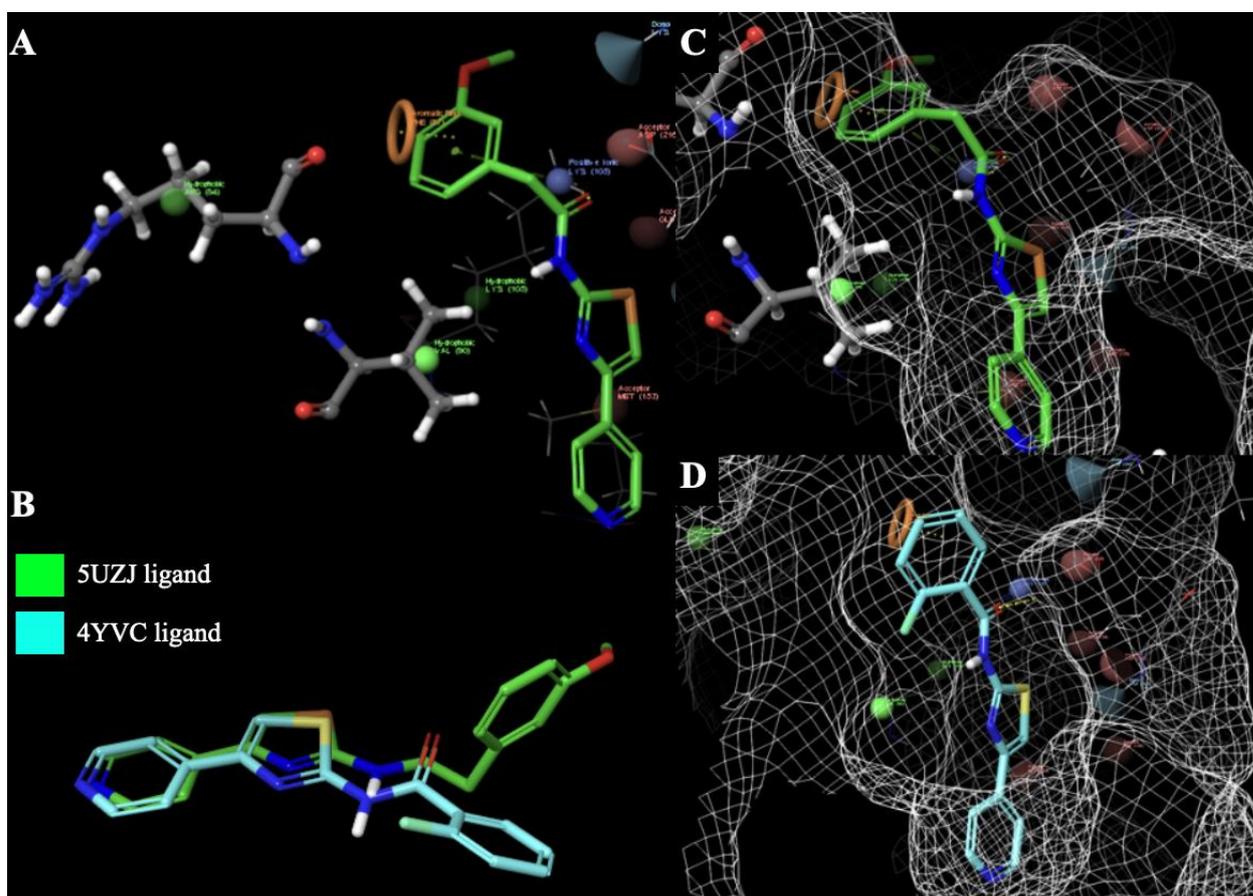


A – PDB ID: 3TWJ ROCK-I, B – PDB ID: 3TV7 ROCK-I.

Рисунок 27 – Возможности мостикового мотива

Метиленовый мотив перед ароматическим фрагментом во всех случаях позволяет крайне выгодно расположить последний в области гидрофобных взаимодействий (рисунок 28-А) за счет своей подвижности (рисунок 28-В - угол α).

Структуры лигандов, не содержащих такую подвижную группировку, соответственно, лишены подобной возможности (рисунок 28 С и D).



A – связывание нативного лиганда 5UZJ в малом гидрофобном кармане, образованном Leu, Lys, Arg и Phe. B – наложение структур нативных лигандов 5UZJ и 4YVC. C – связывание нативного лиганда 5UZJ (с генерацией оболочки сайта связывания). D – связывание нативного лиганда 4YVC (с генерацией оболочки сайта связывания). Зеленые шары – гидрофобные аминокислоты, синие конусы – доноры водородных связей, красные полусферы – акцепторы

Рисунок 28 – Режим связывания фенильного кольца (PDB ID: 4YVE)

Действительно, молекулы с тиазольным кольцом в конечном итоге показывают лучшие значения липофильного энергетического термина при том, что обеспечиваются биапикальные гидрофобные взаимодействия.

2.6 Докинг комбинаторной библиотеки

Проведенный ранее и не охваченный данной работой высокопроизводительный виртуальный скрининг различных 4-пиридин-тиазолов выявил следующие соединения как потенциально обладающие высокой аффинностью к рецептору ROCK-I.

Обратите внимание на неизменность описанной ранее структурной организации потенциальных ингибиторов (рисунок 29).

