

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)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

## ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Молекулярный дизайн ингибиторов ULK1/2 киназы

Обучающийся

А.В. Тестова

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

канд. биол. наук Д.А. Хоченков

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

А.Ю. Кудинов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Тольятти 2023

## Аннотация

Целью данной работы является поиск новых ингибиторов ULK1/2 киназы среди коммерческих библиотек и их моделирование.

В литературном обзоре изложено раскрытие понятия аутофагии, ее сигнальный путь, в котором ключевым составляющим фрагментом является ULK1/2 киназа, а также была рассмотрена ее роль во внутриклеточных процессах. Большое внимание было уделено разработанным ингибиторам ULK1/2.

Во второй части работы были осуществлены расчетные исследования, которые заключались в подборе кристаллических структур белка, их подготовке и дальнейшем проведением нативного докинга на 5 коммерческих библиотеках. Также было проведено *in vitro* исследование на репортерной клеточной линии НЕК 293, экспрессирующая внедренную плазмидную ДНК (Autophagy LC3-NiBiT Reporter). В ходе данного биологического испытания удалось выделить соединения, ингибирующие аутофагию.

Третья часть содержит описание методики проведенных расчетных и *in vitro* исследований. Были проведены работы по подготовке молекулы белка, генерации грид-сеток, нативному докингу, подготовке виртуальной библиотеки и виртуальному скринингу. Для *in vitro* исследования были описаны используемые реагенты и оборудования, процесс культивирования клеток, получение клональных клеточных линий и этапы проведения скрининга соединений на репортерной клеточной линии НЕК293 LC3-NiBiT.

В ходе проведения молекулярного докинга были идентифицированы соединения-лидеры, а при анализе результатов *in vitro* исследование было выделено 7 перспективных соединений-ингибиторов ULK1/2.

Работа изложена на 150 страницах, содержит 25 рисунков, 7 таблиц и приложение.

## **Abstract**

The title of the graduation work is «Molecular design of ULK1/2 kinase inhibitors».

The senior paper consists of an introduction, three parts, a conclusion, tables, list of references including foreign sources and supplement to the graduation work.

The key issue of the thesis is the conducting a virtual screening on five different commercial libraries and searching for new ULK1/2 kinase inhibitors.

The aim of this work is to search for new inhibitors of ULK1/2 kinase among commercial libraries and to model them.

The graduation work may be divided into several logically connected parts which are: literature review, results and their discussion and experimental part.

Finally, we present the work on ULK1/2 inhibitors.

In conclusion we'd like to highlight the topicality of this work as such compounds can be used in the further development of new remedies.

## Содержание

|   |    |
|---|----|
| Введение.....                                       | 8  |
| 1 Литературный обзор.....                           | 9  |
| 1.1 Аутофагия.....                                  | 9  |
| 1.2 Строение ULK 1/2 .....                          | 19 |
| 1.3 Молекулярное моделирование .....                | 23 |
| 1.4 Ингибиторы ULK 1/2 и подходы к синтезу.....     | 31 |
| 2 Результаты и их обсуждение .....                  | 42 |
| 2.1 Аннотирование и подготовка библиотеки.....      | 44 |
| 2.2 Выбор белковых мишеней .....                    | 46 |
| 2.3 Нативный докинг.....                            | 47 |
| 2.4 Виртуальный скрининг .....                      | 55 |
| 2.5 Результат <i>in vitro</i> исследования .....    | 73 |
| 3 Экспериментальная часть.....                      | 76 |
| 3.1 Компьютерное моделирование .....                | 76 |
| 3.2 Биологические испытания.....                    | 78 |
| Заключение .....                                    | 82 |
| Список используемой литературы .....                | 83 |
| Приложение А Результаты виртуального скрининга..... | 91 |

## Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями.

|               |  |
|---------------|--|
| Rab 7         | поздняя эндосомно-лизосомно-ассоциированная малая GTPase |
| Rab5          | ранняя эндосомно-лизосомно-ассоциированная малая GTPase  |
| Ras           | белок, кодируемый малые G-белки (малые GTPase)           |
| GTPase        | гуанозинтрифосфотаза                                     |
| Nbr1          | рецептор распознавания «груза» аутофагии                 |
| Hsc70         | белок теплового шока 70                                  |
| LAMP          | лизосомально-ассоциированный мембранный белок            |
| ULK1          | unc-51-подобная киназа 1                                 |
| ULK2          | unc-51-подобная киназа 2                                 |
| PI3KC3-C1     | класс III фосфотидилинозитол-3-киназный комплекс I       |
| PI3KC3        | фосфотидилинозитол-3-киназы 3 типа                       |
| FIP200        | белок фокальной адгезии                                  |
| ATG13,10, 101 | факторы аутофагии  |
| HORMA         | белковый домен, распознающий состояние хроматина         |
| mTORC1        | мишень рапамицинового комплекса I                        |
| АМРК          | АМР-активируемая протеинкиназа                           |

|                |   |
|----------------|---|
| AMP            | аденозинмонофосфот  |
| TSC2           | туберин   |
| Vps34          | фосфотидилинозитол-3-киназа   |
| AMBRA1         | белок аутофагии, регулирует экспрессию генов                          |
| Cul3           | белок куллин-3, участвующий в полиубиквитинизации белковых субстратов |
| KLHL20         | Kelch-подобный белок 20   |
| Beclin-1       | белок клеточной системы аутофагии                                     |
| HER2           | фактор эпидермального роста   |
| HIF-1 $\alpha$ | фактор, индуцируемый гипоксией  |
| Bcl-2          | регулятор апоптоза  |
| BNIP3          | член семейства апоптотических белков Bcl-2                            |
| NIX            | проапоптотический ген   |
| STAT3          | активатор транскрипции  |
| pSTAT3         | фосфорилированная форма белка STAT3                                   |
| CTL            | цитотоксические Т-клетки  |
| Atg1           | ген, кодирующий фермент аргиназу                                      |
| COPII          | белковый каркас, транспортирующий бели из ER в аппарат Гольджи        |
| ER             | эндоплазматический ретикулум  |
| SEC16A         | фактор экспорта ER  |
| Syn-GAP1       | синаптический Ras GTPase-активирующий белок 1                         |

|        |   |
|--------|---|
| NGF    | фактор роста нервов                             |
| PI3P   | фосфотидилинзитол трифосфат                     |
| ATF4   | активирующий транскрипционный фактор 4          |
| HDAC6  | гистондеацетилаза 6                             |
| CAG    | цитозин-аденин-гуанин                           |
| HTT    | гентингтин                                      |
| polyQ  | полиглутамин                                    |
| БП     | болезнь Паркинсона                              |
| PINK1  | митохондриальная серин/треонин протеинкиназа    |
| MIM    | внутренняя мембрана митохондрий                 |
| OMM    | внешняя мембрана митохондрий                    |
| Parkin | E3-убиквитинлигаза                              |
| A549   | клетки карциномы легкого человека               |
| PDK1   | протеин-3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа |
| АКТ    | протеинкиназа В                                 |
| PKB    | семейство протеинкиназ В                        |

## Введение

В настоящее время многие ученые в области медицинской химии занимаются разработкой низкомолекулярных высокоэффективных ингибиторов протеинкиназ. Серин/треонин протеинкиназы ULK1/2 могут служить перспективной терапевтической мишенью в данной области. Как известно, данные киназы участвуют в регуляции процесса аутофагии в клетках и, в свою очередь, аутофагия связана с растущим числом патологических состояний, включая рак и нейродегенеративные расстройства [1]. Для предотвращения этих заболеваний важно приостановить данный процесс. Так как киназы ULK1/2 являются основополагающими участниками в индукции аутофагии, их ингибирование принесет терапевтический эффект.

Вследствие этого существует необходимость в разработке селективных ингибиторов ULK1/2. С помощью молекулярного докинга можно быстро смоделировать поведение лиганда, предсказать энергию взаимодействия и некоторые физико-химические свойства соединений. Также с помощью молекулярного докинга можно обработать большое количество соединений, которое в ручную проверить было бы невозможно.

**Цель работы:** поиск новых ингибиторов ULK1/2 киназы среди коммерческих библиотек и их моделирование.

**Задачи работы:**

1. Провести подготовку и дальнейший анализ кристаллических комплексов ULK1/2;
2. Провести аннотирование и подготовку лигандов из коммерческих библиотек ChemDiv;
3. Провести виртуальный скрининг, проанализировать результаты;
4. Провести *in vitro* исследование соединений с помощью репортерной системы LC3-NiBiT.



# 1 Литературный обзор

## 1.1 Аутофагия

Аутофагия – это процесс лизосомной деградации крупных биополимеров, ДНК, РНК, поврежденных и устаревших органоидов клетки до их мономеров – аминокислот, жирных кислот, нуклеотидов, которые могут быть возвращены обратно в цитозоль и потребляться для нужд клетки. В основном аутофагия активируется в ответ на стресс или неблагоприятные условия, в частности на недостаток питательных веществ. Вследствие расщепления молекул, клетка получает необходимые для выживания соединения. Аутофагия является естественным процессом, который регулируется клеткой самостоятельно [1].

В определённых случаях аутофагия способна подавлять развитие онкогенеза путём торможения пролиферации клеток, а в большинстве случаев способствует поддержанию жизнеспособности клеток во время онкогенеза: раковые клетки способны индуцировать аутофагию для выживания в условиях стресса. Механизмы, при которых аутофагия способствует развитию рака, включает в себя подавление индукции белка-супрессора опухоли p53 и поддержание метаболической функции митохондрий.

Клетки определённых тканей, например печени, мозга и мышц, в особенности зависимы от аутофагии, так как этот процесс позволяет избежать накопления повреждённых митохондрий и белковых агрегатов. Накопление дефектных митохондрий вследствие патологической регуляции аутофагии может нарушить метаболизм и спровоцировать окислительный стресс [2].

Главное место в процессе аутофагии занимает образование аутофагосом, двухмембранных пузырьков, которые отвечают за доставку цитоплазматического материала к лизосомам [3].

Существует три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия, шаперон-опосредованная аутофагия [4].

### **1.1.1 Типы аутофагии**

Наиболее распространённой формой аутофагии является макроаутофагия. Во время этого процесса субстраты в ходе деградации секвестрируются внутри аутофагосом. В качестве субстратов для макроаутофагии служат повреждённые органеллы, различные цитозольные белки и инвазивные микробы, попавшие внутрь клетки. После деградации продукты распада возвращаются обратно в цитозоль для вторичного использования в виде мономеров, образовавшихся из крупных молекул, в качестве источников энергии для поддержания жизнеспособности клетки в неблагоприятных условиях и для защиты клетки в стрессовых состояниях.

Макроаутофагия подразделяется на селективную и неселективную. Селективная аутофагия нацелена на повреждённые или избыточные органеллы. В случае селективной макроаутофагии мембранносвязанные везикулы нацелены на конкретные грузы (белковые агрегаты), также участвует грузовой лиганд (молекулярный объект на поверхности груза, который распознаётся рецептором), рецептор и каркас.

В зависимости от органа, макроаутофагия подразделяется на: митофагию и пексофагию. Митофагия – избирательная деградация повреждённых митохондрий. Пексофагия происходит когда среда грибов меняется с олеиновой кислоты или метанола, где размножаются пероксисомы, на среду с глюкозой или азотным голоданием.

Неселективная макроаутофагия используется для обновления объёма цитоплазмы в условиях голодания [5].

Микроаутофагия в отличие от других типов аутофагии имеет более разнообразные морфологию и молекулярные механизмы. На сегодняшний день известны три типа микроаутофагии в зависимости от от поглощения поглощения оргanelл: микроаутофагия с лизосомным выпячиванием, эндосомальная инвагинация, лизосомальная инвагинация.

Микроаутофагии через механизм лизосомальной инвагинации происходит во время эмбриогенеза у млекопитающих. На стадии эмбриогенеза зародыш нуждается в поляризованных клетках, окружающих эпибласт и внеэмбриональную эктодерму, которая называется висцеральной энтодермой. Она служит для передачи сигналов и формирования нормального паттерна для дифференцировки клеток. Висцеральная энтодерма обладает специализированной органеллой, называемой апикальной вакуолью. Она содержит в себе лизосомальные ферменты и мембранные белки. Апикальная вакуоль включает эндосомы с помощью процесса микроаутофагической инвагинации, которая зависит от малой ГТФ-азы Rab7.

При лизосомальном выпячивании, лизосома расширяется вокруг части цитоплазмы с другими органеллами с последующей деградацией содержимого.

Эндосомальная инвагинация обладает несколькими адапторными белками (Nbr1 и Hsc70) для селективного рекрутирования цитозольных белков на поверхность эндосомы [6].

Шаперон-опосредованная аутофагия предполагает лизосомальный путь протеолиза, который отвечает за деградацию 30% цитозольных белков в условиях длительного дефицита питательных веществ. Шапероны в цитозоле и в просвете лизосом стимулируют этот протеолитический путь. Шапероны в цитозоле разворачивают белки-субстраты до их транслокации через лизосомальную мембрану, а шапероны в просвете лизосом, необходимы для протягивания белка-субстрата через лизосомальную мембрану. Одним из

важных компонентов для данного типа аутофагии является рецептор в лизосомальной мембране, лизосомально-ассоциированный мембранный белок (LAMP) типа 2A [7].

Селективность шаперонной аутофагии обуславливается наличием пентапептидного мотива в аминокислотной последовательности белка-субстрата, который при распознавании цитозольным шапероном приводит к нацеливанию субстрата на лизосомы. Мотив всегда окружён глутамином и содержит один кислотный остаток (аспаргиновая или глутаминовая кислоты), основной остаток (лизин или аргинин), гидрофобный остаток (фенилаланин, изолейцин, лейцин или валин), а также присутствует пятый остаток, который может быть основным или гидрофобным, но не должен иметь отрицательного заряда. Мотив не зависит от того, где он может быть расположен в белке (N-конец, C-конец или внутри белка). Данные последовательности присутствуют в 30% цитозольных белков. Распознавание белков-субстратов происходит в цитоплазме родственным с белком теплового шока 70 (hsc 70) с пентапептидным мотивом. Оказавшись на поверхности лизосом, комплекс субстрат-шаперон связывается с мембраной и после разворачивания субстрата перемещается в просвет лизосомы для дальнейшей деградации [8].

### **1.1.2 Механизмы регуляции аутофагии**

В инициации аутофагии принимают участие два белковых комплекса: протеинкиназный комплекс ULK1 и PI3KC3-C1 (класс III фосфатидилинозитол-3-киназный комплекс I) липидкиназный комплекс. Активация аутофагии начинается с комплекса ULK1.

Комплекс ULK1 состоит из самого ULK1 и некаталитических субъединиц FIP200, ATG13 и ATG10, содержащие домены HORMA [9].

FIP200 – спиральный белок фокальной адгезии массой 200 кДа. Является субъединицей комплекса ULK1. Во время избирательной аутофагии, рецептор аутофагии может напрямую рекрутировать комплекс

ULK1 в непосредственной близости от целевого груза (белка или органеллы) для инициации аутофагии путем взаимодействия с субъединицей FIP200, выступающей в качестве каркасного белка [10]. ATG13 – это фактор аутофагии, взаимодействует с ATG101 с образованием димера. Этот димер участвует в сборке аутофагосом.

Мишень рапамацинового комплекса 1 (mTORC1) выступает в качестве мощного репрессора аутофагии у всех эукариот. mTORC1 ингибируется в условиях отсутствия питательных компонентов «датчиком энергии» АМПК и передачей сигналов аминокислот. В данных условиях голодания ULK1 подвергается аутофосфорилированию и фосфорилирует нижележащие ATG13 и FIP200, образуя общий киназный комплекс ULK1. В условиях достаточного или избыточного количества питательных веществ mTORC1 активен и способен ингибировать аутофагию путём фосфорилирования субъединиц ATG13 и ULK1, активность киназы ULK1 при этом подавляется [11].

Существует другой способ инициации аутофагии, который происходит параллельно с регулированием mTORC1. Когда в клетке истощаются энергетические запасы, происходит накопление аденозинмонофосфата (АМФ). Увеличение концентрации АМФ приводит к активации АМПК. АМПК – Активируемая аденозинмонофосфатом протеинкиназа, фермент, играющий роль в поддержании энергетического гомеостаза в клетке. После активации АМПК, она способна ингибировать процесс синтеза белка. АМПК фосфорилирует TSC2 (туберин), а активный TSC2, в свою очередь, ингибирует mTORC1, что приводит к индукции аутофагии. Также, АМПК может напрямую профосфорилировать ULK1 по нескольким сайтам, что приводит к активации ULK1.

Когда комплекс ULK1 собран, происходит фосфорилирование нижестоящих субъединиц, что приводит к сборке аутофагосомы, рекрутированию субстрата для деградации, расщепления веществ в аутофаголизосомах и высвобождению продуктов деградации в цитозоль.

ULK1 в качестве киназы фосфорилирует свои белки-субстраты по остаткам серина. Ключевой мишенью фосфорилирования ULK1 является комплекс PIK3C3/Vps34. PIK3C3 – каталитическая субъединица фосфатидилинозитол-3-киназы третьего типа представляет собой ферментную субъединицу, которая у человека кодируется геном PIK3C3. PIK3C3/Vps34 представляет собой комплекс липидкиназы Vps34 и ее ферментативного продукта фосфатидилинозитол-3-фосфат. Этот комплекс необходим для рекрутирования нескольких дополнительных компонентов аутофагии, которые будут участвовать в формировании аутофагосом [12].

После фосфорилирования PIK3C3 по AMBRA1 – компоненту комплекса PIK3C3/Vps34, из сети микротрубочек высвобождается комплекс AMBRA1-PIK3C3. Этот свободный конъюгат перемещается в сайты инициации аутофагии на эндоплазматическом ретикулуме. AMBRA1-PIK3C3 затем иницирует сборку аутофагосом.

Чтобы остановить передачу сигнала по каскаду аутофагии, клетка должна убиквитинировать ULK1. Процесс убиквитинирования контролируется Cul3-KLHL20- убиквитин лигазой [13]. При присоединении убиквитин лигазы к ULK1, киназа ULK1 не способна образовывать комплекс с адаптерными белками, следовательно дальнейшая передача сигнала по каскаду прекращается и аутофагия прекращается. Помеченная ULK1 отправляется в протеасому, где она подвергнется протеолизу [14]. На рисунке 1 представлен механизм регуляции аутофагии.