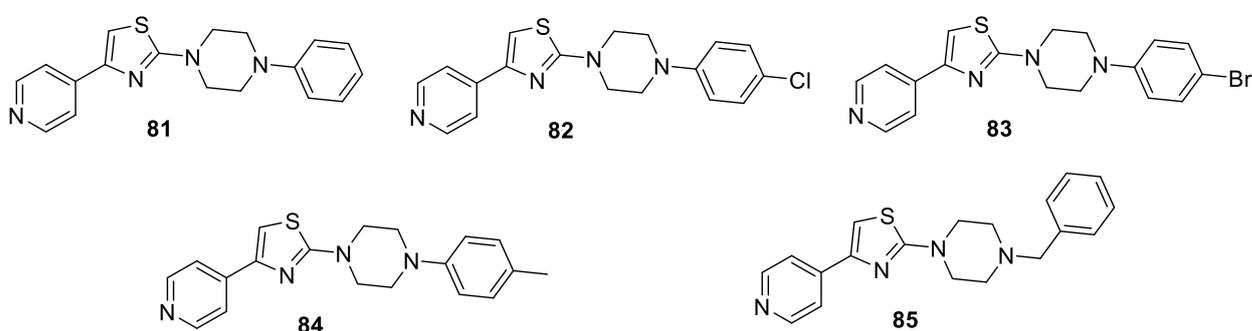


Рисунок 29 – Исследуемые соединения

Для выявления лидеров среди представленных производных пиримидо-тиазолов был проведена стыковка библиотеки (XP-f протокол) в 6 комплексов, содержащих ROCK-I. Наглядные примеры - ниже (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты проведенной стыковки

PDB ID	№	XP GScore, ккал\моль
3NDM	85	-10.460
	83	-8.357
	82	-8.064
	84	-7.501
	81	-7.025

Продолжение таблицы 13

PDB ID	№	XP GScore, ккал\моль
5WNG	85	-10.188
	82	-8.956
	83	-.8.139
	84	-6.930
5WNG	81	-5.692
2ETK	85	-11.270
	83	-10.855
	84	-9.063
	82	-9.021
	81	-7.250
7JOU	85	-10.567
	83	-9.011
	82	-8.934
	84	-7.625
	81	-5.545
5KKT	85	-9.118
	82	-4.763
	84	-4.059
5BML	85	-10.625
	82	-6.454
	83	-6.403
	81	-5.387
	84	-3.325
5UZJ	85	-10.724
	83	-8.193
	82	-7.168
	84	-6.879
	81	-6.614

Соединение **85** показало лучшие значения скоринговой функции в большинстве из комплексов, в некоторых случаях, значения энергии для комплекса **85** - ROCK-I были даже ниже чем для верифицированного ингибитора Y-27632.

Среди аутсайдеров можно выделить Ph- и 4-Br-C₆H₄- замещенные соединения. Забегая вперед отметим, что результаты докинга в некоторой степени соответствуют результатам *in vitro* тестов (рисунок 30).

Соединение	IC ₅₀ , нМ
81	>10000
85	934±340
Y-27632	255±49

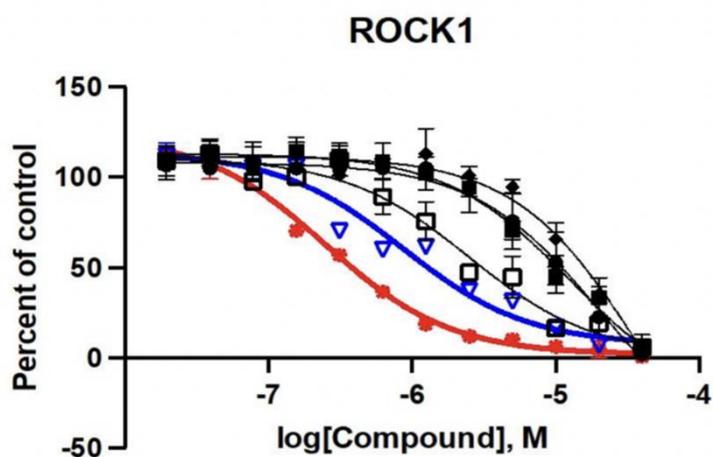


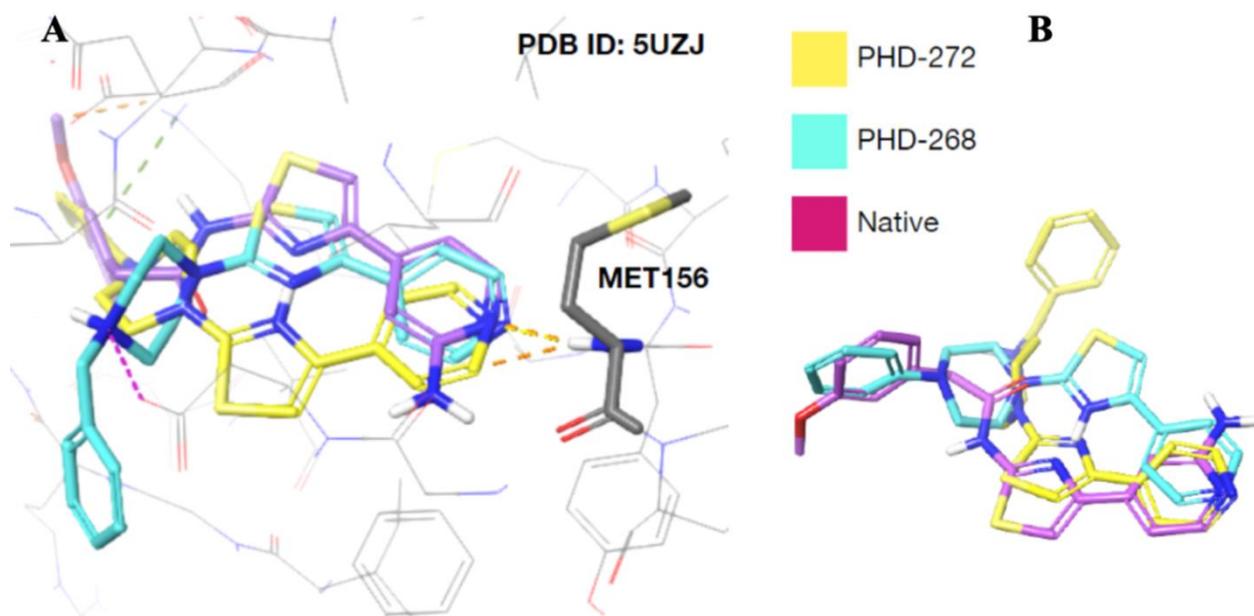
Рисунок 30 – Результаты ADP-Glo-киназного анализа

Для удобства сравним между собой соединения **85** и **81**. В таблице 14 представлены энергетические дескрипторы значений скоринговой функции ХР для этих соединений.

Таблица 14 - Энергетические термы XP GScore для ROCK-I 5UZJ

№	XP LipEvdW, ккал\моль	XP PhobEn, ккал\моль	XP HBond, ккал\моль	XP Electro, ккал\моль	XP PhobEnHB, ккал\моль	XP GScore, ккал\моль
Native	-4.9	-1.2	-1.2	-0.4	-3.0	-10.7
85	-3.8	-1.2	-0.9	-0.8	-1.5	-8.2
83	-3.9	-1.0	-0.6	-0.2	-1.5	-7.1
82	-3.8	-0.9	-0.7	-0.2	-1.3	-6.9
84	-3.8	-0.8	-0.7	-0.3	-1.0	-6.6
81	-4.0	-0.7	-0.7	-0.3	0.0	-5.8

Во-первых, отметим, что и лидер, и аутсайдер воспроизводят ключевой паттерн связывания, касающийся образования водородной связи с Met156 (рисунок 31).



А – связывание вышеупомянутых структур в активном сайте, В – наложение структур.

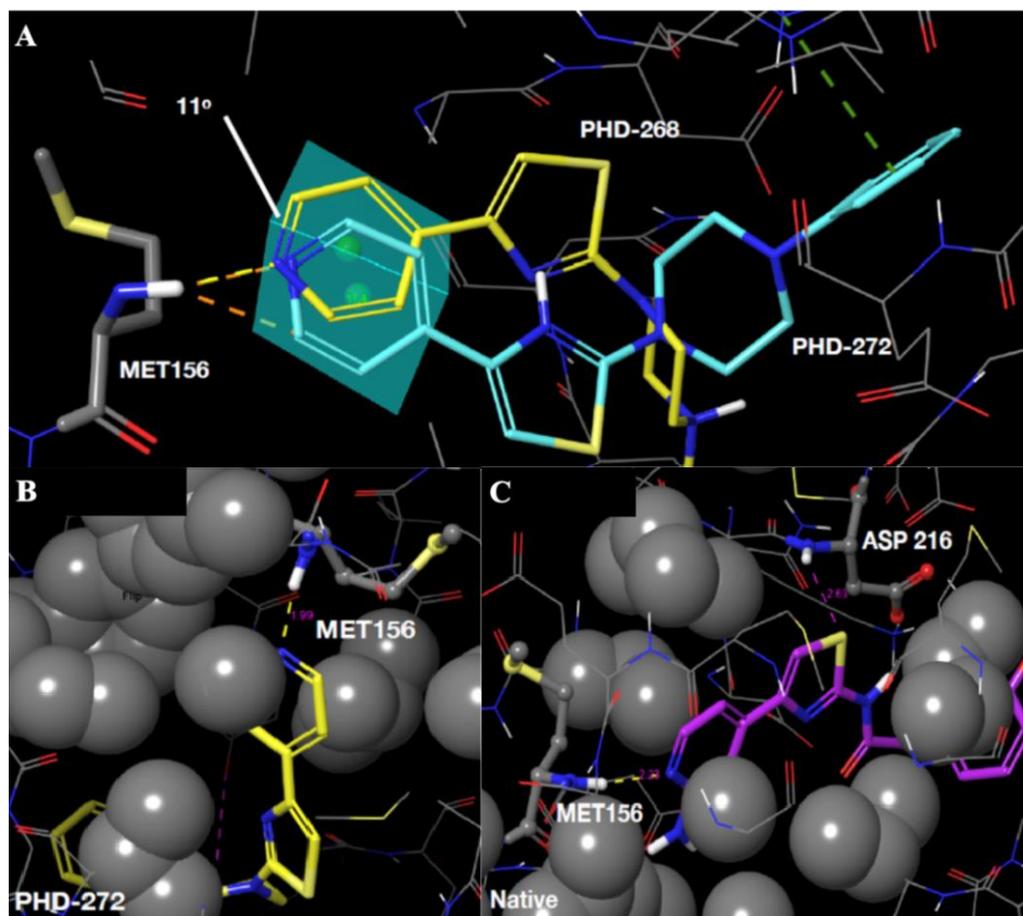
Рисунок 31 – Связывание нативного лиганда, **85** и **81** в сайте ROCK-I (PDB ID: 5UZJ)

При этом максимальные награды за водородную связь с упомянутым выше MET получают нативный лиганд и **85** (дескриптор вклада водородной связи $\chi R \text{ Hbond} = -1.2$ ккал/моль и -0.9 ккал/моль). Если принять геометрию расположения 4-Py фрагмента нативного лиганда за наиболее удачную, то можно отметить (рисунок 28), что **85** более точно воспроизводит данный режим связывания, нежели чем **81**. Длины связи при этом составляют 1.99 Å для **85**, 2.23 и 2.22 Å для нативного лиганда и **81** соответственно.

Здесь же стоит отметить, что водородная связь 4-Py мотива **81** не была идентифицирована как ключевая, возможно из-за неоптимального угла, под которым располагается гетероциклическое кольцо данного соединения, причем Met156 в данном случае образовывал несколько ароматических водородных связей с пиридином.

Невыгодный поворот ключевого мотива **81** в данном случае объясняет нулевой вклад дескриптора, учитывающего водородные связи, образованные в гидрофобном кармане, в отличие от **85** и нативного лиганда.