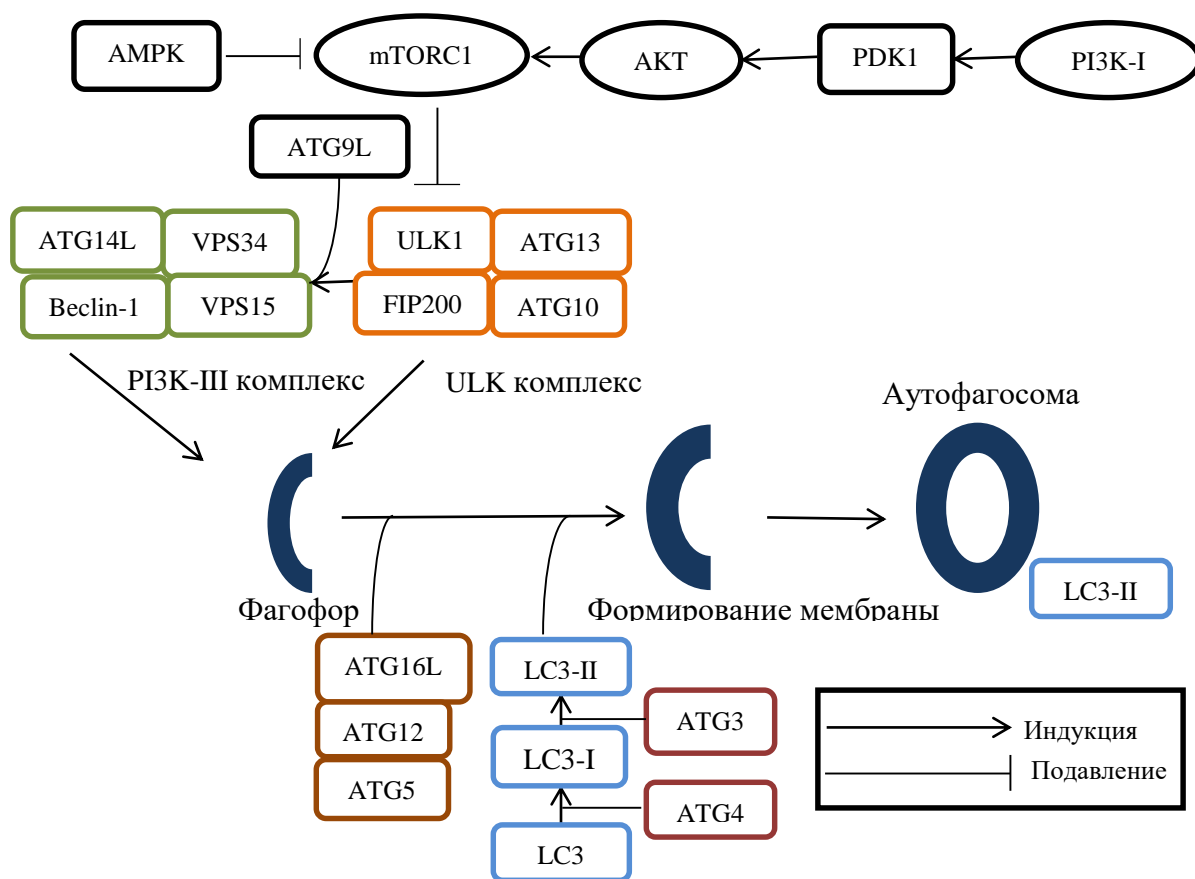


Рисунок 1 – Механизм индукции аутофагии

### 1.1.3 Индукция и подавление аутофагии как терапевтические стратегии

Аутофагия играет двоякую роль в развитии раковых клеток, поскольку она может либо способствовать, либо подавлять выживание и пролиферацию клеток в микроокружении опухоли. Процесс деградации белка в ходе аутофагии приводит к повторному использованию аминокислот, что обеспечивает достаточное количество аминокислотных субстратов для выживания и пролиферации клеток. Раковые клетки склонны активировать аутофагию посредством метаболического перепрограммирования. В типичном случае опухолевые клетки активируют AMPK, который регулирует клеточный метаболизм, для поддержания энергетического гомеостаза. Активированная AMPK регулирует зависимую от аутофагии систему рециркуляции аминокислот в сотрудничестве с FIP200 и ULK1. Кроме того,

фосфорилирование АМПК подавляет опосредованную mTORC1 и активацию TSC2. В условиях достаточного количества питательных веществ повышенная активность mTOR предотвращает активацию ULK1 путем фосфорилирования ULK1, тем самым нарушая взаимодействие между ULK1 и АМПК [15].

Белок Beclin-1, который кодируется геном *BECN1*, связан с инициацией аутофагии, участвует в образовании аутофагосом и ряда других клеточных процессов, таких как развитие, старение, адаптация к стрессу и гибель клеток. Кроме того, Beclin-1 модулирует возникновение и прогрессирование рака, регулируя активность аутофагии путем взаимодействия с другими медиаторами аутофагии, такими как АТG, mTOR, PI3K3. Beclin-1 регулирует аутофагическую активность в направлении подавления онкогенеза, а снижение его экспрессии вызывает пролиферацию рака и онкогенез. Также он индуцирует аутофагию и ингибирует опосредованный рецептором 2 эпидермального фактора роста человека (HER2) онкогенез. С другой стороны, HER2 связывает Beclin-1 и подавляет аутофагию, а затем индуцирует онкогенез клеток рака молочной железы [16].

Раковые клетки изменяют свой метаболизм, чтобы сохранять способность неограниченно пролиферировать и выживать в достаточно неблагоприятных условиях. Для своего выживания клетки опухоли должны противостоять воздействию иммунной системы, условиям гипоксии и недостатка питательных веществ из-за малого количества сосудов вокруг опухоли. Следовательно, клетки опухоли должны сдвигать свой метаболизм в сторону распада веществ, находящихся в цитозоле, благодаря чему у них появляется внутренний резерв материалов для синтеза белков, нуклеиновых кислот, восполнения энергетических затрат [17].

Одним из путей, активирующих аутофагию является лишение клеток кислорода. Когда клетка попадает в условия гипоксии, происходит активация и стабилизация фактора транскрипции HIF-1 $\alpha$ . С помощью этого



фактора происходит активация транскрипции нескольких генов, которые участвуют в разных сигнальных путях, поддерживающих кислородный и энергетический гомеостаз. Опосредованная гипоксией аутофагия широко изучалась учеными, однако некоторые детали сигнальных механизмов взаимодействий между HIF-1 $\alpha$  и аутофагией остались неясными. Известно, что HIF-1 $\alpha$  участвует в регуляции ключевых генов, ответственных за образование и прогрессирование аутофагосом, включая Bcl-2, Beclin 1, BNIP3-подобный (BNIP3L)/NIX, PI3K $\beta$ , ATG7, ATG5 и ATG9A.

При недостатке кислорода происходит ингибирование mTOR, что ведет к активации аутофагии через комплекс Ulk1. Однако аутофагия сама по себе может также регулировать стабильность HIF-1 $\alpha$ . Воздействие HIF-1 $\alpha$  на аутофагию происходит посредством регуляции BNIP3 и Bcl-2.

BNIP3 – это белок 3, взаимодействующий с белком BCL2/аденовируса, представляет собой белок, который у человека кодируется геном *BNIP3*. Данный белок принадлежит к семейству белков Bcl-2, участвующих в апоптозе. BNIP3 может способствовать как активации апоптоза, так и его подавлению.

Белки семейства Bcl-2 участвуют в апоптозе, и также могут способствовать его индукции, тогда белок является проапоптотическим, или его ингибированию – антиапоптотический белок. Непосредственно сам Bcl-2 является негативным регулятором апоптоза.

HIF-1 $\alpha$  гиперактивирует аутофагию за счет увеличения экспрессии BNIP3. BNIP3 нарушает взаимодействие между комплексом Beclin-1/Bcl-2, так как Beclin-1 имеет более высокое сродство к BNIP3. В присутствии активного Bcl-2 комплекс Beclin-1 с VPS34 не может собраться и инициировать аутофагию. В условиях гипоксии происходит гиперэкспрессия транскрипционного фактора HIF1 $\alpha$ , что ведет к увеличению уровня BNIP3 и повышенной индукции аутофагии, которая способствует выживанию клеток. Исследования показали, что полное подавление экспрессии BNIP3

полностью ингибирует индукцию аутофагии, что приводит клетку к апоптозу в условиях гипоксии. Было обнаружено, что BNIP3 избыточно экспрессируются в клетках карциномы молочной железы при гипоксической индукции [18].

Аутофагия способна помогать опухолевым клеткам уклоняться от контроля со стороны иммунной системы. Аутофагия, которая индуцирована в условиях гипоксии, способна контролировать уровень фосфорилированного STAT3 в опухолевых клетках, что приводит к нарушению уничтожения злокачественных клеток, которое обусловлено CTL. Молекула STAT3 является важным звеном, которая участвует в «ускользании» опухолей от регуляции иммунной системы человека. Этот процесс происходит посредством индукции нескольких генов, ответственных за иммуносупрессию. Таким образом, фосфорилированный STAT3, может способствовать росту, делению, ангиогенезу, метастазированию опухолевых клеток.

Клетки гипоксической карциномы могут избежать CTL-опосредованного лизиса при гипоксии за счет индукции pSTAT3 (фосфорилированная форма STAT3) и активации аутофагии. CTL – цитотоксические Т-лимфоциты или Т-киллеры, которые осуществляют лизис поврежденных клеток организма. Так как раковые клетки способны выделять цитокины для того, чтобы разрушить окружающие их клетки, освободив тем самым себе место для дальнейшего роста, иммунная система реагирует на эти вещества, и в результате ответа происходит уничтожение злокачественных клеток. Соответственно, раковые клетки смогли избежать уничтожения со стороны иммунитета благодаря активации аутофагии и запуску pSTAT3 [19].

## 1.2 Строение ULK 1/2

ULK1 – фермент, кодируемый геном человека *ULK1*, представляет собой серин/треонин протеинкиназу (unc-51-подобная киназа 1). Является главной субъединицей комплекса ULK1. У млекопитающих данная киназа участвует в сборке аутофагосом вместе с близкородственным гомологом ULK2, оба из которых имеют высокую степень консервативности архитектуры домена. Эти две киназы имеют перекрывающиеся роль в индукции аутофагии при отсутствии питательных компонентов [20]. На рисунке 2 изображено наложение киназных доменов ULK 1/2.



Рисунок 2 – Наложение трехмерных структур киназных доменов ULK1 (фиолетовый) и ULK2 (оранжевый) [21]

Область N-концевого киназного домена у ULK1, богата серин-пролином. Область, которая богата серином-пролином, является местом

многочисленных регуляторных фосфорилирований как mTORC1, так и AMPK, которые действуют как регуляторы активности ULK1. С-концевой взаимодействующий домен образует каркас комплекса ULK1-ATG13-FIP200 [22].

### **1.2.1 Роль ULK 1/2 во внутриклеточных процессах**

Комплекс ULK/Atg1 регулирует доставку специфического груза эндоплазматическим ретикуломом к аппарату Гольджи в клетках млекопитающих. ULK/Atg1 обеспечивает фосфорилирование белкового каркаса (COPII), способного образовывать везикулы для транспорта белков, а именно белка, который локализуется в местах выхода ER (эндоплазматический ретикулум) (ERES-endoplasmic reticulum exit sites) и облегчающий рекрутирование растворимых субъединиц белкового каркаса II (SEC16A).

ULK1/2 участвует в регуляции роста нейритов в различных нейронах. ULK1 модулирует Ras- и Rab5- опосредованный эндоцитоз посредством взаимодействия с Syn-GAP1 (синаптический Ras-ГТФазы-активирующий белок 1), который рекрутирует Rab5 и ULK1 в множество синаптических пузырьков. Rab5 маркирует сигнальные эндосомы, которые содержат комплексы эндоцитированного фактора роста нервов (NGF), и способствует слиянию везикул с эндоцитарным путем (путем деградации), тем самым обеспечивая средства титрования NGF-сигнального ответа.

ULK1/2 фосфорилируют ключевые гликолитические ферменты (гексокиназа, фосфофруктокиназа 1, енолаза 1) и глюкогеногенный фермент (фруктозо-1,6-бисфосфатаза) для обеспечения притока углерода в пентозофосфатный путь и поддержания клеточной энергии. ULK1 и ULK2 также участвуют в метаболизме жирных кислот. Таким образом, будущие исследования метаболических изменений в опухолях со сверхэкспрессией ULK1 могут выявить уязвимости, на которые можно было бы воздействовать с помощью специфических ингибиторов комплекса ULK/Atg1 [23].

### 1.2.2 Роль ULK 1/2 в патологии

В настоящее время известно, что процесс аутофагии вовлечен в патофизиологические процессы, такие как рак, метаболические и нейродегенеративные расстройства, что делает ULK 1/2 перспективной мишенью для разработки лекарств, поскольку эти киназы находятся первыми в каскаде аутофагии и легче всего поддаются индукции или подавлению.

В некоторых стрессовых условиях, таких как гипоксия, дефицит АТФ, индуцируется внутриклеточная аутофагия. Воспринимая изменения в клеточной энергии, комплекс ULK действует как каркас для инициации сайта сборки фагофора и рекрутирования нижестоящих белков АТГ. ULK1 недостаточно экспрессируется в некоторых опухолевых тканях, таких как рак молочной железы. Это указывает на то, что активация ULK1 для ингибирования роста опухоли может быть использована в качестве эффективного метода лечения некоторых опухолей. Ингибирование ULK1 путем генетического нокдауна или различными низкомолекулярными ингибиторами, может повышать чувствительность клеток опухолей к классическим цитотоксическим препаратам, используемым в химиотерапии (например, к цисплатину).

Комплекс ULK в мембране фагофора способствует привлечению и активации VPS34 в комплексе PI3KC1 и образует фосфотидилинозитол-3-фосфат (PI3P) в мембране фагофора, этот процесс имеет решающее значение для образования аутофагосомы. В состоянии дефицита аминокислот ULK1/2 активируются и транспортируются в ER, чтобы способствовать нуклеации аутофагосом. В условиях тяжелой гипоксии и стресса ER активирующий транскрипционный фактор 4 (ATF4) напрямую регулирует транскрипцию и экспрессию ULK1 [24].

Подавления транспорта аутофагосом путем разборки микротрубочек или делеции гистондеацетилазы (HDAC6), приводит к ингибированию слияния аутофагосомы с лизосомой, в связи с этим возникает

нейродегенерация в центральной нервной системе. Аутофагический поток контролируется балансом между образованием аутофагосом и аутофагической деградацией, нарушение которой вызывает гибель нейронов. Накопление аутофагосом в нейронах связано с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и болезнь Гентингтона.

Болезнь Гентингтона представляет собой аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное пролиферацией цитозин-аденин-гуанина (CAG), кодирующей полиглютамин (polyQ) на N-конце гентингтина (HTT), и характеризуется двигательными дисфункциями и психическими расстройствами. HTT участвует в передаче сигналов, транспорте веществ внутри нервных клеток. Дисфункция HTT приводит к нейродегенерации. HTT конкурирует с mTOR за ULK1 и может индуцировать аутофагию, высвобождая ULK1 из mTORC1, что ингибирует активность комплекса ULK1/2. Таким образом, конформационная модификация HTT путем пролиферации polyQ может сдерживать аутофагические пути в нейронах и приводит к нейродегенерации [25].

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний и характеризуется нарушением двигательных функций (потеря равновесия, замедленные движения), а также происходит нарушение сна, психическое расстройство. Патологические особенности БП включают прогрессирующую потерю дофаминергических нейронов и образованию телец Леви. Патогенез БП связан с митохондриальной и лизосомальной дисфункцией (митофагией). Митофагия отвечает за митохондриальный гомеостаз, однако аномальная митофагия вызывает нейродегенерацию.

Митофагию можно разделить на Parkin-зависимые или независимые пути. В нормальных условиях митохондриальная серин/треонин протеинкиназа (PINK1) локализуется в митохондриях и перемещается на

внутреннюю мембрану митохондрий (МММ), где он расщепляется и впоследствии деградирует по N-концу. Но когда митохондрии деполяризуются, PINK1 накапливается на внешней митохондриальной мембране (ОММ) и рекрутирует E3-убиквитинлигазу (Parkin). Активированный Parkin приводит к убиквитинированию субстратов и привлечению рецепторов аутофагии для инициации митофагии. Кроме того, Parkin-независимая митофагия включает митофагию, опосредованную рецептором, и митофагию, опосредованную убиквитинлигазой. Генные мутации, связанные с болезнью Паркинсона, участвуют в митохондриальной дисфункции и нарушении митофагии, включая PINK1 и Parkin [26].

### 1.3 Молекулярное моделирование

Молекулярное моделирование - область компьютерной химии, в которой используются теоретические и вычислительные методы для исследования свойств молекул [27]. Открытие лекарств на основе лигандов (LB-CADD) основано на принципе схожих свойств соединений или молекул, о которых известно, что они взаимодействуют с конкретной мишенью. Этот метод направлен на сохранение физико-химических свойств лиганда [28]. Два основных аспекта LB-CADD: набор химических видов, рассматриваемых как химическое сходство с известными лигандами с мерой парного сходства; построение модели QSAR, которая предсказывает биологическую активность на основе химической структуры. LB-CADD используется для *in silico* скрининга новых лигандов, которые обладают подходящей биологической активностью, также для оптимизации эффективности лекарственных средств. Кроме того, этот метод используется для оптимизации фармакокинетики лекарств (DMPK) или свойств токсичности (ADMET) [29].

Методы скрининга на основе рецептора (RB-CADD), требуют наличия трехмерной структуры цели. Данный методы включают в себя молекулярный

докинг каждого лиганда в сайте связывания мишени, создавая прогнозируемый режим связывания для каждого соединения, а также меру качества соответствия соединения сайту связывания мишени. Далее эта информация используется для сортировки лигандов, которые прочно связываются с белком-мишенью [30].

### **1.3.1 Виды молекулярного докинга**

Моделирование взаимодействия двух молекул представляет собой сложную задачу. В межмолекулярные взаимодействия вовлечены многие силы, а именно гидрофобные, Ван-дер-Ваальсовы, водородные связи и электростатические взаимодействия [31].

Подразделяют докинг на основе малых молекул: белок-белковый и лиганд-белковый. Провести докинг между лигандом и белком происходит затруднено из-за большого количества степеней свободы. Данный процесс стыковки лиганда с активным сайтом пытается имитировать естественный ход взаимодействия лиганда и его белка по самому низкоэнергетичному пути с точки зрения взаимодействия [32].

Докинг лиганд-белкового комплекса можно разделить по подвижности компонентов: жесткий и гибкий. В жестком докинге лиганд и белок рассматриваются как жесткие молекулы, не имея какую-либо гибкость. Гибкая стыковка является более распространенным подходом и заключается в моделировании гибкости лиганда при условии наличия жесткого белкового рецептора, учитывая при этом только конформационное пространство лиганда [33].

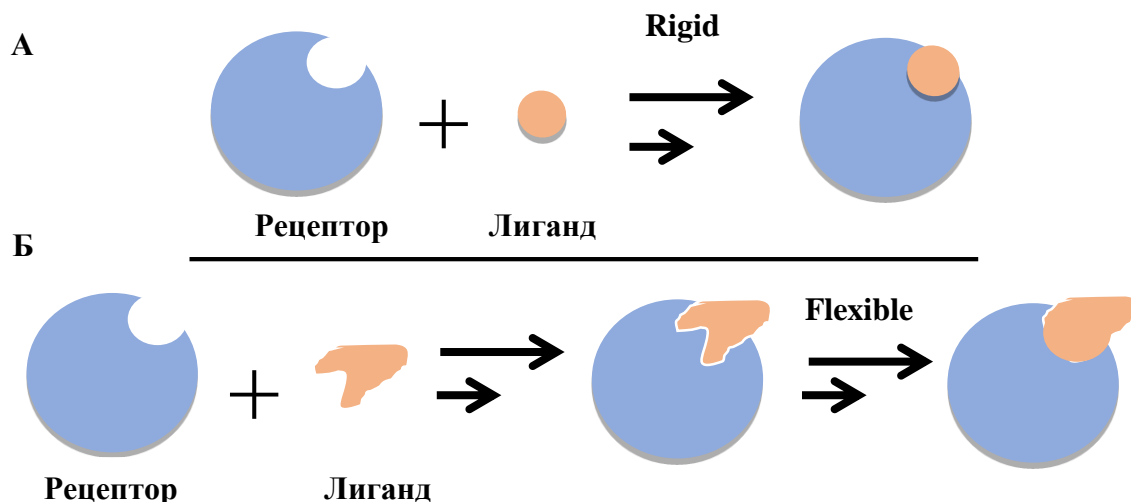
Белок-белковый докинг - это предсказание структуры комплекса, учитывая структуры отдельных белков. В основе методологии данного вида докинга лежит понятие стерической и физико-химической комплементарности на границе белок-белок. Изначально для докинга рассматривались высокоразрешающие, экспериментально определенные (методом рентгеноструктурного анализа) белковые структуры. В последнее



время акцент смещается в сторону моделируемых структур с более низким разрешением, поэтому очевидна важность вычислительных подходов, процесс прогнозирования трехмерной структуры комплекса на основе его известных составляющих [34].

Также докинг подразделяется на подвижность лиганда и на подвижность рецептора. Подвижность лиганда в свою очередь делится на виды стыковок: жесткая и гибкая. Молекулярная стыковка состоит из двух этапов: механизма выборки конформаций и оценки энергии [35].

К жесткой стыковке относится модель «замка и ключа», где «замок» представляет собой рецептор, а «ключ» - какой-либо низкомолекулярный лиганд. Данная модель стыковки подчеркивает важность геометрической взаимодополняемости рецептора и лиганда. Но так как рецепторы проявляют конформационную гибкость, ученые предложили модификацию модели «замок и ключ». Их предположения заключались в том, что лиганд изменяется во время взаимодействия с рецептором. Новая модифицированная учеными модель стыковки получила название «индуцированного соответствия». В течение всего процесса распознавания, лиганд и рецептор адаптируются друг к другу путем конформационных изменений до тех пор, пока не будет достигнуто идеального совпадения [36]. На рисунке 3 представлены виды стыковок в молекулярном докинге.