Во-вторых, коснемся расположения тиазольного мотива. Нативный лиганд простирает тиазольное кольцо в глубине сайта, ориентируя атом азота в пространство, доступное для растворителя. При этом весь гетероцикл занимает гидрофобную область. Похожий режим связывания воспроизводит и **85**, в отличие от **81**, в случае которого мы наблюдаем инверсию ориентации атомов серы и азота (рисунок 32 А и В).



А – связывание **85** и **81** в активном сайте ROCK-I, наложение структур, В – связывание **85** в MET-связывающем кармане, С – связывание нативного лиганда в MET-связывающем кармане. Серые сферы – гидрофобные аминокислоты.

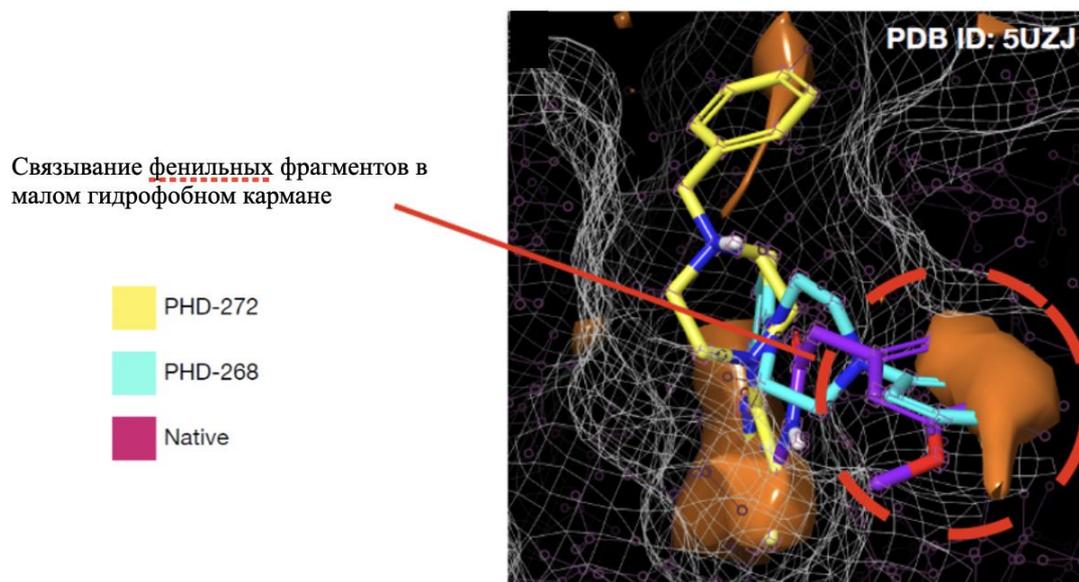
Рисунок 32 – Связывание **85** и **81** в сайте ROCK-I (PDB ID: 5UZJ)

Такой «разворот» приводит к выходу цикла из области благоприятных гидрофобных взаимодействий, что отражается в меньшем вкладе дескриптора гидрофобности XP PhobEn в суммарное значение рассчитанной свободной энергии комплекса для **81**, по сравнению с **85** и нативным лигандом.

Инверсия геометрии тиазольного мотива позволяет соединению **81** подобно нативному лиганду выгодно занять малый гидрофобный карман с помощью фенила (рисунок 32 С), однако и такое связывание не позволяет компенсировать убыль фобического вклада.

Выход тиазольного цикла **81** из гидрофобной области позволяет данной системе выгодно осуществлять ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, что опосредует лучшие значения липофильной энергетической термы данного соединения по сравнению с **85**, в случае которого мы наблюдаем гидрофобную «блокировку» данного мотива.

Ожидалось, что наличие метиленового фрагмента в **85** позволит воспроизвести режим связывания нативного лиганда без напряжения в пиперидиновом цикле, однако иная ориентация бензильного мотива имеет место быть в полученном комплексе: ароматического кольца простирается во внешнюю область (рисунок 33). Проксимальный относительно тиазольного кольца атом азота пиперидинового цикла в протонированной форме может образовывать мостиковое взаимодействие с ASP160. Поляризация пиперидинового азота **85** опосредует самое лучшее значение электростатического энергетического терма из всех (рисунок 34).

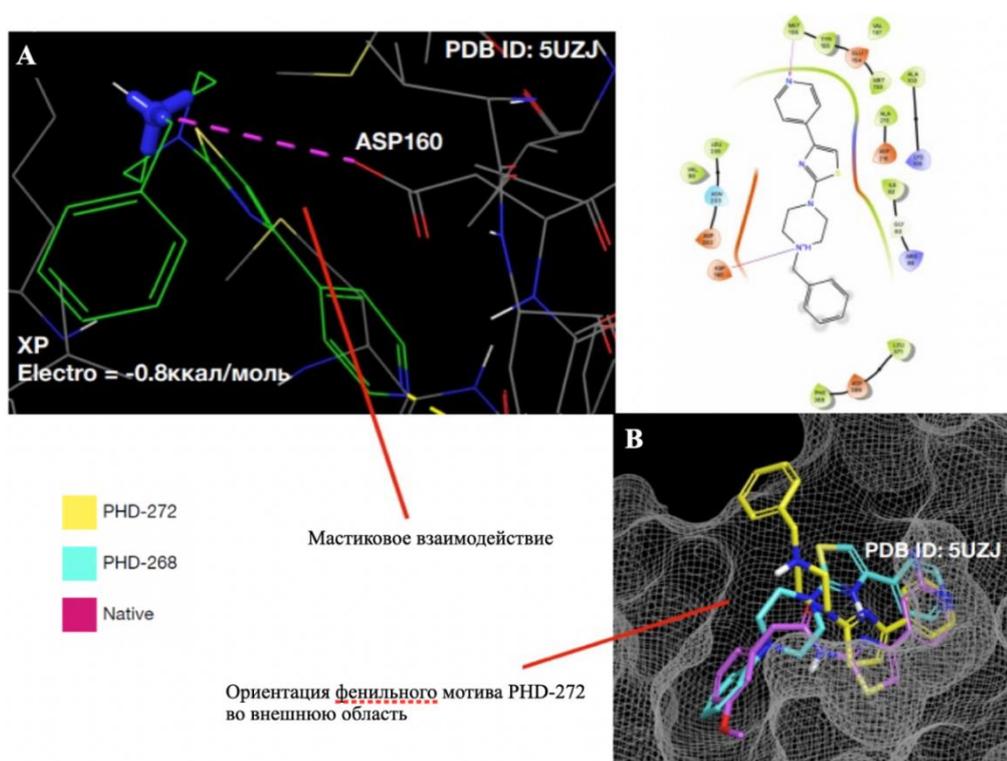


Гидрофобные области показаны оранжевым.

Рисунок 33 – связывание фенильных фрагментов **85**, **81** и нативного лиганда в малом гидрофобном кармане (PDB ID: 5UZJ)

В целях оценить изоформную селективность соединения лидера была выполнена стыковка структуры **85** в комплекс, содержащий ROCK-II изоформу.

Результаты указывают на удовлетворительную селективность лидера для ROCK-I по отношению к ROCK-II (по сравнению с результатами для стыковки в комплексы I-ой изоформы) (таблица 15).



А – образование мостикового взаимодействия пиперазина **85** (слева), 2D-диаграмма взаимодействий **85** (справа). В – связывание **85,81** и нативного лиганда в активном сайте ROCK-I, ориентация фенильного фрагмента лидера во внешнюю область.

Рисунок 34 – Дополнительные аспекты связывания соединения лидера в активном сайте ROCK-I (PDB ID: 5UZJ)

Таблица 15 – Оценка селективности

	PDB ID: 7JOV	PDB ID: 4WOT
№	XP GScore, ккал\моль	XP PhobEn, ккал\моль
Native	-10.982	-12.657
85	- 8.673	-8.804

3 Экспериментальная часть

Все расчеты в рамках выполненной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2021-4.

3.1 Подготовка молекулы белка

Кристаллические структуры киназы ROCK были загружены из Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Всего было загружено 30 структуры: 22 для ROCK-I и 8 для ROCK-II . Белок был подготовлен с использованием модуля мастера подготовки ProteinPreparationWizard. Все молекулы воды и гетероатомы, кроме нативного лиганда, были удалены и атомы водорода были добавлены к кристаллической структуре.

3.2 Нативный докинг

С помощью модуля Receptor Grid Generation в Glide определяется активный сайт для стыковки с лигандом. Нативный докинг был проведен для всех 30 структур. Для анализа режимов стыковки использовались два разных протокола, протокол стандартной точности (SP) и протокол дополнительной точности (XP). Для дальнейшей работы были выбраны комплексы 2ETR, 2ETK, 4YVE, 5KKS, 7JOU, 5BML, 5UZI, 3TV7, 6E9W, 5UZI содержащие ROCK-I; комплексы 4WOT, 6ED6, 7JOV, 7JNT содержащие ROCK-II.

3.3 Подготовка комбинаторной библиотеки

Трехмерные структуры исследуемых соединений были подготовлены с использованием панели сборки Maestro в пакете Schrödinger. Модуль Ligprep был использован для генерации всех возможных состояний исследуемых

лигандов в физиологическом диапазоне рН 7 ± 2 с учетом наименьшей потенциальной энергии конформации лиганда.

3.4 Молекулярный докинг

Молекулярный докинг проводился для 5 структур в активный сайт ROCK I и II. Данные лиганды представляют собой 2-(пиперазин-1-ил)-4-(пиридин-4-ил)тиазолы, обладающие различными ароматическими заместителями у свободного азота пиперазина. Для докинга было выбрано 13 комплексов, содержащих I и II изоформу Rho-киназы. Для анализа режимов стыковки был использован протокол дополнительной точности (XP). Для комплекса 5UZJ, содержащий изоформу ROCK-I был выполнен расширенный докинг с записью энергетических дескрипторов скоринговой функции.

Заключение

С помощью молекулярного докинга были обнаружены качественные белковые структуры, позволяющие осуществлять качественное молекулярное моделирование;

С помощью инструментов молекулярного моделирования проанализированы структурные особенности ингибиторов ROCK. Соединения, содержащие тиазольный скаффолд отмечены как наиболее аффинные.

На основе полученных данных была сконструирована виртуальная библиотека и проведен ее молекулярный докинг. Найдено соединение-лидер 85, содержащее:

- центральный тиазольный скаффолд, обращенный атомом азота во внешнюю полость;
- 4-пиридиновый мотив в четвертом положении тиазола, связывающийся с ключевым Met;
- бензилзамещенный пиперазиновый линкер во втором положении тиазола, моделирующий амидный фрагмент в классических ингибиторах;
- ориентация бензила отличается от ожидавшейся – ароматический мотив ориентирован во внешнюю область.

Результаты докинга в некоторой степени соответствуют результатам *in vitro* тестов. Таким образом обнаружен новый хемотип ингибиторов Rhoкиназ. Определены направления для дальнейшего развития:

- необходимо повысить изоформную селективность по отношению к ROCK2 путем взаимодействий с гейт-кипперами;
- необходимо добиться ориентации бензильного фрагмента соединения 85 в малый гидрофобный карман сайта путем ввода различных заместителей.