А- Модель «замка и ключа»; В – Модель «индуцированного соответствия».

Рисунок 3 – Виды стыковок в молекулярном докинге.

### 1.3.2 Скоринговые функции

Надежность молекулярного докинга зависит от точности принятой функции подсчета, которая может направлять и определять положения конкретного лиганда. Скоринговые функции представляют собой математические уравнения, которые используются для предсказания аффинности между рецептором и лигандом после их стыковки.

На данный момент в исследованиях рассматриваются некоторые основные типы оценочных функций: основанные на силовых полях, эмпирические, основанные на знаниях [37].

В эмпирических скоринговых функциях энергия связи разлагается на компоненты энергии, такие как водородная связь, ионное взаимодействие, гидрофобный эффект и энтропия связи. Каждый компонент умножается на коэффициент, а затем суммируется, чтобы воспроизвести окончательный результат [38] (формула 1).

$$\Delta G_{bind} = C_0 + C_{lip}\sum L(r_{ir}) + C_{hb}\sum H(r_{AD}, \alpha_{ADH}) + C_{met}\sum M(r_{ir}) + C_{rot}N_{rot} \quad (1)$$

где  $C_{lip}$  – гидрофобные взаимодействия;

$L(r_{ir})$  – гидрофобные контакты;

$C_{hb}$  – водородные связи;

$r_{AD}$  – расстояние между донором и акцептором;

$r_{ir}$  – расстояние между атомами;

$\alpha_{ADH}$  – угол между донором и акцептором и атомом водорода;

$C_{met}$  – взаимодействия с ионами металлов;

$M(r_{ir})$  – координационные связи с ионами металлов;

$C_{rot}$  – изменение энтропии;

$N_{rot}$  – число торсионных углов.

Скоринговые функции, которые основаны на знаниях, применяют для анализа кристаллических структур комплексов лиганд-белок для получения частот межатомных контактов или расстояний между лигандом и белком. Эти частотные распределения в дальнейшем преобразуются в парные потенциалы атомного типа. Оценка рассчитывается путем предпочтения наилучших связываний и исключения отталкивающих взаимодействий между каждым атомом лиганда и белком. Преимущества данной функции это простота вычислений, которую можно использовать для скрининга больших составных баз данных [39] (формула 2 и 3).

$$w(r) = -k_B T \ln[g(r)], \quad (2)$$

$$g(r) = \rho(r)/\rho \cdot (r) \quad (3)$$

где  $w(r)$  – потенциал средней силы;

$k_B$  – постоянная Больцмана;

$T$  – абсолютная температура системы;

$g(r)$  – функция распределения в простой жидкостной системе;

$\rho(r)$  – числовая плотность пары атомов белок-лиганд на расстоянии  $r$ .

Функция оценки силового поля включает в себя некоторые энергетические компоненты, входящих в состав классического силового поля: энергию связи, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, электростатические взаимодействия (закон Кулона). Средство комплекса лиганд-рецептор оценивается суммированием вышеперечисленных межмолекулярных сил. Оценкой энергии сольватации малых лигандов с биологическими макромолекулами может быть рассчитана с использованием континуальной сольватации площади поверхности (MM/ PBSA и MM/GBSA) [40] (формула 4).

$$E = \sum_i \sum_j \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right) \quad (4)$$

где  $r_{ij}$  – расстояние между атомами белка  $i$  и атомом лиганда  $j$ ;

$A_{ij}$  и  $B_{ij}$  – коэффициенты притяжения и отталкивания;

$q_i$  и  $q_j$  – атомные заряды;

$\varepsilon(r_{ij})$  – диэлектрическая проницаемость.

В отличие от других методов стыковки лигандов с жесткой трехмерной структурой белкового рецептора, функция Glide приближает к полному систематическому поиску конформационного, ориентационного и позиционного пространства стыкованного лиганда. Glide использует серию иерархических фильтров для поиска возможных местоположений лиганда в области активного сайта рецептора. С использованием данной функции, время стыковки значительно сокращается (в среднем составляет менее 1 минуты для наборов данных, имеющих 0–10 вращающихся связей) [41].

Уравнение 5 является основным для функции Glide:

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_{rot} N_{rot} + \Delta G_{hb} \sum f(\Delta R, \Delta a) + \Delta G_{lipo} f \cdot (\Delta R) \quad (5)$$

где  $\Delta G_0$  – свободный член;

$\Delta G_{rot}$  – потеря энергии на одну связь;

$N_{rot}$  – число вращающихся связей;

$\Delta G_{hb}$  – энергия оптимальной водородной связи;

$\Delta G_{io}$  – энергия оптимального солевого мостика;

$f(\Delta R, \Delta a)$  – функция масштабирования, описывающая отклонение от идеальной геометрии взаимодействия в терминах расстояния ( $\Delta R$ ) и угла ( $\Delta a$ );

$\Delta G_{ar} f(\Delta R; \Delta a)$  – функция для ароматических взаимодействий;

$\Delta G_{lipo}$  – липофильный член;

$f^*(\Delta R)$  – функция для контактов почти идеальным расстоянием.

Glide использует две формы GlideScore: GlideScore XP (формула 6), и GlideScore SP (формула 7).

$$XP \text{ GlideScore} = E_{coul} + E_{vdw} + E_{bind} + E_{penalty} \quad (6)$$

$$SP \text{ GlideScore} = E_{coul} + E_{vdw} + E_{bind} \quad (7)$$

где  $E_{coul}$  – кулоновская энергия взаимодействующих атомов;

$E_{vdw}$  – Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия;

$E_{bind}$  – основные дескрипторы, способствующие связыванию;

$E_{penalty}$  – дескрипторы, которые препятствуют связыванию.

GlideScore SP используется для поиска лигандов, которые имеют предрасположенность к связыванию. Данная версия применяется для обнаружения ложноотрицательных результатов и может быть использована

для приложений проверки баз данных. GlideScore XP является сложной функцией, требующая наиболее долгого выбора поз связывания, которые нарушают установочные принципы физической химии. Данная версия используется для обнаружения ложноположительных результатов и также применяется для оптимизации лидов или других различных исследований, в которых рассматриваются несколько соединений, каждое обнаруженное с помощью вычислений соединение должно быть высшего качества, чем предыдущее соединение [41].

### 1.3.3 Подходы к *in silico* дизайну ингибиторов ULK

Сайты связывания АТФ большинства протеинкиназ имеют похожие черты. Ключевым мотивом распознавания является шарнирная область, которая образует водородные связи с аминокислотной частью АТФ и является мишенью для многих ингибиторов киназ. Ингибиторы киназ обычно выявляют с помощью *in silico* скрининга [42].

Фармакофорный подход на основе лигандов включает в себя алгоритм разделения на основе дерева, определяющий пространственное расположение функциональной группы лиганда, которое важно для его биологической активности. Фаза использует комбинацию шести общих признаков гипотезы, а именно акцептора водородной связи (A), донора водородной связи (D), гидрофобной группы (H), отрицательно ионизируемой группы (N), положительно ионизируемой группы (P) и ароматическое кольцо (R). Кроме того, набор лигандов классифицируется на активные и неактивные на основе их IC<sub>50</sub>. Набор гипотез о фармакофоре был создан с использованием активных лигандов [43].

Подход с электронными фармакофорами реализует преимущества подходов, основанных как на структуре, так и на основе лигандов, путем создания энергетически оптимизированных фармакофоров, которые используются для быстрой проверки базы данных. Перед созданием модели известные ингибиторы стыкуются с использованием принципа

дополнительной точности (ХР) к подготовленной белковой сетке с использованием параметров по умолчанию. Энергии взаимодействия складываются для атомов, составляющих фармакофорный сайт. Фармакофорная характеристика с оценкой пригодности  $>0,5$  рассматривалась для развития гипотезы [44].

Фармакофорный подход, основанный на структуре, осуществляется с использованием анализа сайта связывания на основе сетки для определения благоприятных сайтов взаимодействия с лигандом. Он анализирует химические особенности сайта связывания и собирает модель фармакофора на основе сгенерированных характеристик [45].

#### **1.4 Ингибиторы ULK 1/2 и подходы к синтезу**

Соединения, ингибирующие ULK1/2 могут быть использованы для лечения терапии рака, а также могут блокировать аутофагию, останавливая накопление раннее образованных аутофагических структур. Именно поэтому подавления активности данных киназ является перспективной областью в изучения медицинской химии. В настоящее время ученые активно ведут разработку новых селективных ингибиторов ULK1/2. На рисунке 4 представлены ингибиторы ULK1, для которых описаны синтезы в данной работе.

##### **1.4.1 Ингибиторы на основе индазолового скаффолда**

Авторы статьи [46] провели *in silico* скрининг и оптимизацию низкомолекулярного ингибитора ULK1 на основе индазолового фрагмента. В своей работе они использовали модификацию первоначально полученного ингибитора **6**. Они предполагали, что добавление функциональных групп в 3 положение индазола будут образовывать дополнительные взаимодействия в АТФ связывающем кармане ULK1.

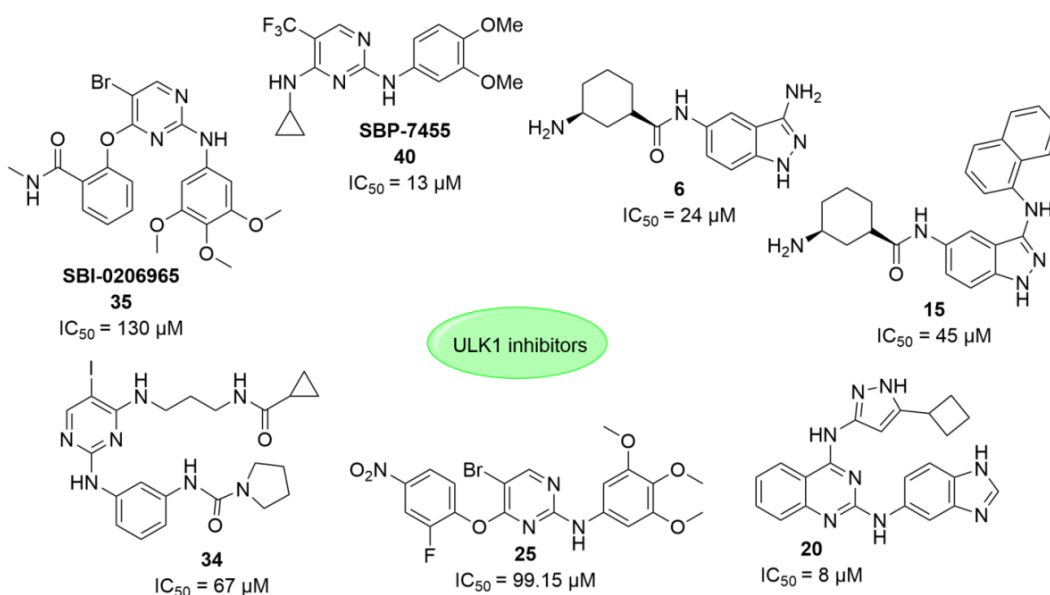


Рисунок 4 – Ингибиторы ULK1

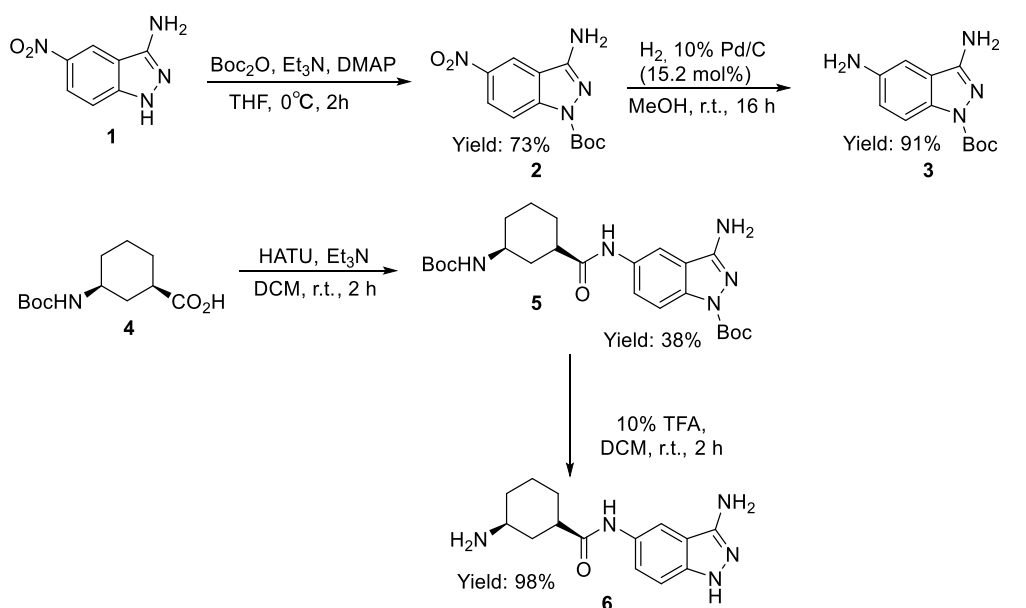
Таким образом, авторы добавили в соединение **6** аминогруппу в 3 положение индазола, которая образовывала новую водородную связь с амидным остовом аминокислоты Cys95 в АТФ связывающем кармане ULK1. Исходя из этой модели связывания, авторы отобрали лучших кандидатов для синтеза. Самые лучшие соединения, которые показывали хорошее ингибирование ULK1 оказались соединение **6** ( $IC_{50} = 24 \text{ нМ}$ ) и **15** ( $IC_{50} = 45 \text{ нМ}$ ). Синтез ингибитора ULK1 **6** представлен на схеме 1.

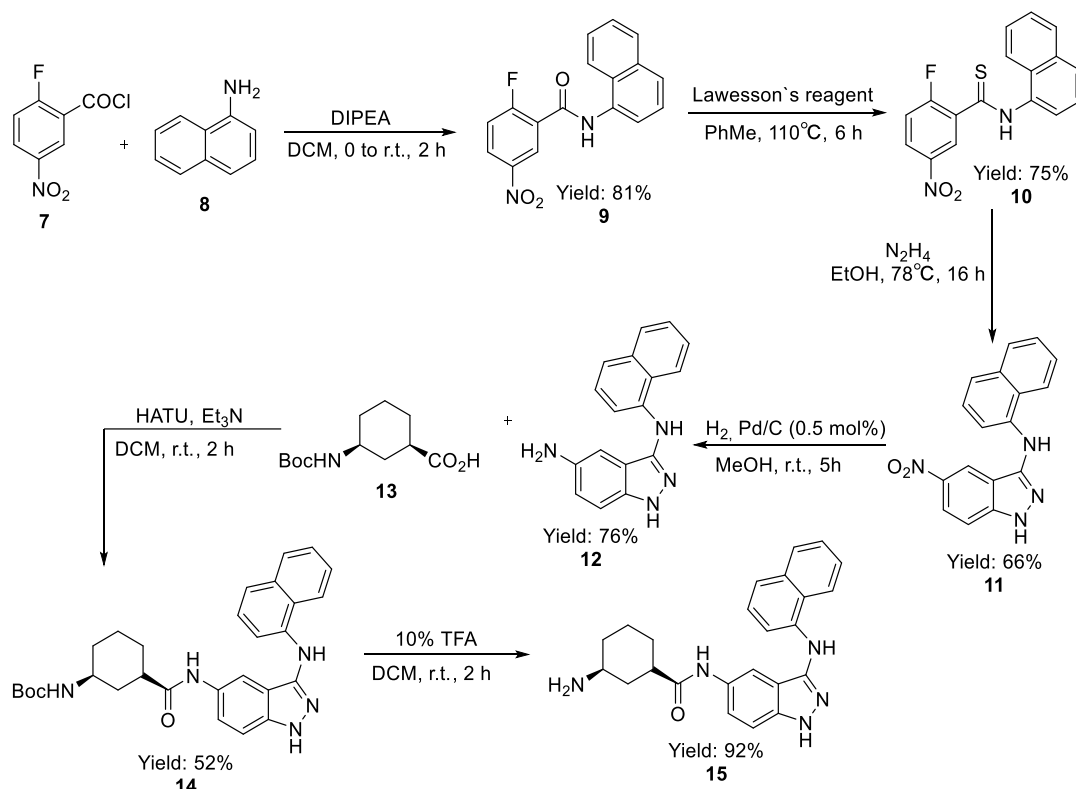
Данный ингибитор получали из 5-нитро-1*H*-индазол-3-амина **1**, к которому вносили *трет*-бутилдикарбонат в присутствии оснований с получением уже Вос-защищенного индазола **2**, далее с помощью Pd/C восстанавливали нитрогруппу до аминогруппы с получением продукта **3**, взаимодействующим с кислотой **4** в присутствии HATU, с образованием соединения **5**. На последней стадии использовали трифторуксусную кислоту для снятия Вос-защитной группы с получением конечного соединения **6** с выходом 98% [47].



Синтез ингибитора **15**, полученного авторами статьи [46] представлен на схеме 2. Исходное соединение **7** взаимодействует с нафталин-1-амином **8** в присутствии основания Хюнига с получением амида **9**, к нему добавляли реагент Лавессона, в ходе реакции образовался тиаамид **10**, к которому добавляли гидразин с получением соединения **11**. Нитрогруппу у данного соединения восстанавливали в присутствии Pd/C до аминогруппы, в ходе реакции образовался продукт **12**. К образовавшемуся продукту добавляли кислоту **13** в присутствии HATU с получением амида **14**. На последней стадии сняли Boc-защиту с помощью трифторуксусной кислоты с образованием конечного соединения **15**, выход которого составлял 92% [46].

Схема 1



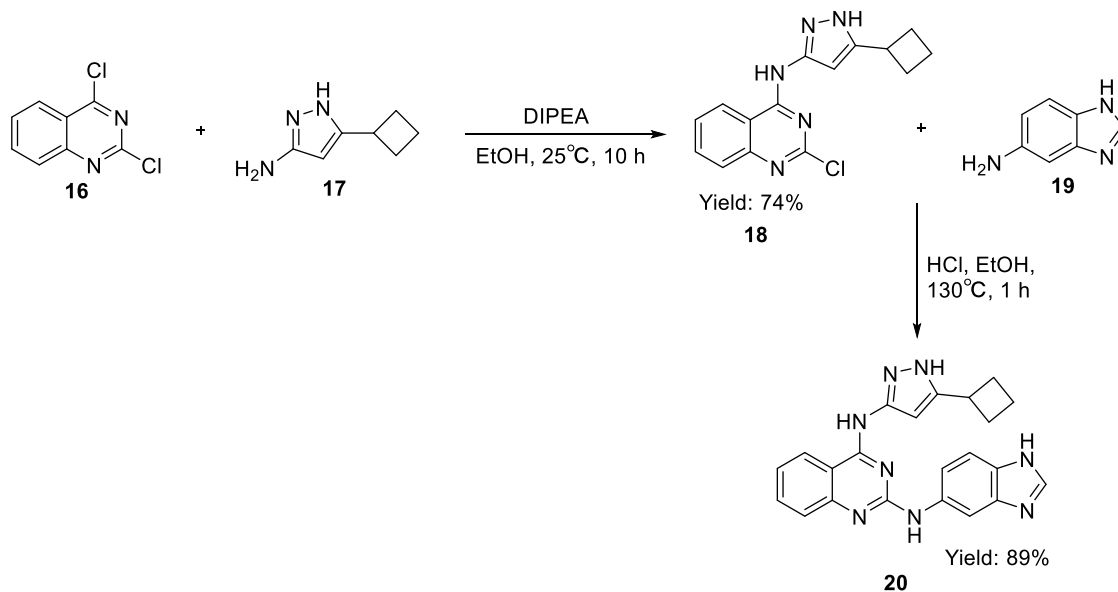


#### 1.4.2 Ингибиторы на основе аминохинозолинового скелета

Авторы публикации [47] провели скрининг низкомолекулярных соединений против ULK1. Лучшими результатами в их исследовании показали соединения, основанные на аминохинозолиновом фрагменте, связанным с пиразольным ядром. Авторы выяснили, что аминохинозолиновый фрагмент обеспечивает водородные взаимодействия с аминокислотой ULK1 (Lys46), что позволяет селективно ингибировать киназу. Из всех полученных авторами соединений, соединение **20** ( $IC_{50} = 8$  нМ) образует потенциальную водородную связь через молекулу воды с данной аминокислотой в АТФ связывающем кармане ULK1. Синтез соединения **20** представлен на схеме 3, в котором производное хиназолина **16** по реакции нуклеофильного замещения взаимодействует с 3-амино-5-циклопропил-1*H*-пиразолом **17** в присутствии основания Хюнига с

получением соединения **18**, которое вступает в очередную реакцию замещения по свободному атому хлора с 5-аминобензимидазолом **19** с образованием конечного продукта **20** с выходом 89% [47].