Список используемой литературы

1. Тарасова О. С., Гайнуллина Д. К. Rho-киназа как ключевой участник регуляции тонуса сосудов в норме и при сосудистых расстройствах // Артериальная гипертензия. 2017. Т. 23. № 5. С. 383-394.
2. Ćirić S. Z., Pavlovića M. S. et al. Apostlovića et al. Development and design of novel cardiovascular therapeutics based on Rho kinase inhibition—In silico approach // J. Computational Biology and Chemistry. 2019. № 7. P. 55–62.
3. Thiruchelvi R., Shivanika C. In-Silico analysis to identify the potent inhibitor of Rho GTPase activating protein for the usage of the Glaucoma // Materials Today: Proceedings. 2020. № 3. P. 72-80.
4. Sopko N. A., Hannan J. L., Bivalacqua T. J. Understanding and targeting the Rho kinase pathway in erectile dysfunction // Nat. Rev. Urol. 2014. № 11. P. 622–628.
5. Upul K., Jingrong C., Jon H. et al. ROCK inhibitors 3: Design, synthesis and structure-activity relationships of 7-azaindole-based Rho kinase (ROCK) inhibitors // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2018. № 15. P. 2622-2626.
6. Laijun S., Chunyu Z., Wenxin Z. et al. Computational systematic selectivity of the Fasalog inhibitors between ROCK-I and ROCK-II kinase isoforms in Alzheimer's disease // Computational Biology and Chemistry. 2020. № 4. P. 107–118.
7. Nakagawa O., Fujisawa K., Ishizaki T. et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice // FEBS Letters. 1996. № 2. P. 189–193.
8. Sebbagh M., Renvoizé C., Hamelin J. et al. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing // Nature Cell Biology. 2001. № 4. P. 346–352.
9. Riento K., Totty N., Villalonga P. et al. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation // J. The EMBO. 2005. № 6. P. 1170–1180.

10. Rikitake Y., Kim H. H., Huang Z. et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection // *Stroke*. 2015. № 10. P. 2251–2257.
11. Sladojevic N., Yu B., Liao J.K. ROCK as a therapeutic target for ischemic stroke // *Expert Rev. Neurother.* 2017. № 12. P. 1167–1177.
12. Peterson R. T., Schreiber S. L. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family // *Current Biology*. 1999. № 14. P. 521–524.
13. Leung T., Chen X. Q., Manser E., Lim, L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton // *Molecular and Cellular Biology*. 1996. № 10. P. 5313–5327.
14. Amano M., Chihara K., Nakamura N. et al. The COOH Terminus of Rho-kinase Negatively Regulates Rho-kinase Activity // *J. of Biological Chemistry*. 1999. № 45. P. 32418 –32424.
15. Ishizaki T., Maekawa M., Fujisawa K. et al. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase // *The EMBO Journal*. 1996. № 8. P. 1885 –1893.
16. Dong M., Yan B. P., Liao J. K. et al. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases // *Drug Discovery Today*. 2010. № 16. P. 622–629.
17. Dong M., Yan B. P., Liao J. K. et al. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases // *Drug Discovery Today*. 2010. № 15. P. 622–629.
18. Qin Li, Yuhua Chen, Li Sun et al. Vasodilatation produced by Fasudil Mesylate in vivo and in vitro // *Vascular Pharmacology*. 2011. № 6. P. 121–126.
19. Chen, M., Liu, A., Ouyang, Y. et al. Fasudil and it's analogs: a new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders? // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2013. № 4. P. 537–550.

20. Rath N., Olson M. F. Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy // *EMBO rep.* 2012. № 10. P. 900-908.
21. Jacobs M, et al. The Structure of Dimeric ROCK I Reveals the Mechanism for Ligand Selectivity // *Journal of Biological Chemistry.* 2006. № 1. P. 260-268.
22. Song L., Zhu C., Zheng W. et al. Computational systematic selectivity of the Fasalog inhibitors between ROCK-I and ROCK-II kinase isoforms in Alzheimer's disease // *Computational Biology and Chemistry.* 2020. № 10. P. 1-9.
23. Pan P., Shen M., Yu H. et al. Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors // *Drug Discovery Today.* 2013. № 23. P. 1323–33.
24. Yamaguchi H. et al. Structural Basis for Induced-Fit Binding of Rho-Kinase to the Inhibitor Y-27632 // *The Journal of Biochemistry.* 2006. № 3. P. 305-311.
25. Fang X. Y. Yin Y.T. et al. Tetrahydroisoquinoline derivatives as highly selective and potent Rho kinase inhibitors // *J. Med. Chem.* 2010. № 15. P. 5727-5737
26. Hu Z., Wang C., Glunz P. W. et al. Discovery of a Phenylpyrazole Amide ROCK Inhibitor as a Tool Molecule for in vivo Studies // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2020. № 95. P. 1– 4.
27. Green J., Cao J., Bandarage U. K. et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships of Pyridine-Based Rho Kinase (ROCK) Inhibitors // *Journal of Medicinal Chemistry.* 2015. № 12. P. 5028–5037.
28. Ma S., Wang L., Ouyang B. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Aryl-5-aminoalkyl-thiazole-2-amines Derivatives as ROCK II Inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2020. № 3. P. 1-8
29. Bandarage U. K., Cao J., Come J. H. et al. ROCK inhibitors 3: Design, synthesis and structure-activity relationships of 7-azaindole-based Rho kinase

(ROCK) inhibitors // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2018. № 15. P. 2622–2626.

30. Gao H., Marhefka C., Jacobs M. D. et al. ROCK inhibitors 2. Improving potency, selectivity and solubility through the application of rationally designed solubilizing groups // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2018. № 15. P. 2616–2621.

31. Miao Z., Sun Y., Zhao L. et al. Discovery of Thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one Derivatives as a New Class of ROCK Inhibitors // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2020. № 66. P. 1-6.

32. RCSB Protein Data Bank (PDB). URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 13.09.2021).

33. Sastry G. et al. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments // Journal of Computer Aided Molecular Design. 2013. № 3. P. 221-234.

34. Schrodinger: Protein Preparation Wizard. An easy-to-use tool for correcting common structural problems and creating reliable, all-atom protein models. URL: <https://www.schrodinger.com/science-articles/protein-preparation-wizard> (дата обращения 11.05.2021).

35. Schrodinger: Glide. A complete solution for ligand-receptor docking. URL: <https://www.schrodinger.com/products/glide> (дата обращения 11.05.2021).

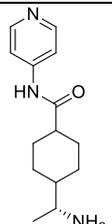
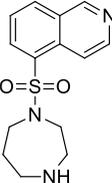
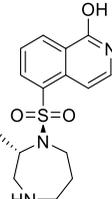
36. Friesner R. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy // Journal of Medicinal Chemistry. 2004. № 7. P. 1739-1749.

37. Friesner R. et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes // Journal of Medicinal Chemistry. 2006. № 21. P. 6177-6196.

Приложение А

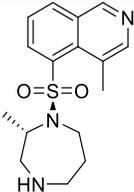
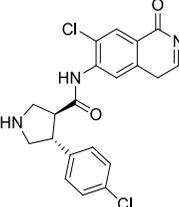
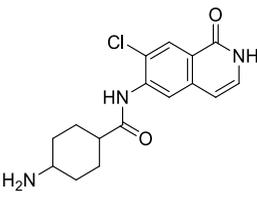
Результаты нативного и молекулярного докинга

Таблица А.1 – Результаты нативного докинга

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
1		2ETR	2.60	ROCK1	-7.525	-7.257	-7.322	-7.096	0.378	0.383	0.360	0.375	ASP216 (A) ASN203 (A) MET156 (D)
2		2ESM	3,20	ROCK1	-9.319	-9.531	-9.004	-9.843	0.415	0.495	1.401	1.416	MET156 (D) ASP160 (A)
3		2ETK	2,96	ROCK1	-9.531	-9.960	-6.786	-6.212	0.484	0.495	0.559	0.584	MET156 (D) ASP216 (A) GLU154 (A)

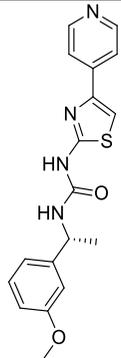
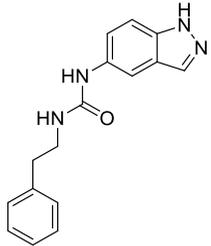
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
4		3D9V	3.30	ROCK1	-8.668	-10.838	-7.048	-9.640	3.162	0.447	0.923	0.711	МЕТ156 (Д)
5		3NDM	3.30	ROCK1	-8.976	-7.630	-8.584	-9.580	1.047	1.017	2.534	2.515	МЕТ156 (Д)
6		3NCZ	3.00	ROCK1	-9.922	-	-9.751	-11.551	0.533	-	1.201	1.155	ASN203 (А) МЕТ156 (Д) LYS105 (Д) GLU154 (А)

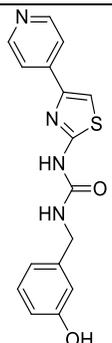
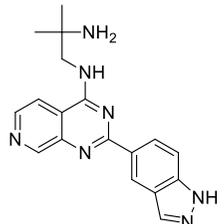
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
7		3TV7	2,75	ROCK1	-9.227	-	-5.839	-	0.440	-	4.079	-	ASP216 (А) LYS105 (Д) MET156 (Д)
8		3V8S	2,29	ROCK1	-10.167	-10.310	-9.611	-10.247	0.352	0.421	0.555	0.582	ASP116 (А) MET156 (Д) GLU154 (А)

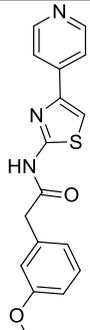
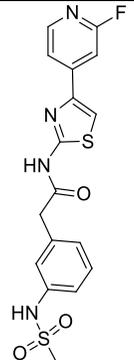
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP						
9		3TWJ	2.90	ROCK1	-	-	-7.811	-8.712	-	-	1.084	1.054	MET156 (Д) LYS105 (Д)
10		4W7P	2.80	ROCK1	-10.120	-	-9.913	-	0.468	-	0.395	-	MET156 (Д) ASP160 (А) LYS105 (Д) GLU154 (А)

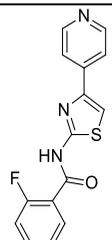
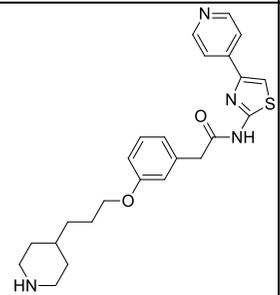
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP						
11		4YVE	3.40	ROCK1	-10.675	-10.693	-9.681	-10.319	0.348	0.469	0.481	0.478	MET156 (Д) LYS105 (Д) PHE87 (Д)
12		5BML	2.95	ROCK1	-10.436	-10.420	-9.795		0.441	0.536	1.077		MET156 (Д) LYS105 (Д) PHE87 (Д)

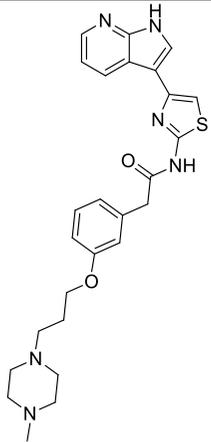
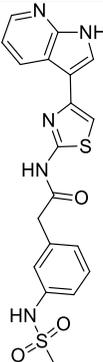
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
13		4YVC	3.20	ROCK1	-8.995		-8.101		0.258		0.250		LYS105 (Д) MET156 (Д)
14		5HVU	2.80	ROCK1	-10.831	-11.912	-10.001	-11.697	1.062	0.694	1.088	0.987	ASP117 (А) LYS105 (Д) MET156 (Д)