**Схема 3**



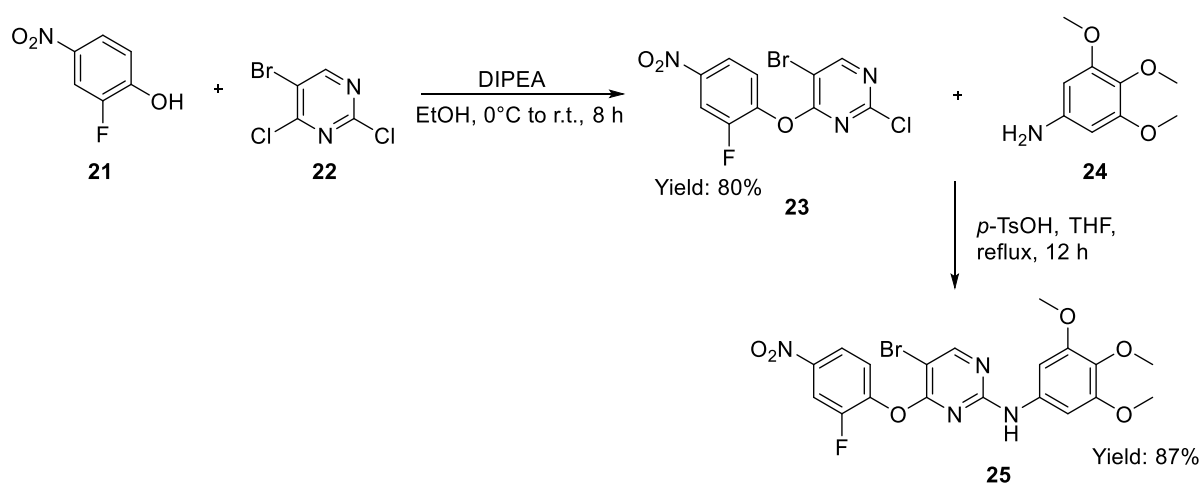
### 1.4.3 Ингибиторы на основе аминопиримидинового скелета

В публикации [48], авторы, основываясь на кристаллической структуре ULK1, проводили исследования взаимодействия между киназой и ингибитором на модели фармакофоров. Благодаря фармакофорной модели были найдены некоторые ингибиторы ULK1, способные встраиваться в активный сайт ULK1 (PDB ID: 4WNO [49]). Авторы обнаружили, что на основе структурных особенностей ингибиторов ULK1, 2-аминопиримидиновые каркасы демонстрировали взаимодействия с киназными шарнирными остовами, что осуществляло контроль над ингибированием ULK1 путем связывания за счет ограниченного доступа к сайту связывания АТФ. Авторы провели синтез удачных ингибиторов, и среди полученных соединений, ингибирующих ULK1, 5-бром-4-(2-фтор-4-

нитрофенокси)-*N*-(3,4,5-триметоксифенил)пиримидин-2-амин **25** оказался наиболее активным в отношении киназы ( $IC_{50} = 99.15$  нМ). Авторы обнаружили, что данное соединение блокирует аутофагию путем ингибирования ULK1 и индуцируют апоптоз в клетках карциномы легкого человека A549. В будущем, соединение **25** возможно будет использоваться в качестве перспективного препарата для терапии немелкоклеточного рака легкого.

Синтез соединения **25** представлен на схеме 4: 2-фтор-4-нитрофенол **21** взаимодействует с 5-бром-2,4-дихлорпиримидином **22** в присутствии основания Хюнига с получением промежуточного соединения **23**, к которому добавляли 3,4,5-триметоксианилин **24** и пара-толуолсульфоную кислоту, в ходе реакции образовался конечный продукт **25** с выходом 87% [48].

В публикации [49] авторы сообщают о новом селективном ингибиторе ULK1, имеющий аминопиримидиновый каркас в своей структуре. В статье авторы исследуют еще один класс соединений, содержащий аминопиримидиновый каркас: VX-795 **26** (рисунок 5).



Это соединение является мощным и селективным ингибитором протеин-3-фосфоинозитид-зависимой протеинкиназе (PDK1), которая имеет решающее значения для активации пути АКТ/ПКВ (рисунок 5). Авторы считали, что если удастся ингибировать PDK1, ULK1 также может поддаваться ингибированию, так как их сигнальные пути пересекаются.

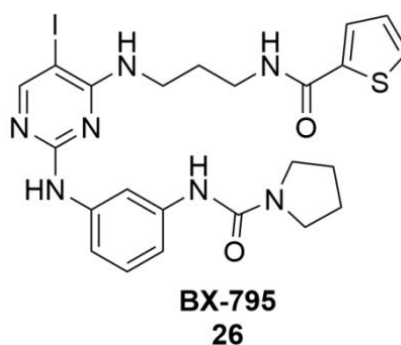
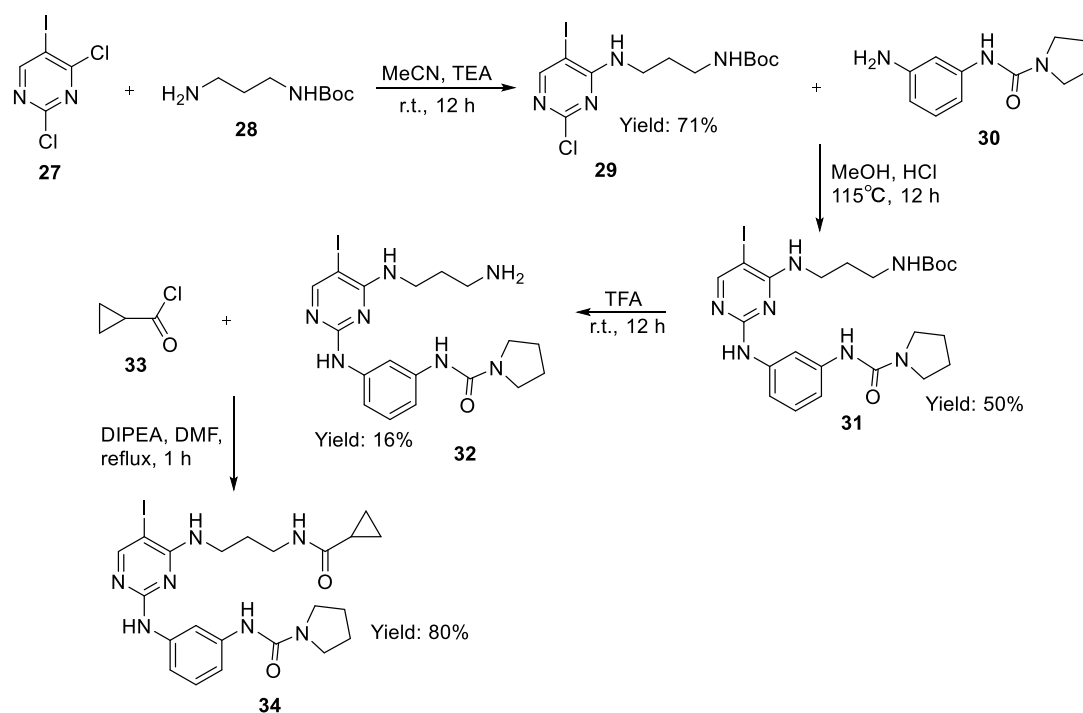


Рисунок 5 – Ингибитор PDK1

Авторы начали химическую оптимизацию с введения атома йода в 5 положение пиримидина, но галогенсодержащие заместители в данном положении не проявляли активность в отношении к ULK1. Авторы

предположили, что удлиненный диаминопропиловый линкер соединения **26** может препятствовать плотной упаковке кристаллов между протомерами ULK1. Но так как соединение **26** является мощным ингибитором PDK1, исходя из этого авторы хотели повысить селективность соединений в отношении ULK1 по сравнению с PDK1, чтобы разработать селективный ингибитор аутофагии. Поэтому они ввели ряд замен каркаса у соединения **26** для изучения взаимосвязей структуры и активности для ингибирования ULK1 и сосредоточились на более мелких модификациях, включая каркас со свободным диаминопропановым линкером. Синтезированное соединение **34** проявляло значительно лучшее ингибирование киназы ( $IC_{50} = 67$  нМ) по сравнению с соединением **26** ( $IC_{50} = 87$  нМ).

Синтез соединения **34** представлен на схеме 5. В рассматриваемом синтезе исходным соединением был 2,4-дихлор-5-йодопиримидин **27**, к которому добавляли *трет*-бутил(3-аминопропил)карбамат **28** в ацетонитриле с получением соединения **29**, далее вступающий с амидом **30** в реакцию нуклеофильного замещения по аминогруппе в условиях кислотного гидролиза с получением соединения **31**. Снятие Вос-защиты происходило при использовании трифторуксусной кислоты приводило к образованию соединения **32**, который реагировал с хлорангидридом циклопропанкарбоновой кислоты **33** по реакции нуклеофильного замещения в присутствии основания Хюнига получили конечный продукт **34** с выходом 80% [49].



Ингибитор SBP-7455 **40** (рисунок 6) продемонстрировал улучшенную аффинность связывания с ULK1/2 по сравнению с ингибитором SBI-0206965 **35**, соединение **40** ингибировало ферментативную активность ULK1/2 *in vitro* и в клетках. В своей статье [50] авторы сообщали, что соединение **35** ингибирует ферментативную активность ULK1 *in vitro* и в клетках, происходит ингибирование нижестоящих субстратов VPS34 и Beclin1. Соединение **35** оказался ценным зондом для аутофагии, но они стремились улучшить его целевую эффективность и лекарственные свойства, включая пероральную биодоступность.

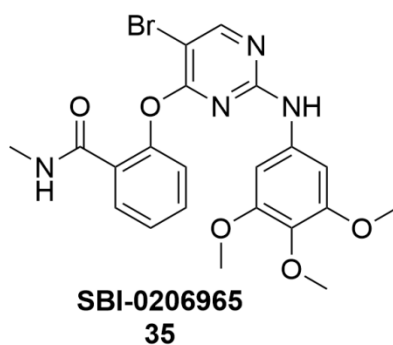
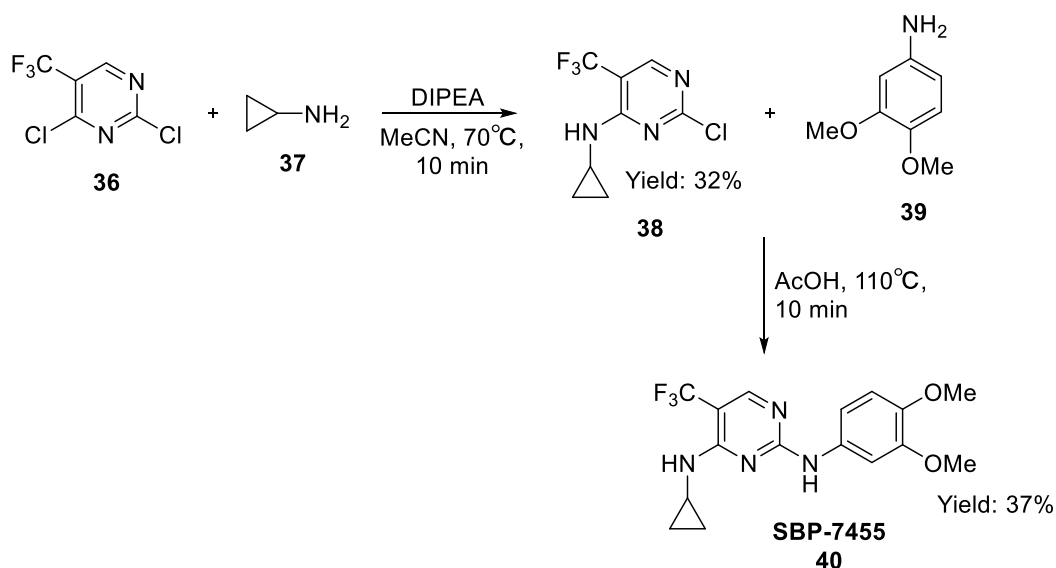


Рисунок 6 – Ингибитор ULK1

В данной статье [50] авторы описывают новые ингибиторы ULK1/2, полученные в результате сочетания структурного и рационального дизайна. Оптимизированный ингибитор аутофагии **40** избирательно блокирует аутофагический поток в клетках и проявляет благоприятные свойства *in vivo*.

В ходе процесса оптимизации и характеристики ингибиторов ULK, обнаружилось, что шарнирно-связывающий аминопиримидиновый каркас соединения **35** используется в качестве основы для ингибиторов ULK нового поколения.

Схема 6





На основе результатов скрининга, авторы синтезировали ряд соединений, среди которых соединение **40** показало наилучшую ингибирующую активность ( $IC_{50} = 13$  нМ), даже по сравнению с соединением **35** ( $IC_{50} = 130$  нМ). Синтез ингибитора **40** представлен на схеме 6. Получали рассматриваемое соединение из 2,4-дихлор-5-трифторметилпиримидина **36** по реакции нуклеофильного замещения, вступающего во взаимодействие с циклопропиламином **37** в присутствии основания Хюнига в ацетонитриле с получением промежуточного соединения **38**, к которому добавляли 3,4-диметоксианилин **39** в уксусной кислоте с образованием конечного продукта **40** с выходом 37% [50].

## 2 Результаты и их обсуждение

Многочисленные исследования демонстрируют, что выживаемость раковых клеток в условиях гипоксии или недостатка питательных веществ опосредуется процессами аутофагии. Кроме того, нарушение сигнального каскада индукции, в частности гиперактивация ULK1 может приводить к злокачественным новообразованиям и в некоторых случаях к нейродегенеративным заболеваниям. Киназа ULK1 может либо стимулировать, либо ингибировать рост опухоли посредством процесса аутофагии в условиях дефицита питательных веществ. Ингибирование данной киназы является мощной терапевтической стратегией для борьбы с онкологическими заболеваниями.

Целью данной работы является поиск новых ингибиторов ULK1/2 и их моделирование с помощью программного пакета Schrödinger Suite.

На рисунке 7 представлен общий дизайн исследования. На первом этапе, с одной стороны, нами был осуществлен подбор виртуальной библиотеки ChemDiv [51] для осуществления виртуального скрининга с возможностью дальнейшего приобретения соединений; с другой стороны, нами были отобраны и подготовлены кристаллические структуры киназ ULK1/2, депонированные в RCSB PDB [52]. Затем мы выполнили трехэтапную кампанию виртуального скрининга, с дополнительным расчетом аффинности MM/GBSA [53]. Идентифицированные хиты были приобретены и протестированы *in vitro* в нашей лаборатории на способность подавлять аутофагию с помощью репортерной системы LC3-NiViT.

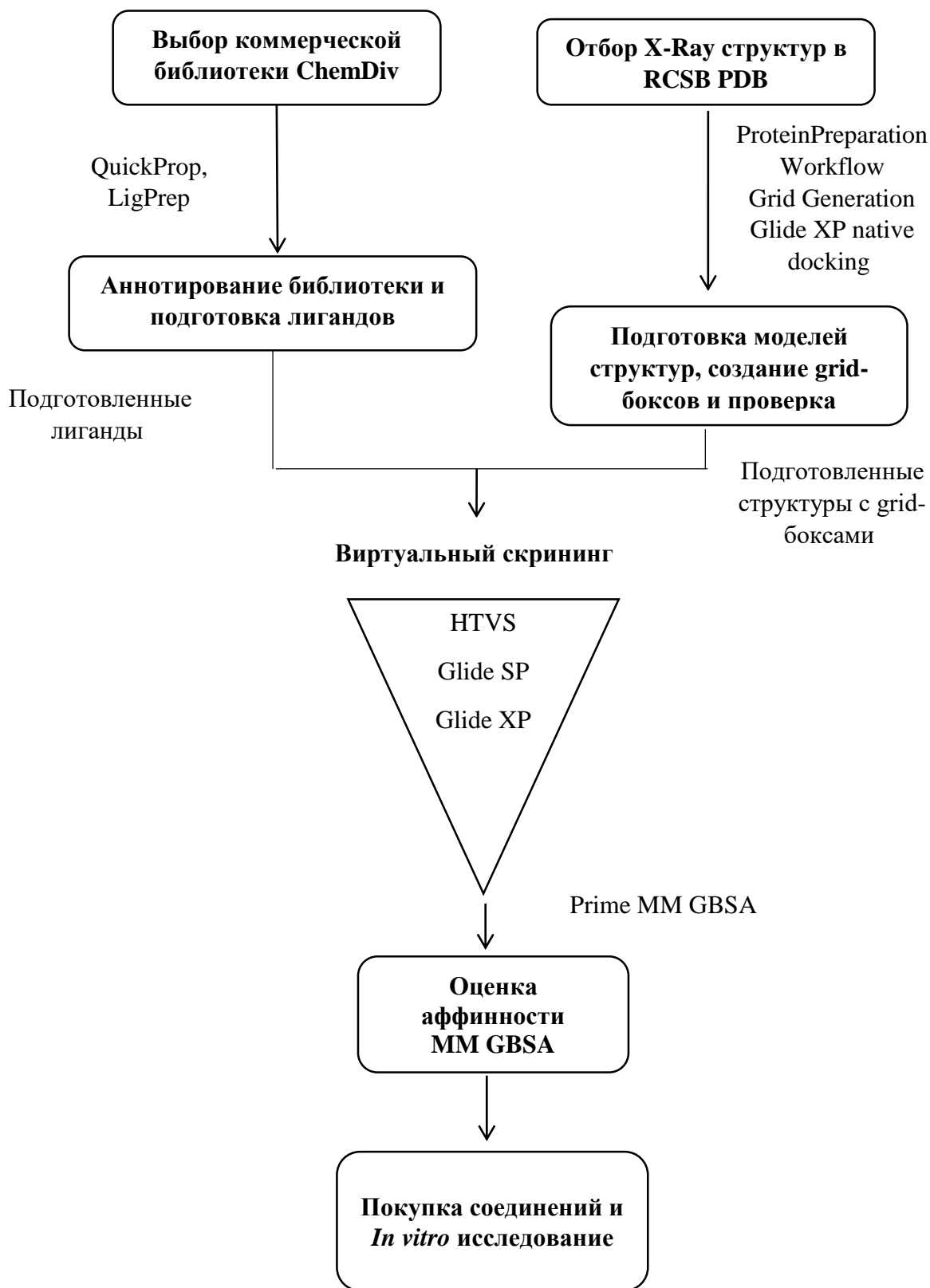


Рисунок 7 – Общий дизайн исследования

## 2.1 Аннотирование и подготовка библиотеки

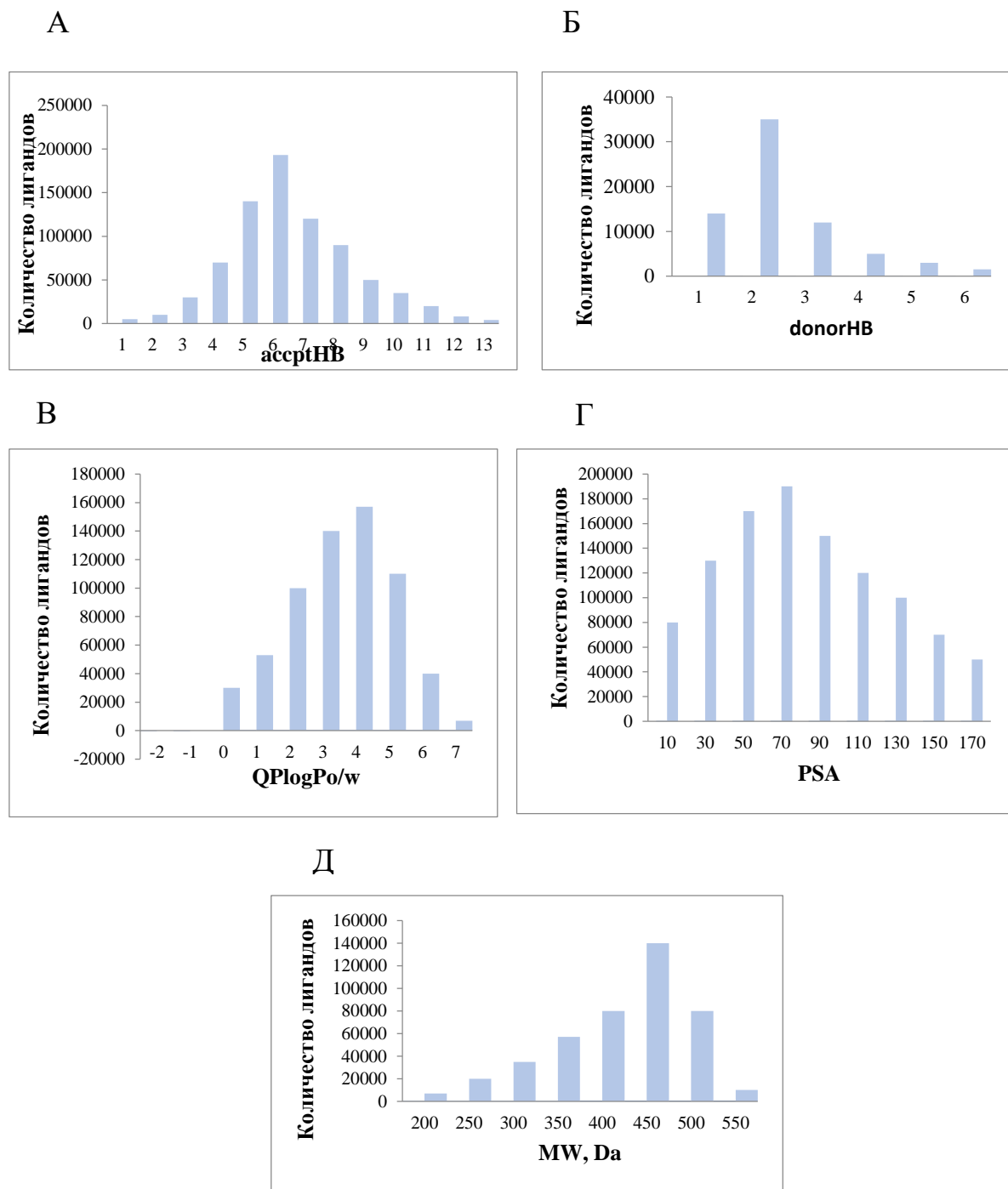
Нами была проведена выгрузка коммерческих библиотек ChemDiv [51], включающих как наборы различных мультикиназных ингибиторов, так и селективных ингибиторов аутофагии. Данные сетки соединений не содержали ковалентно-реактивных групп, дубликатов, PAINS. Кроме того, предоставленные ChemDiv библиотеки уже обогащены соединениями с удовлетворительными уровнями структурного разнообразия.

Всего было загружено 5 различных библиотек:

- библиотека фенотипического скрининга [54];
- аннотированная библиотека человеческих киназ [55];
- библиотека ингибиторов протеинкиназ [56];
- библиотека разнообразия на основе 3D-фармакофоров [57];
- библиотека, ориентированная на аутофагию [58].

Все соединения были объединены в один набор, трехмерные структуры и состояния протонирования определены с помощью модуля LigPrep [59], после чего с использованием модуля QuickProp [60] были рассчитаны различные физико-химические свойства представленных 193 тысяч соединений. Диаграммы распространения свойств, определенных правилами Липински [61] представлены на рисунке 2, где ось ординат на диаграммах показывает число соединений библиотеки, а ось абсцисс – диапазон значений свойства.

Как можно увидеть, объединенная библиотека целиком охватывает весь диапазон свойств (рисунок 8).



А – число акцепторов водородной связи, шт;  
 Б – число доноров водородной связи, шт; В –липофильность;  
 Г – площадь полярной поверхности, Å<sup>2</sup>; Д – молекулярная масса, Да

Рисунок 8 – Распределение свойств среди соединений библиотеки.

## 2.2 Выбор белковых мишеней

В Protein Data Bank [52] находятся 10 сокристаллических комплексов ULK1/2 с различными ингибиторами (таблица 1). Все структуры имели кристаллографическое разрешение в диапазоне 1.56-2.77 Å.

Таблица 1 – Комплексы ULK1/2 в RCSB PDB

| Изоформа | PDB ID | X-Ray resolution, Å | Наличие лиганда |
|----------|--------|---------------------|-----------------|
| ULK1     | 4WNO   | 1.56                | +               |
|          | 6QAS   | 1.75                | +               |
|          | 6MNH   | 1.73                | +               |
|          | 4WNP   | 1.88                | +               |
|          | 5CI7   | 1.74                | +               |
| ULK2     | 6QAT   | 2.77                | +               |
|          | 6YID   | 2.70                | +               |
|          | 6QAU   | 2.70                | +               |
|          | 6QAV   | 2.05                | +               |

Выбранные комплексы были загружены и подготовлены с использованием панели сборки Maestro в пакете Schrödinger. С помощью модуля мастера подготовки ProteinPreparationWorkflow [62], который позволяет оптимизировать структуру белка, полученного с помощью РСА, происходит подготовка структуры и устранение некоторых недостатков, таких как: отсутствие атомов водорода в структуре, неправильное распределение валентностей некоторых атомов, отсутствие боковых цепей в структуре.

С помощью модуля Generate Grid Generation в Glide [63] определяется активный сайт белка для проведения докинга с лигандом.

### 2.3 Нативный докинг

Для проверки правильности подготовки комплексов, а также для идентификации и понимания режимов связывания сокристаллизованных лигандов, нами была выполнена процедура нативного докинга. Стыковка предварительно удаленных из белковых структур молекул осуществлялась с помощью модуля Glide в режиме подвижного лиганда на протоколе точности XP [63]. В таблице ниже представлены значения среднеквадратичного отклонения атомных координат, являющиеся критерием отбора качественных моделей, значения XP GScore, а также значения энергетических термов оценочной функции (таблица 2).

Предвосхищая анализ режимов и паттернов связывания нативных лигандов, стоит отметить консервативность двух изоформ данного фермента. Киназы ULK1/2, являющиеся у млекопитающих ортологами индуктора аутофагии дрожжей Atg1 (наряду с ULK3 и 4) и входящие в состав инициаторного комплекса, демонстрируют, по данным литературы, высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей (52%), а в области киназного домена — 78% [64]. На рисунке 9 представлен результат наложения структур данных белков.

Кроме прочего, литературные данные указывают на необходимость ингибирования обеих изоформ для достижения устойчивого биологического ответа, опосредованного снижением уровней аутофагии [65]. Закономерно, режимы связывания ингибиторов ULK1 и 2 схожи, а структуры образуют идентичные паттерны взаимодействий. Все ингибиторы являются миметиками АТФ и связываются в глубоком сайте, расположенном в шарнирной области киназы.

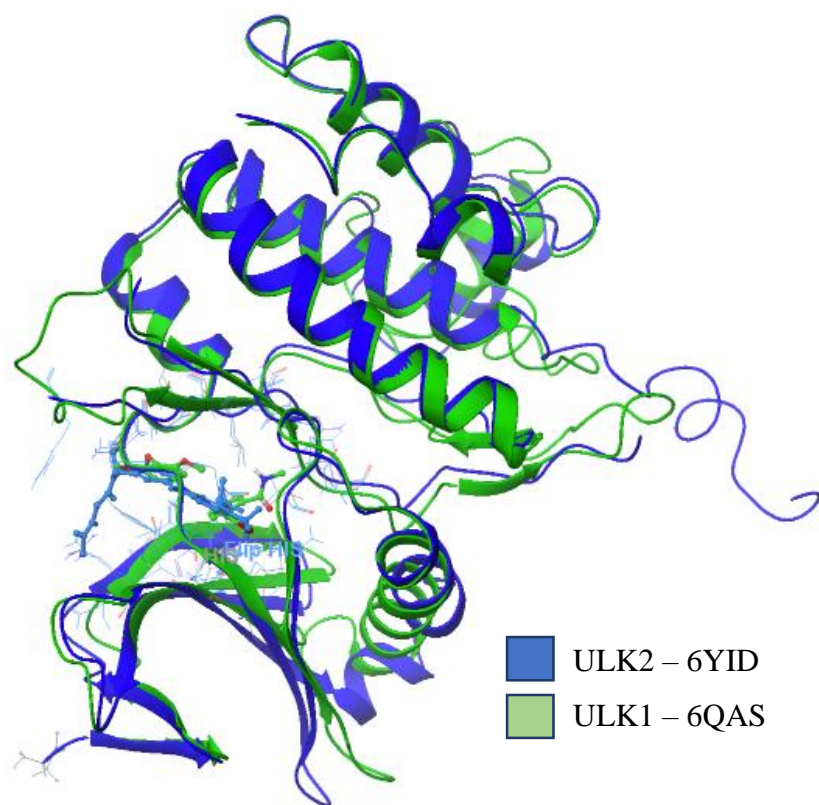
На рисунке 10 представлены структуры использованных сокристаллизованных лигандов.

Таблица 2 – Результаты нативного докинга

| PDB ID: | XP Gscore, ккал/моль | Дескрипторы XP, ккал/моль |           |             |          |             |                   |                 |            |            |              | RMSD, Å |
|---------|----------------------|---------------------------|-----------|-------------|----------|-------------|-------------------|-----------------|------------|------------|--------------|---------|
|         |                      | XP Hbond                  | XP PhobEn | XP PhobEnHB | XP lowMW | XP RotPenal | XP LipophilicEvdW | XP PhobEnPairHB | XP Electro | XP Sitemap | XP Penalties |         |
| 4WNP    | -11.157              | -2.720                    | -0.174    | 0.000       | -0.179   | 0.187       | -4.643            | -2.600          | -1.146     | -0.117     | 0.000        | 0.519   |
| 6MNH    | -7.909               | -1.046                    | -0.425    | -1.500      | -0.500   | 0.272       | -4.157            | 0.000           | -0.442     | -0.135     | 0.400        | 0.690   |
| 6QAS    | -10.229              | -1.856                    | -0.475    | 0.000       | 0.000    | 0.189       | -4.364            | -2.083          | -0.717     | -1.415     | 0.010        | 1.220   |
| 6YID    | -9.137               | -1.330                    | -0.325    | 0.000       | 0.000    | 0.127       | -4.454            | -2.179          | -0.734     | -0.369     | 0.054        | 0.487   |
| 6QAT    | -9.603               | -1.330                    | -0.125    | 0.000       | 0.000    | 0.161       | -5.411            | -1.950          | -0.943     | -0.400     | 0.003        | 1.063   |

XP HBond – вклад водородных связей; XP PhobEn – награда за связывание в гидрофобных областях сайта; XP PhobEnHB – вклад водородных связей, образованных в гидрофобных областях; XP lowMW – награда для лигандов, обладающих низкой молекулярной массой; XP RotPenal – штраф за свободно вращающиеся связи лиганда; XP LipophilicEvdW – вклад, отражающий степень комплементарности гидрофобных поверхностей лиганда и рецептора; XP PhobEnPairHB – вклад коррелированных водородных связей, образованных в гидрофобных областях; XP Electro – награда за благоприятные электростатические взаимодействия; XP Sitemap – вклад, отражающий степень комплементарности поверхностей лиганда и рецептора (без учета водородных, гидрофильных и гидрофобных взаимодействий); XP Penalties – штрафы за десольватацию полярных атомов, внутрелигандные контакты.





(ULK 1 - зеленый, PDB ID: 6QAS) (ULK 2 - синий PDB ID: 6QID).

Рисунок 9 – Наложение выравненных структур ULK1/2

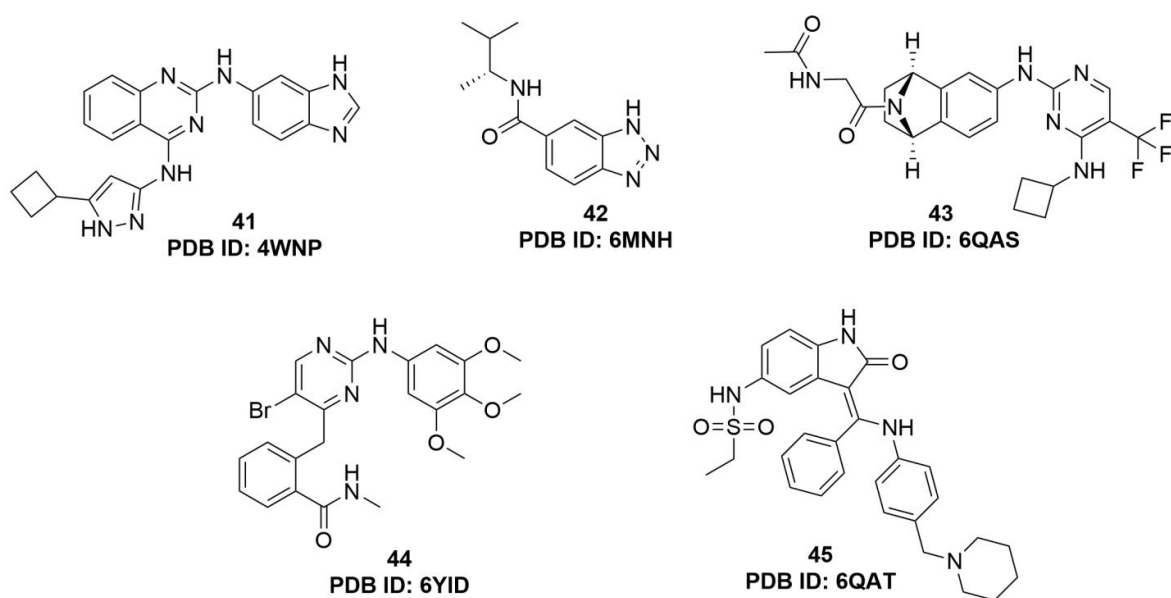
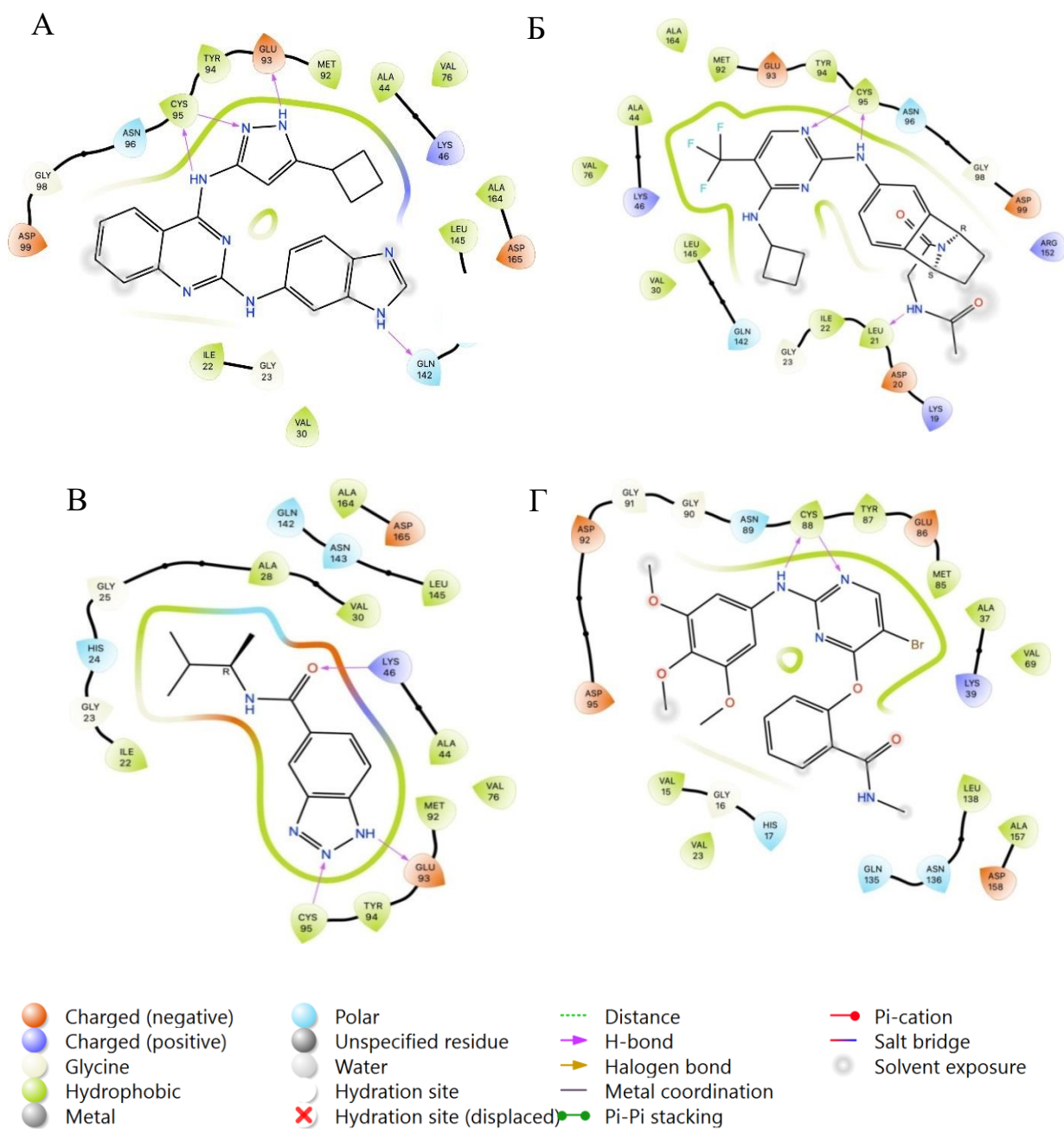


Рисунок 10 – Нативные лиганды ULK1/2

На рисунке 11 представлены ключевые взаимодействия комплексов ингибиторов **41-45** ULK1/2 с киназой. Комплекс 4WNP [49] (рисунок 11-А) состоит из ULK1 и аминокиназолинового ингибитора **41**. Аминокислотные взаимодействия между киназой и ингибитором происходят за счёт образования коррелированных водородных связей с остатками Cys95, а также с Glu93 и Gln142. Комплекс 6MNH [66] (рисунок 11-Б) с лигандом **42** демонстрирует следующие взаимодействия: Cys95 и Glu93 образует водородные связи с кольцевыми атомами азота бензотриазольного ингибитора, Lys46 образует водородную связь с карбонильным остатком лиганда. Последний комплекс ULK1 - 6QAS [67] (рисунок 11-В), состоящий из киназы и аминокимидинового ингибитора **43**. Киназный паттерн связывания реализуется за счет образования водородных связей с остатками Cys95, а также Leu21 образовывал водородную связь с амидным остатком ингибитора. Неполярный циклопропильный заместитель ориентирован в зону сольватации. 6YID [68] – комплекс (рисунок 11-Г), содержащий изоформу ULK2 и соответствующий лиганд **44**. Аминокимидиновый ингибитор обуславливает следующие ключевые взаимодействия: пиримидиновое ядро и аминокимидиновая группа образуют коррелированные водородные связи с остатком Cys88.

На рисунке 12 представлена поза, полученная в результате нативного докинга структуры 6QAT [67] для ULK2. Важными аминокислотами для связывания ингибитора **45** с киназой являются Cys88, Lys39 и Glu86. Стоит также отметить, что протонированный пиперидиновый фрагмент располагается в зону, доступную для растворителя.