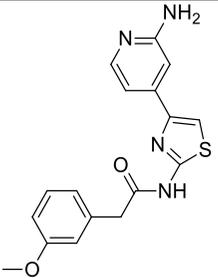
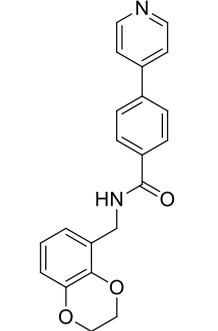
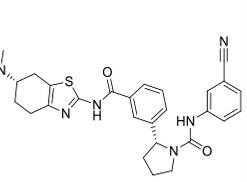
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
15		5KKT	2.80	ROCK1	-12.750		-12.408	-15.550	0.251		1.858	1.957	MET156 (Д) LYS105 (Д) PHE87 (Д) GLU154 (А)
16		5KKS	3.30	ROCK1	-11.798	-13.861			0.441	0.375			MET156 (Д) LYS105 (Д) PHE87 (Д) GLU154 (А) GLY88 (Д)

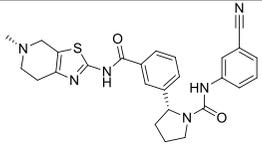
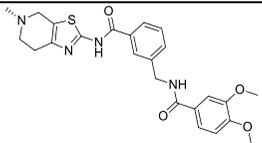
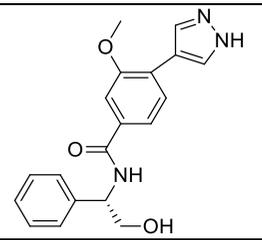
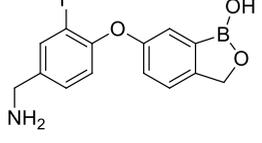
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP						
17		5UZJ	3.30	ROCK1			-10.467				0.627		LYS105 (Д) PHE87 (Д) MET156 (Д) MET156 (А)
18		6E9W	2.96	ROCK1	-10.934		-10.205		0.297		0.266		LYS105 (Д) PHE87 (Д) MET156 (Д)
19		5WNG	2.90	ROCK1	-11.327	-10.965	-10.804	-9.148	0.471	0.455	0.397	0.764	ASP117 (А) LYS105 (Д) MET156 (Д) PHE87

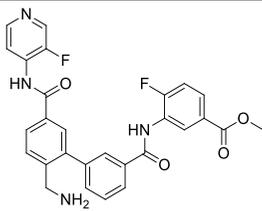
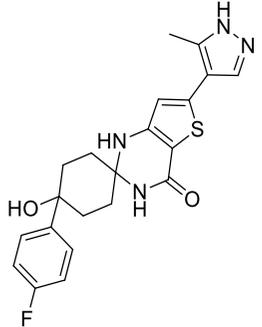
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
20		5WNH	3.10	ROCK1	-9.470	-9.018	-9.005		0.352	0.382	0.768		MET156 (Д) PHE87 (Д)
21		5WNE	2.60	ROCK1	-8.683	-7.833	-7.979	-7.710	0.419	0.469	0.731	0.722	PHE87 (Д) LYS105 (Д)
22		7JOU	3,32	ROCK1	-9.416	-10.311	-9.408	-10.584	0.233	0.241	0.419	0.386	MET156 (Д) LYS105 (Д) GLU154 (А)
23		4L6Q	2.79	ROCK2	-9.841	-6.656	-9.360	-6.549	0.276	0.347	0.279	0.311	ASN219 (А) MET172 (Д) GLU170 (А)

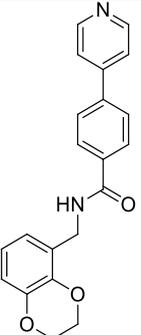
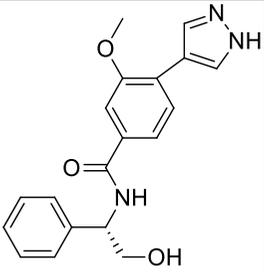
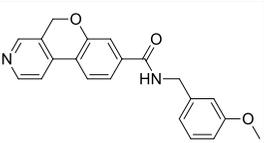
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP						
24		4WOT	2,93	ROCK2	-11.419	-12.085	-11.596	-12.657	0.705	0.427	0.955	0.779	PHE103 (Д) MET172 (Д) ASP232 (А) ASN219 (А)
25		5U7R	3,33	ROCK2	-7.907	-	-8.675		0.802	-	1.871	-	ASP232 (А) MET172 (Д) GLU170 (А)

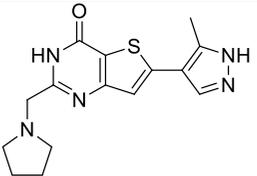
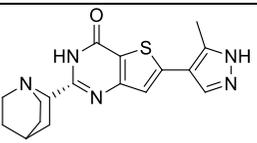
Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP						
26		6ED6	2,86	ROCK2	-11.214	-	-10.641	-11.212	0.172	-	0.213	0.218	PHE103 (Д) LYS121 (Д) MET172 (Д)
27		7JOV	2,59	ROCK2	-10.935	-10.876	-10.170	-10.982	0.349	0.445	0.511	0.510	LYS121 (Д) MET172 (Д) GLU170 (А) ARG100 (А)
28		7JNT	2.21	ROCK2	-10.729	-	-	-	0.313	-	-	-	PHE103 (Д) LYS121 (Д) MET172 (Д)

Продолжение Приложения А

Продолжение таблицы А.1

№	Структура	PDB	Resolutio n, Å	Белковая мишень	Результаты нативного докинга								Основны е взаимоде йствия
					Glide gscore				RMSD, Å				
					Rigid		Flexible		Rigid		Flexible		
					SP	XP	SP	XP	SP	XP	SP	XP	
29		6P5M	2,65	ROCK2	-7.708	-7.606	-	-	0.184	1.715	-	-	ASP232 (A) LYS121 (Д) GLU170 (A)
30		6P5P	3.30	ROCK2	-7.356	-	-7.792	-	1.167	-	1.722	-	ASP232 (A) GLU170 (A)