А – Лиганд **41**, PDB ID: 4WNP; Б – Лиганд **42**, PDB ID: 6MNH; В – Лиганд **43**, PDB ID: 6QAS; Г – Лиганд **44**, PDB ID: 6YID

Рисунок 11 – Взаимодействие ULK1/2 с лигандами

Независимо от изоформы, все ингибиторы воспроизводят ключевой киназный паттерн связывания с образованием двух водородных связей

(донорной и акцепторной) с Cys 98 или Cys 88 для ULK1 и 2, соответственно, а также акцепторной водородной связи с Glu 93 или Glu 86 для ULK1 и 2, соответственно (рисунок 13).

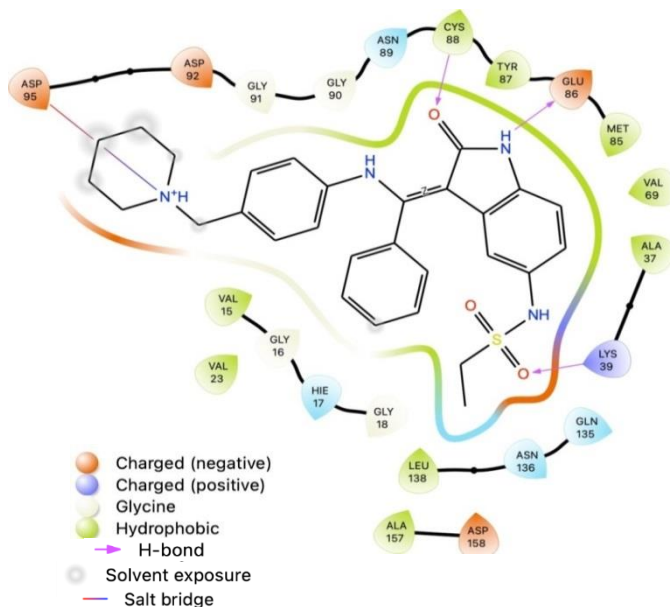
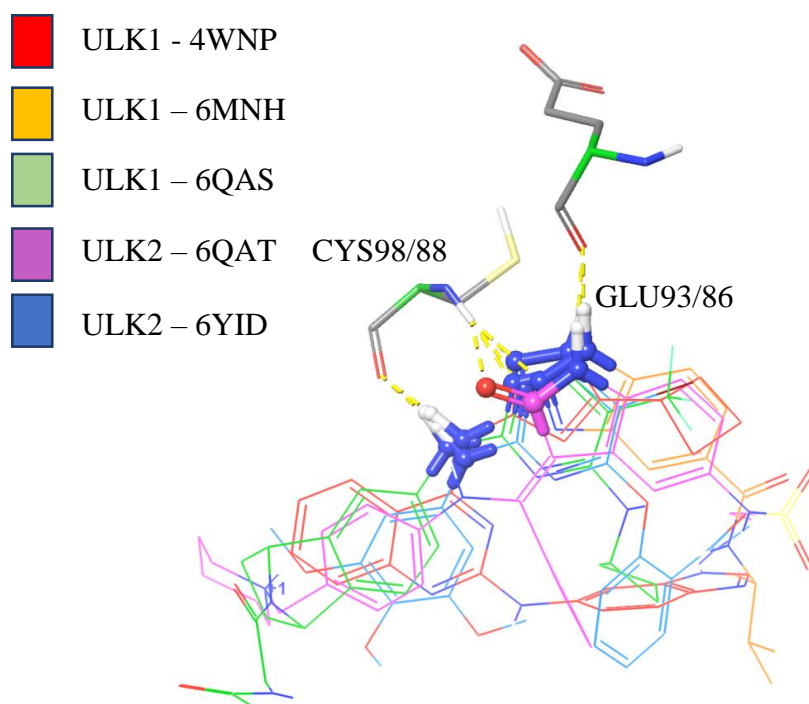


Рисунок 12 – Взаимодействие ULK2 (PDB ID: 6QAT) с лигандом **45**

Более того, с учетом глубины расположения ключевых остатков, все структуры получают дополнительные номинации за образование водородных связей в гидрофобном кармане (см. значение дескриптора XP PhobEn Pair HB и XP PhobEn HB в таблице 2).

Для обеспечения прочного связывания (кроме образования водородных связей с Cys98/88 и Glu93/86) важно выгодно оккупировать глубокий гидрофобный карман сайта, образованный остатками Leu, Val и Met. Подобную геометрию демонстрируют нативные лиганды 6YID [68], 6QAS [67] и 4WNP [49], простирая свои неполярные группировки (атом брома, трифторметильная группа и циклобутановый фрагмент для 6YID, 6QAS и 4WNP, соответственно); значения дескриптора гидрофобности приведено в ккал/моль (рисунок 14).

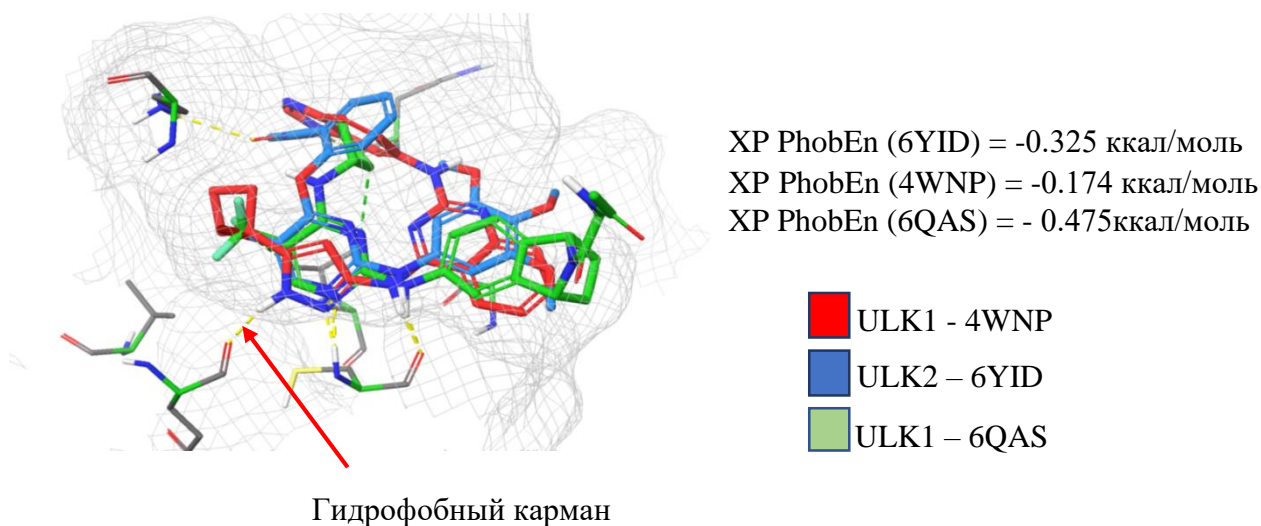


Желтые пунктиры – водородные связи

Рисунок 13 – Ключевые взаимодействия структур ингибиторов с ULK1/2

Наиболее выгодное связывание с точки зрения электростатических взаимодействий демонстрируют лиганды 4WNP и 6QAT.

В первом случае функция Glide номинировала структуру за высокую степень комплементарности электростатических молекулярных полей лиганда и рецептора (вклад XP Electro = -1.146 ккал/моль); во втором случае выгодные взаимодействия возникают между остатками Asp в позициях 95 и 92 и протонированным азотом пиперидинового фрагмента лиганда 6QAT [67] (вклад XP Electro = -0.943 ккал/моль). Присутствие атомов галогенов в молекулах 6QAS и 6YID также благоприятно отражается в электростатическом терме (таблица 2).

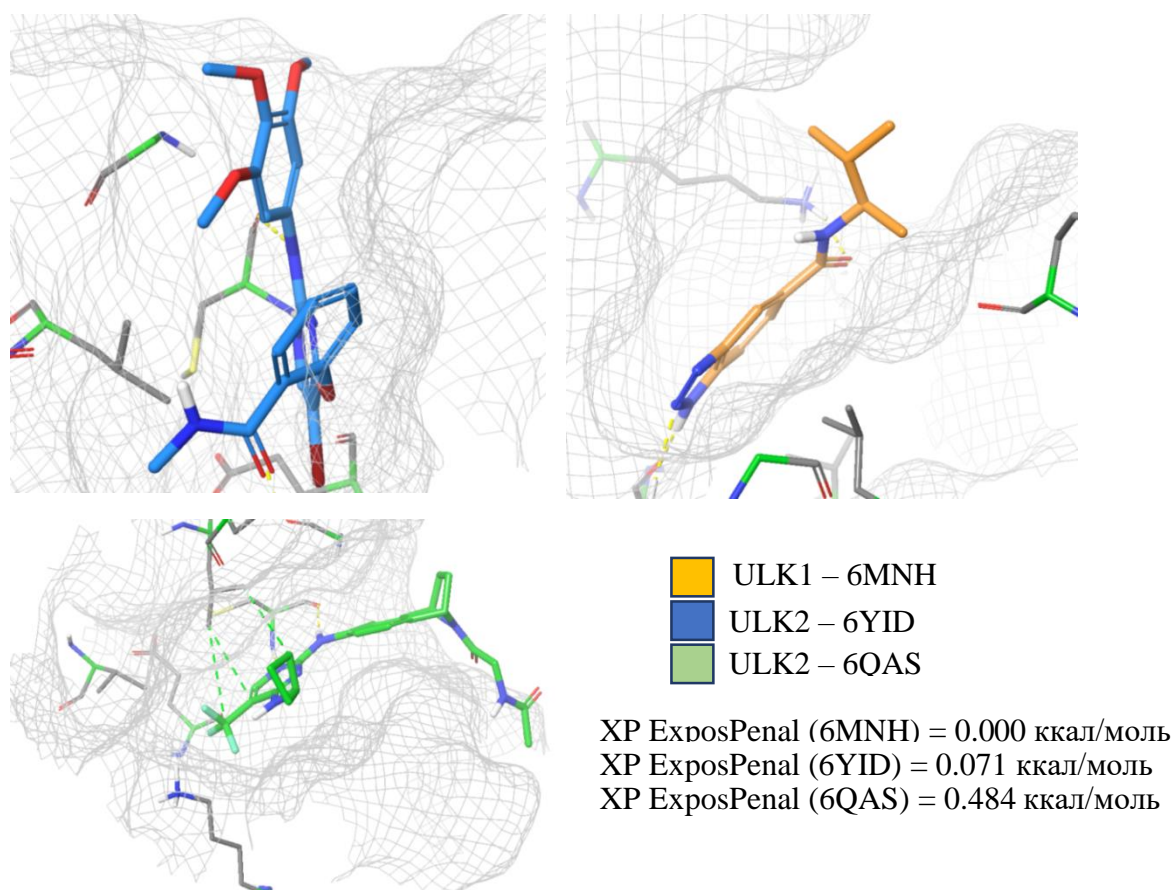


Желтые пунктиры – водородные связи

Рисунок 14 – Ориентация заместителей в глубокую гидрофобную область

В случае бQAT алгоритм Glide идентифицировал позу, в которой между азотом пиперидина и Asp не возникает солевого мостика, хотя в сокристаллической структуре таковой имеется.

Все структуры демонстрируют невыгодную ориентацию в область, доступную для растворителя, объемных относительно неполярных группировок (см. значения XP ExposPenal в таблице 2 ~ +0.2-0.4 ккал/моль); Выгодно в этом ключе выглядит режим связывания лиганда бMNH, который из-за своего небольшого размера укладывается в сайт связывания полностью. Другой пример выгодной ориентации – лиганд бYID, располагающий за пределами сайта триметоксифенильную группу (рисунок 15; значения штрафа за невыгодную сольватацию указаны в ккал/моль).



Зеленые пунктиры – гидрофобные взаимодействия; желтые пунктиры – водородные связи.

Рисунок 15 – Ориентация различных фрагментов в область, доступную для растворителя

## 2.4 Виртуальный скрининг

Виртуальный скрининг объединенной библиотеки был реализован с помощью VirtualScreeningWorkflow и представлял собой трехэтапный отбор потенциальных соединений-хитов на основе молекулярного докинга. Структуры 4WNP (ULK1) и 6YID (ULK2) были использованы в качестве рецепторов. Первый этап включал стыковку на протоколе HTVS [69] с сохранением 40% лучших соединений, которые подвергались повторной

оценке в режиме Glide SP [69]. 10% лигандов, обладающих самыми низкими значениями SP-функции, затем финально оценивались в самом точном режиме Glide XP [70], и расчет Prime свободной энергии связывания методом MM GBSA [71] проводился на заключительном этапе также для 10% соединений с лучшими значениями XP GScore.

Все отобранные в ходе такой стыковочной воронки соединения были разбиты нами на кластеры согласно структурному подобию. На рисунке 16 представлены основные кластеры.

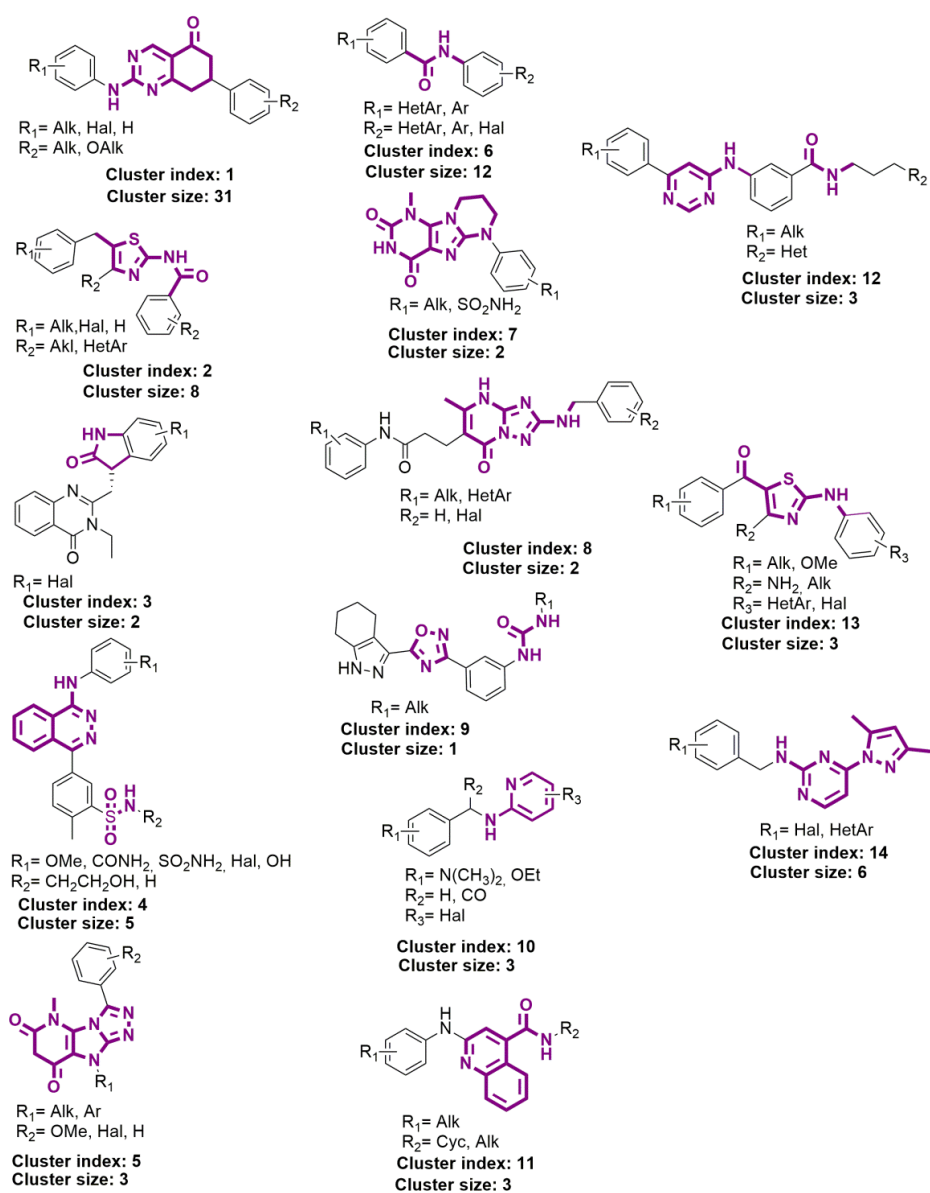


Рисунок 16 – Основные кластеры



### 2.4.1 ULK1: результаты виртуального скрининга

Полноценно результаты виртуального скрининга в комплекс ULK1 (PDB ID: 4WNP [49]) представлены в приложении А (таблица А.1). В этом разделе будут обсуждаться специфичные для данной кристаллической структуры мотивы, паттерны и режимы связывания, а также будут проанализированы тенденции определённых хемотипов к лидерству с точки зрения структурных закономерностей. После всех этапов отбора и фильтрации алгоритмом Glide [63] было идентифицировано 83 соединения, связывающихся в сайте ULK1 (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты виртуального скрининга для комплекса ULK1 (PDB ID: 4WNP)

| Код соединения          | Cluster Index | XP GScore, ккал/моль | MM GBSA $\Delta G_{\text{bind}}$ , ккал/моль | Код соединения | Cluster Index | XP GScore, ккал/моль | MM GBSA $\Delta G_{\text{bind}}$ , ккал/моль |
|-------------------------|---------------|----------------------|--|----------------|---------------|----------------------|--|
| 1                       | 2             | 3                    | 4  | 5              | 6             | 7                    | 8  |
| <b>41</b><br>(Нативный) | -             | -10.740              | -55.62                                       | M008-0168      | 2             | -7.952               | -43.80                                       |
| D481-0040               | 8             | -9.753               | -42.68                                       | D443-0073      | 2             | -7.928               | -48.62                                       |
| M350-0197               | 6             | -9.293               | -56.20                                       | 6383-0877      | 10            | -7.919               | -37.55                                       |
| Y020-1398               | 1             | -9.241               | -44.26                                       | D367-0152      | 1             | -7.917               | -45.57                                       |
| D367-0350               | 1             | -9.226               | -39.31                                       | D367-0269      | 1             | -7.871               | -43.37                                       |
| F725-0015               | 12            | -9.167               | -42.23                                       | 2381-0931      | 2             | -7.702               | -53.56                                       |
| D463-0114               | 6             | -9.145               | -43.52                                       | 8341-0092      | 1             | -7.682               | -46.25                                       |
| D367-0056               | 1             | -9.027               | -50.74                                       | P592-0475      | 14            | -7.668               | -38.83                                       |
| D367-0434               | 1             | -9.003               | -44.76                                       | D367-0279      | 1             | -7.630               | -37.66                                       |
| D367-0277               | 1             | -8.996               | -44.26                                       | 8211-0186      | 1             | -7.594               | -44.65                                       |
| D367-0248               | 1             | -8.996               | -37.75                                       | Y020-2784      | 1             | -7.534               | -40.01                                       |
| D367-0158               | 1             | -8.992               | -40.65                                       | 4109-2010      | 4             | -7.408               | -53.88                                       |
| D367-0386               | 1             | -8.959               | -45.10                                       | Y504-8080      | 14            | -7.403               | -40.09                                       |
| D367-0183               | 1             | -8.838               | -44.38                                       | 8211-0170      | 1             | -7.338               | -45.60                                       |
| F538-1697               | 9             | -8.777               | -56.24                                       | D367-0033      | 1             | -7.255               | -44.53                                       |

Продолжение таблицы 3

| 1         | 2  | 3      | 4      | 5         | 6  | 7      | 8      |
|-----------|----|--------|--------|-----------|----|--------|--------|
| D367-0335 | 1  | -8.748 | -38.98 | D367-0054 | 1  | -7.006 | -35.53 |
| D367-0328 | 1  | -8.746 | -35.55 | K788-4490 | 11 | -6.987 | -39.59 |
| D367-0236 | 1  | -8.614 | -44.38 | 4109-1933 | 4  | -6.926 | -46.83 |
| D367-0436 | 1  | -8.529 | -47.91 | 4109-1944 | 4  | -6.867 | -49.20 |
| D126-0182 | 6  | -8.485 | -46.78 | F091-0100 | 13 | -6.858 | -39.88 |
| D367-0322 | 1  | -8.414 | -38.00 | Y030-3507 | 10 | -6.840 | -41.55 |
| Y020-1462 | 1  | -8.388 | -41.39 | 4109-1941 | 4  | -6.499 | -54.11 |
| 2389-2848 | 2  | -8.366 | -55.56 | S606-0855 | 6  | -6.482 | -46.34 |
| P592-0478 | 14 | -8.361 | -37.42 | C387-1583 | 11 | -6.397 | -39.76 |
| 3966-3951 | 2  | -8.347 | -53.90 | 8578-0231 | 7  | -6.036 | -46.12 |
| D481-0066 | 6  | -8.301 | -39.88 | F722-0074 | 7  | -5.792 | -44.33 |
| Y020-1399 | 1  | -8.220 | -39.13 | 4109-2097 | 4  | -5.617 | -48.03 |
| 7997-0024 | 6  | -8.183 | -41.30 | F722-0047 | 5  | -5.605 | -44.27 |
| 4264-1935 | 2  | -8.181 | -51.99 | C768-0885 | 11 | -5.601 | -39.75 |
| 2389-2207 | 2  | -8.169 | -46.67 | D330-0151 | 6  | -4.682 | -46.17 |
| 2389-2102 | 2  | -8.169 | -52.29 | F722-0061 | 5  | -4.546 | -45.01 |
| D367-0246 | 1  | -8.150 | -48.90 | F722-0236 | 5  | -4.428 | -36.98 |
| 8582-1676 | 6  | -8.142 | -41.96 | S055-1353 | 6  | -4.349 | -31.69 |
| F091-0880 | 13 | -8.126 | -45.80 | Y030-3500 | 10 | -4.202 | -41.55 |
| P774-4295 | 14 | -8.078 | -34.91 | Y030-3487 | 6  | -3.981 | -42.95 |
| D367-0275 | 1  | -8.048 | -46.93 | D367-0429 | 1  | -3.933 | -36.61 |
| 8211-0179 | 1  | -8.045 | -45.76 | M008-3495 | 13 | -3.878 | -43.90 |
| P592-0447 | 14 | -8.039 | -36.08 | SD30-0092 | 6  | -3.334 | -49.06 |
| D481-0098 | 8  | -8.008 | -40.80 | D385-0472 | 1  | -3.012 | -49.76 |
| P592-0452 | 14 | -8.000 | -43.98 | D163-0946 | 3  | -2.578 | -40.23 |
| F725-0720 | 12 | -7.994 | -41.66 | D718-1652 | 6  | -2.531 | -45.51 |
| D367-0427 | 1  | -7.994 | -47.17 | D163-0942 | 3  | -2.029 | -46.82 |

Зеленый цветом представлены лиганды, демонстрирующие одновременно низкие значения XP GScore и MMGBSA  $\Delta G_{\text{Bind}}$ .

Как можно увидеть из таблицы 3, ни одно из соединений не смогло превзойти нативный лиганд по значению XP GScore.

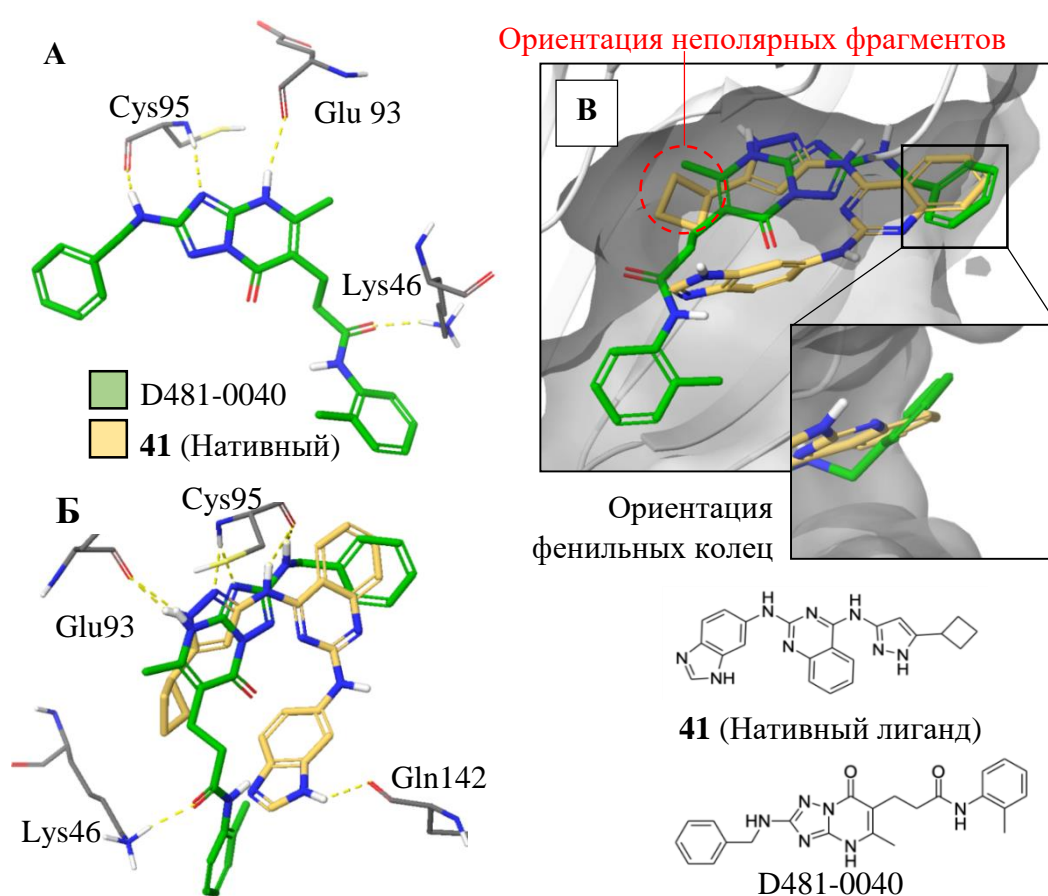
Обращаем ваше внимание, что в верхних строчках рейтинга по значению скоринга преобладают соединения из кластеров 1 (как и в целом во всем рейтинге из-за большого размера кластера), встречаются кластеры 2, 6, 8, 9. Режим связывания соединения D481-0040 (кластер 8), лидирующего по значению скоринговой функции, однако демонстрирующего весьма среднюю рассчитанную свободную энергию связывания ( $<50$  ккал/моль) представлен на рисунке 17. Как можно увидеть, лиганд образует ключевое парное взаимодействие с остатком Cys95, а также Glu93 за счет удачного расположения аминотриазолопиридазинового скаффолда в центральной гидрофобной области сайта (см. значение дескриптора XP PhobEnPairHB). Амидный линкер, ориентирующий ароматическое кольцо к выходу из сайта дополнительно обеспечивает образование водородной связи с консервативным для ULK1/2 остатком лизина. Кроме того, можно заметить, что в целом режим связывания D481-0040 совпадает с режимом нативного лиганда: оба ориентируют неполярные фрагменты в гидрофобный карман, совпадает расположение ароматических мотивов в области Leu 145, Glu 98, Asp 89, однако бензольное кольцо соединения библиотеки гораздо сильнее выдвинуто в область, доступную для растворителя, что уменьшает скоринг (рисунок 17).

Представитель кластера 6 - M350-0197 – занимает второе место в рейтинге XP GScore, однако примечательно, что данное соединение также демонстрирует значение  $\Delta G_{\text{bind}} \text{MMGBSA} = - 56.20$  ккал/моль – приближаясь к значению нативного лиганда (таблица 4).

Воспроизводя паттерн с каскадом из трех водородных связей в глубине сайте и схожим образом ориентируя ароматический фрагмент, данный лиганд простирает оксодиазольный мотив за пределы кармана связывания, укладывая фенил в ложбину, образованную остатками Lys32, Asp20, Ile22, где образует с ними гидрофобные взаимодействия (рисунок 18 и таблица 4).

Таблица 4 – Значения вкладов водородных связей и гидрофобных взаимодействий для соединений-лидеров (ULK1)

| Номер соединения     | XP GScore,<br>ккал/моль | MM GBSA<br>$\Delta G_{\text{bind}}$ ,<br>ккал/моль | XP HBond,<br>ккал/моль | XP PhobEn,<br>ккал/моль |
|----------------------|-------------------------|--|------------------------|-------------------------|
| <b>41</b> (Нативный) | -10.591                 | -55.62   | -1.893                 | -0.246                  |
| D481-0040            | -9.753                  | -42.68   | -1.943                 | -0.125                  |
| M350-0197            | -9.293                  | -56.20   | -1.636                 | -0.440                  |



Желтый – нативный лиганд, зеленый - D481-0040; желтый пунктир – водородные связи  
 А – Режим связывания соединения D481-0040; Б – наложение структур данного соединения и нативного лиганда **41** в связывающих конформациях; В – сравнение поз связывания указанных соединений.

Рисунок 17 – Связывание соединения D481-0040 в активном сайте ULK1.

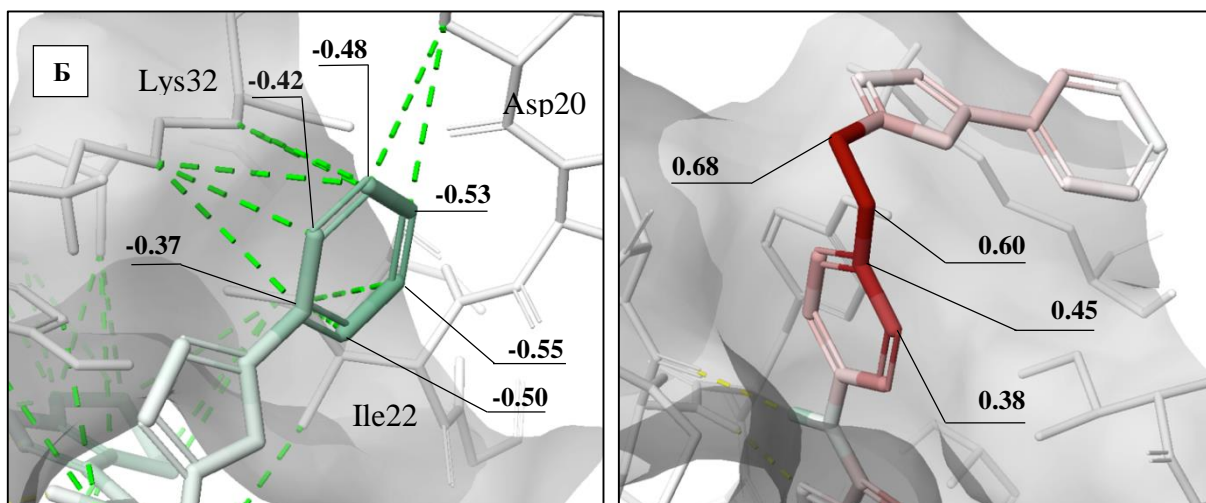
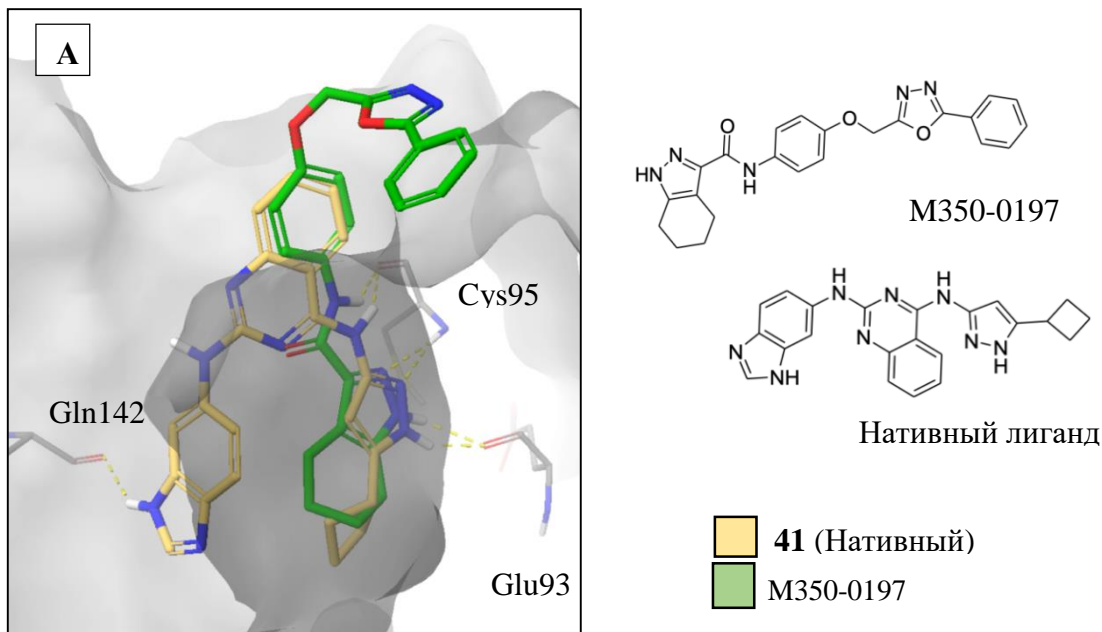
Потерю в скоринге ХР можно объяснить отсутствием дополнительного связывания с вышеупомянутым остатком Lys32, а также весьма напряженной конформацией (особенно в области вектора выхода из сайта) (рисунок 18).

Условная группа соединений-лидеров обогащена представителями первого кластера. 2-аминодигидрохиназолиноновый скаффолд отлично позволяет образовывать коррелированную водородную связь с остатком Cys95, однако взаимодействие с Glu воспроизвести не удастся, что безусловно отражается на скоринге. Ориентированные в апикальные области сайта ароматические фрагменты удачно образуют каскад локальных гидрофобных взаимодействий, однако глубокий карман (в который нативный лиганд ориентирует циклобутильный фрагмент) остается неоккупированным (рисунок 19).

Как продемонстрировано на рисунке 19, одно из соединений данного кластера в отличие от остальных обладает еще относительно низким значением рассчитанной свободной энергии связывания, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального хита.

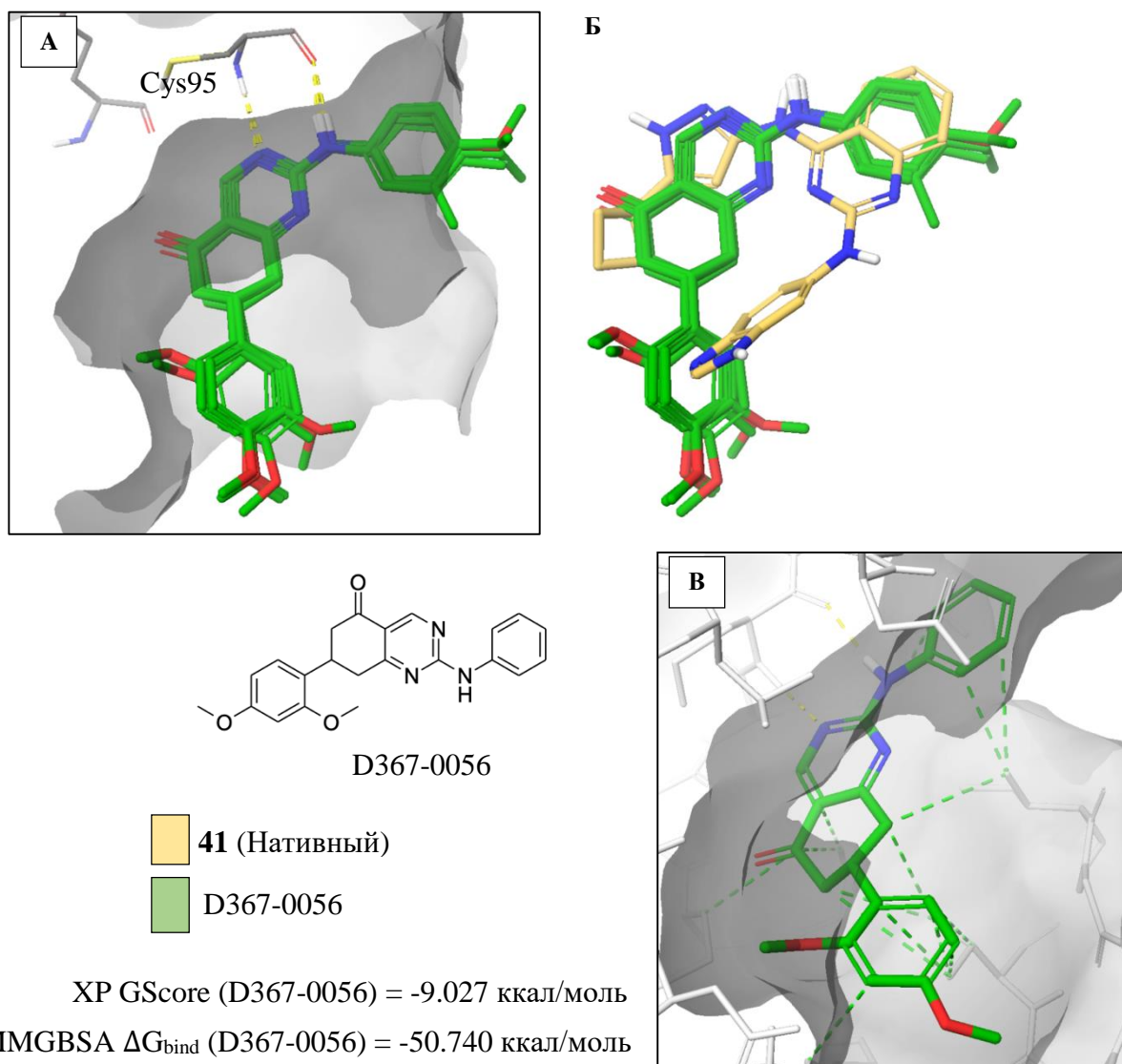
Представленный в единственном экземпляре представитель 12 кластера -F725-0015 – демонстрирует интересный режим связывания (рисунок 20).

6-Аминопиримидиновое ядро позволяет образовать ключевое взаимодействие с Cys, а относительно длинный амидопирролидоновый фрагмент из-за подвижности алкильного линкера простирается в доступную для растворителя область, где образует ионные взаимодействия с остатками Asp в позициях 99 и 102 (карбоксильная группа последнего также выступает в виде донора водородной связи); амидный азот связывается также с Pe22 на выходе из сайта. Стоит отметить, что в целом конформация F725-0015 является достаточно напряженной, а ориентация довольно крупного мотива во внешнюю полость в целом является нежелательной (ХР ExposPen = 0.610 ккал/моль – максимальное значение в группе лидеров).



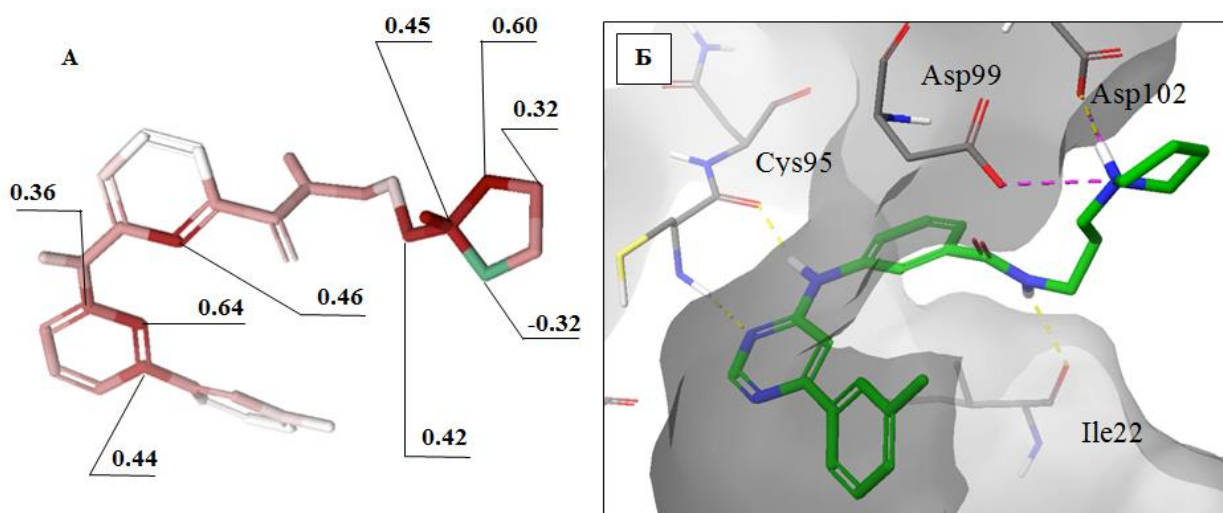
Желтый пунктир – водородные связи, зеленый пунктир – гидрофобные контакты  
 А – Структура и наложение М350-0197 (желтый) и нативного лиганда **41** (зеленый) в связывающих конформациях; Б – выгодная укладка фенила на поверхности ULK (визуализация энергии Prime): показан поатомный вклад в значение MMGBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ , ккал/моль; В – напряженность структуры фенилметоксильного линкера: показан поатомный вклад в значение MMGBSA  $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{LigStrain}}$ , ккал/моль

Рисунок 18 – Режим связывания М350-0197 в комплексе ULK1



А – Связывание представителей кластера 1 в активном сайте; Б – наложение структур соединений кластера 1 и нативного лиганда **41** в связывающих конформациях; Б – выгодная ориентация боковых ароматических фрагментов.

Рисунок 19 – Режимы связывания соединений кластера 1 в активном сайте ULK1



Желтый пунктир – водородные связи, фиолетовый пунктир – ионные взаимодействия  
 А – Визуализация MMGBSA  $\Delta G_{\text{bind}}$  LigandStrain; Б – связывающая конформация соединения F725-0015 в сайте ULK1.

Рисунок 20 – Режим связывания соединения F725-0015

Напоследок среди лидеров хотелось бы отметить соединения из кластера 2, базирующиеся на 2-аминотиазольном скаффоле, который позволяет связываться с Cys в центре сайта. Как и в предыдущих случаях, наблюдается некоторая гомология ориентации лигандов по сравнению с нативным. В частности, хлорзамещенный фенильный фрагмент отлично стыкуется в гидрофобной полости сайта (рисунок 21).



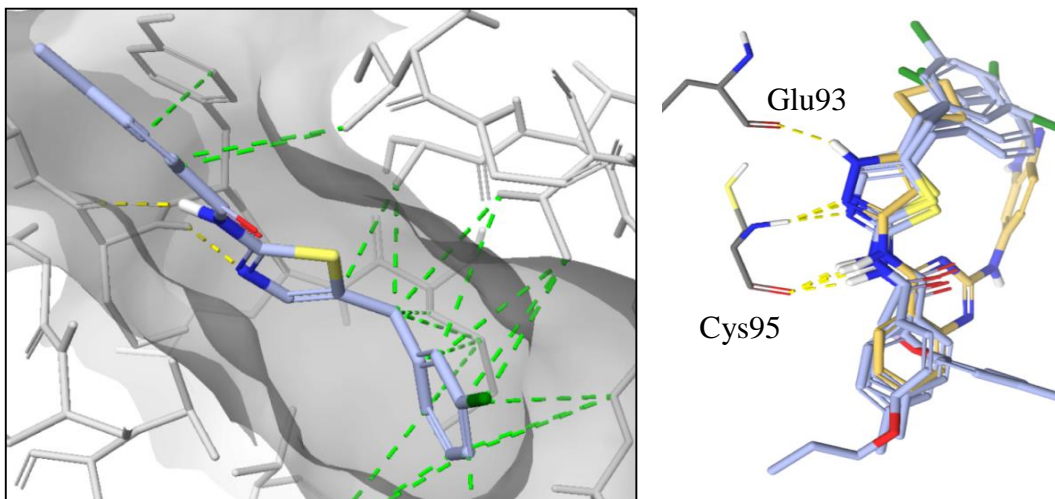
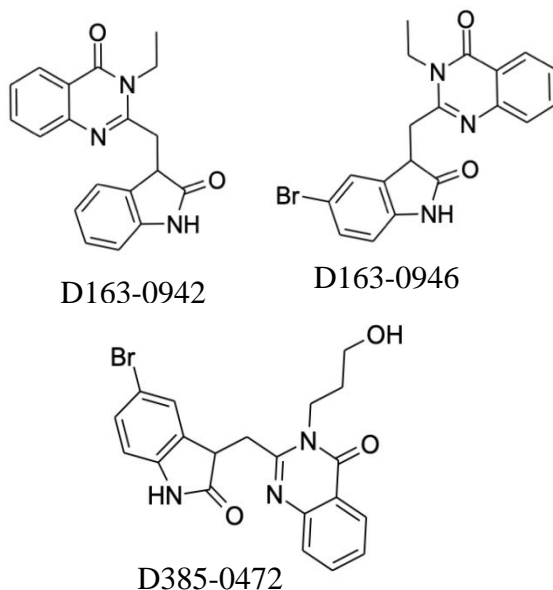
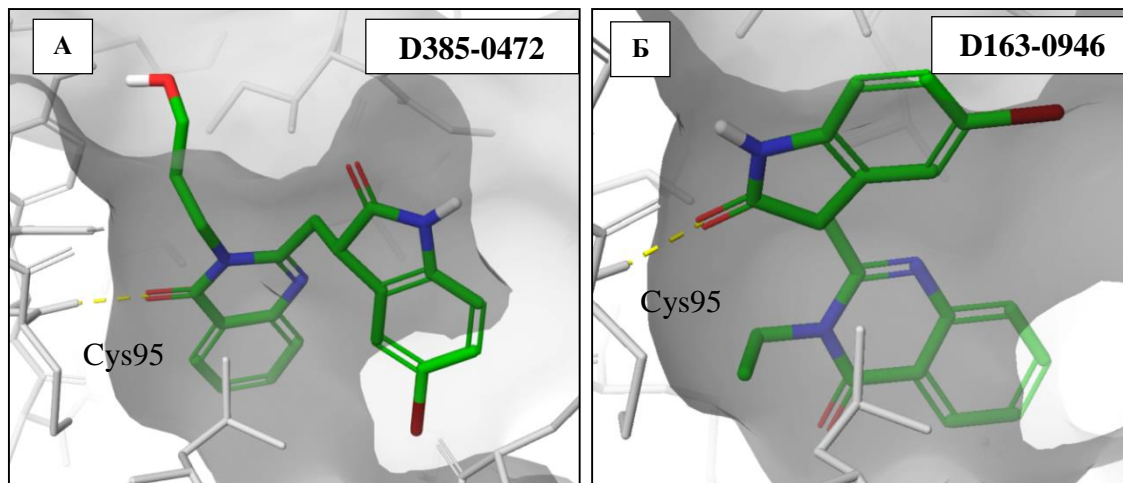


Рисунок 21 – Связывание 2-аминотиазолов (кластер 2) в сайте ULK1

Обсуждая режимы связывания соединений-аутсайдеров, в первую очередь хотелось бы отметить тенденцию к потере коррелированной водородной связи с остатком Cys95, также не встречается ни одного соединения, связывающегося с Glu93. Кроме прочего, сходство с позой нативного лиганда проявляется меньше. На рисунке 22 представлены связывающие конформации для лигандов D385-0472, D163-0946, D163-0942. Отсутствие парной связи с консервативным Cys отражается в нулевом значении дескриптора XP PhobEnPairHB, также (по сравнению с соединениями, ранжируемыми в верхних строчках списка) можно обратить внимание на заметное снижение общего вклада водородных связей (см. дескриптор XP HBond), в случае D385-0472 и D163-0942 алгоритм оценки назначает структурам штрафы за невыгодную ориентацию в область, доступную для растворителя (XP ExposPen = 0.507 и 0.710 ккал/моль для D385-0472 и D163-0942, соответственно) (рисунок 22).



| Номер соединения | XP GScore, ккал/моль | XP HBond, ккал/моль | XP ExposPen, ккал/моль |
|------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| D163-0942        | -2.029               | -1.330              | 0.507                  |
| D163-0946        | -2.578               | -0.744              | 0.000                  |
| D385-0472        | -3.012               | -0.700              | 0.710                  |

А – Связывание D385-0472 в активном сайте ULK1; Б – связывание D163-0946 в активном сайте ULK1; В – Структуры и значения дескрипторов XP некоторых соединений-аутсайдеров.

Рисунок 22 – Режимы связывания соединений-аутсайдеров в сайте ULK1.

#### 2.4.2 Идентификация потенциальных хитов

Проанализировав результаты стыковки в комплекс ULK1, мы предприняли попытку идентифицировать среди результатов соединения виртуального скрининга те соединения, которые смогут потенциально проявлять активность *in vitro* – то есть являться ингибиторами аутофагии.

Дополнительно мы также провели докинг в комплекс ULK2 (PDB ID: 6YID [68]) – результаты представлены в приложении А (таблица А.2). В

целом можно отметить, что среди результатов стыковки в структуру второй изоформы Unc51-подобной киназы тенденции к лидерству показывают одни и те же соединения (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты виртуального скрининга для комплекса ULK1 (PDB ID: 4WNP) в сравнении результатами скрининга для комплекса ULK2 (PDB ID: 6YID)

| ULK1 (PDB ID: 4WNP)     |               |                      |                                       | ULK2 (PDB ID: 6YID)     |               |                      |                                       |
|-------------------------|---------------|----------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------|----------------------|---------------------------------------|
| Код соединения          | Cluster Index | XP GScore, ккал/моль | MM GBSA $\Delta G_{bind}$ , ккал/моль | Код соединения          | Cluster Index | XP GScore, ккал/моль | MM GBSA $\Delta G_{bind}$ , ккал/моль |
| 1                       | 2             | 3                    | 4                                     | 5                       | 6             | 7                    | 8                                     |
| <b>41</b><br>(Нативный) | -             | -10.740              | -55.62                                | <b>44</b><br>(Нативный) | -             | -9.089               | -59.61                                |
| D481-0040               | 8             | -9.753               | -42.68                                | F538-1697               | 9             | -9.031               | -56.24                                |
| M350-0197               | 6             | -9.293               | -56.20                                | D481-0066               | 6             | -8.906               | -39.88                                |
| Y020-1398               | 1             | -9.241               | -44.26                                | D481-0040               | 8             | -8.846               | -42.68                                |
| D367-0350               | 1             | -9.226               | -39.31                                | D126-0182               | 6             | -8.651               | -46.78                                |
| F725-0015               | 12            | -9.167               | -42.23                                | M008-3495               | 13            | -8.549               | -43.90                                |
| D463-0114               | 6             | -9.145               | -43.52                                | M350-0197               | 6             | -8.538               | -56.20                                |
| D367-0056               | 1             | -9.027               | -50.74                                | D481-0098               | 8             | -8.516               | -40.80                                |
| D367-0434               | 1             | -9.003               | -44.76                                | S606-0855               | 6             | -8.501               | -46.34                                |
| D367-0277               | 1             | -8.996               | -44.26                                | 8582-1709               | 2             | -8.369               | -54.02                                |
| D367-0248               | 1             | -8.996               | -37.75                                | D367-0056               | 1             | -8.276               | -50.74                                |
| D367-0158               | 1             | -8.992               | -40.65                                | F725-0015               | 12            | -8.276               | -42.23                                |
| D367-0386               | 1             | -8.959               | -45.10                                | 2389-2848               | 2             | -8.254               | -55.56                                |
| D367-0183               | 1             | -8.838               | -44.38                                | D367-0350               | 1             | -8.221               | -39.31                                |
| F538-1697               | 9             | -8.777               | -56.24                                | D367-0246               | 1             | -8.217               | -48.90                                |
| D367-0335               | 1             | -8.748               | -38.98                                | D367-0158               | 1             | -8.217               | -40.65                                |
| D367-0328               | 1             | -8.746               | -35.55                                | D367-0183               | 1             | -8.202               | -44.38                                |
| D367-0236               | 1             | -8.614               | -44.38                                | D367-0434               | 1             | -8.201               | -44.76                                |
| D367-0436               | 1             | -8.529               | -47.91                                | S055-1353               | 6             | -8.178               | -31.69                                |
| D126-0182               | 6             | -8.485               | -46.78                                | D367-0322               | 1             | -8.171               | -38.00                                |
| D367-0322               | 1             | -8.414               | -38.00                                | D367-0429               | 1             | -8.168               | -36.61                                |
| Y020-1462               | 1             | -8.388               | -41.39                                | D367-0279               | 1             | -8.153               | -37.66                                |
| 2389-2848               | 2             | -8.366               | -55.56                                | D443-0073               | 2             | -8.137               | -48.62                                |
| P592-0478               | 14            | -8.361               | -37.42                                | 2381-0931               | 2             | -8.136               | -53.56                                |
| 3966-3951               | 2             | -8.347               | -53.90                                | D163-0946               | 3             | -8.100               | -40.23                                |
| D481-0066               | 6             | -8.301               | -39.88                                | Y020-1399               | 1             | -8.086               | -39.13                                |

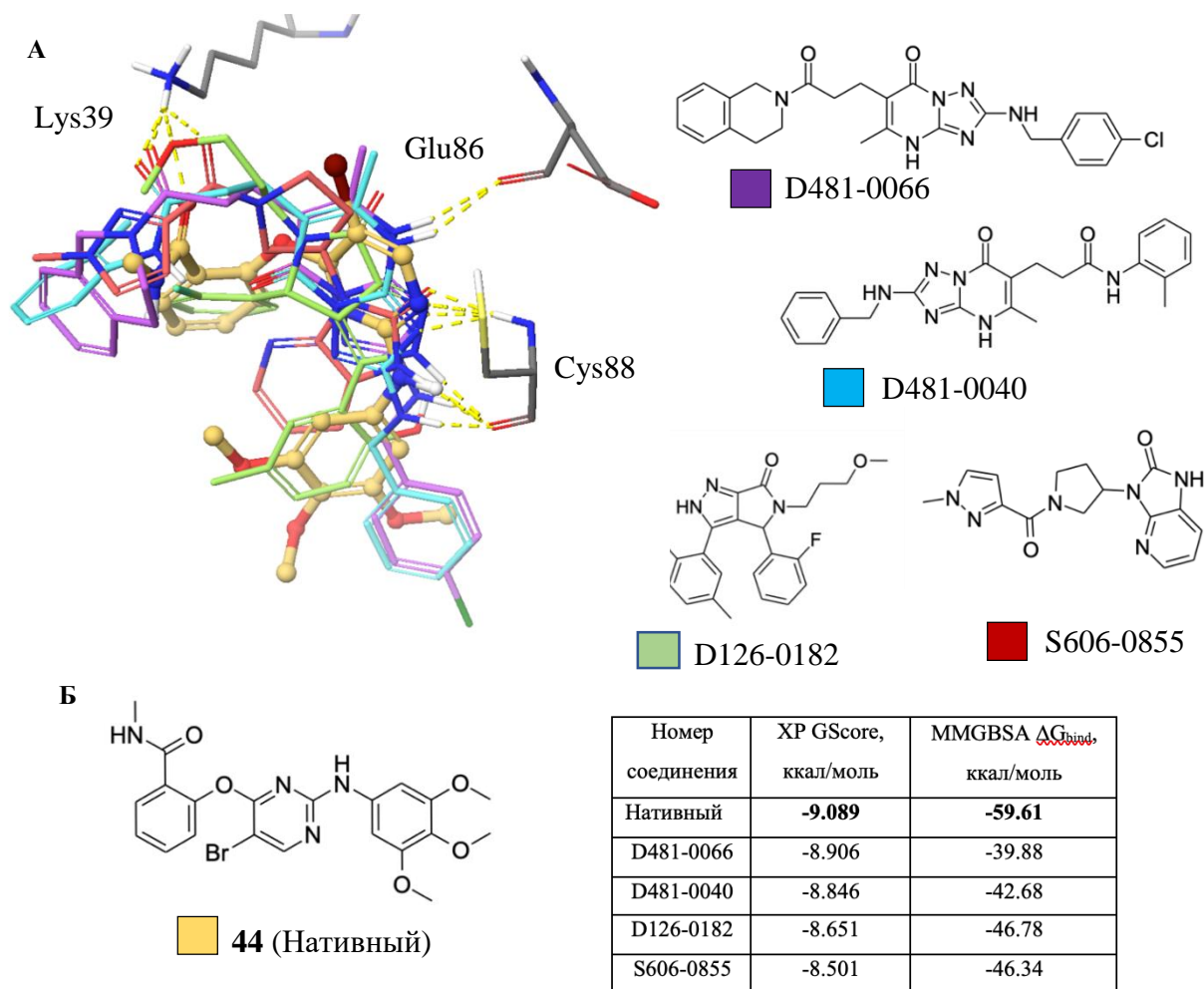
Продолжение таблицы 5

| 1         | 2  | 3      | 4      | 5         | 6  | 7      | 8      |
|-----------|----|--------|--------|-----------|----|--------|--------|
| Y020-1399 | 1  | -8.220 | -39.13 | Y020-1462 | 1  | -8.072 | -41.39 |
| 7997-0024 | 6  | -8.183 | -41.30 | 4109-1944 | 4  | -8.069 | -49.20 |
| 4264-1935 | 2  | -8.181 | -51.99 | 2389-2102 | 2  | -8.044 | -52.29 |
| 2389-2207 | 2  | -8.169 | -46.67 | 8341-0092 | 1  | -8.031 | -46.25 |
| 3966-3951 | 2  | -8.347 | -53.90 | D163-0946 | 3  | -8.100 | -40.23 |
| D481-0066 | 6  | -8.301 | -39.88 | Y020-1399 | 1  | -8.086 | -39.13 |
| Y020-1399 | 1  | -8.220 | -39.13 | Y020-1462 | 1  | -8.072 | -41.39 |
| 7997-0024 | 6  | -8.183 | -41.30 | 4109-1944 | 4  | -8.069 | -49.20 |
| 4264-1935 | 2  | -8.181 | -51.99 | 2389-2102 | 2  | -8.044 | -52.29 |
| 2389-2207 | 2  | -8.169 | -46.67 | 8341-0092 | 1  | -8.031 | -46.25 |
| 2389-2102 | 2  | -8.169 | -52.29 | C387-1583 | 11 | -8.005 | -39.76 |
| D367-0246 | 1  | -8.150 | -48.90 | P592-0475 | 14 | -8.005 | -38.83 |
| 8582-1676 | 6  | -8.142 | -41.96 | D367-0386 | 1  | -8.002 | -45.10 |
| F091-0880 | 13 | -8.126 | -45.80 | D367-0277 | 1  | -7.982 | -44.26 |
| P774-4295 | 14 | -8.078 | -34.91 | 3966-3951 | 2  | -7.974 | -53.90 |
| D367-0275 | 1  | -8.048 | -46.93 | 8211-0170 | 1  | -7.972 | -45.60 |
| 8211-0179 | 1  | -8.045 | -45.76 | 8211-0170 | 1  | -7.972 | -45.60 |
| P592-0447 | 14 | -8.039 | -36.08 | D367-0436 | 1  | -7.919 | -47.91 |
| D481-0098 | 8  | -8.008 | -40.80 | Y020-1398 | 1  | -7.912 | -44.26 |
| P592-0452 | 14 | -8.000 | -43.98 | F725-0720 | 12 | -7.900 | -41.66 |
| F725-0720 | 12 | -7.994 | -41.66 | D385-0472 | 1  | -7.879 | -49.76 |
| D367-0429 | 1  | -3.933 | -36.61 | D367-0269 | 1  | -6.524 | -43.37 |
| M008-3495 | 13 | -3.878 | -43.90 | F722-0236 | 5  | -6.267 | -36.98 |
| SD30-0092 | 6  | -3.334 | -49.06 | 8578-0231 | 7  | -6.175 | -46.12 |
| D385-0472 | 1  | -3.012 | -49.76 | M008-0168 | 2  | -6.130 | -43.80 |
| D163-0946 | 3  | -2.578 | -40.23 | D367-0275 | 1  | -5.034 | -46.93 |
| D718-1652 | 6  | -2.531 | -45.51 | Y020-2784 | 1  | -4.887 | -40.01 |
| D163-0942 | 3  | -2.029 | -46.82 | SD30-0092 | 6  | -1.185 | -49.06 |

Красный – соединения-аутсайдеры; зеленый – лиганды, демонстрирующие одновременно низкие значения XP и MMGBSA  $\Delta G_{\text{Bind}}$ .

Среди 90 структур, связывающие позы которых были идентифицированы алгоритмом стыковки, ни одна так и не смогла сравниться по значению скоринга с нативным лигандом. Можно отметить, что верхние строчки рейтинга также обогащены кластерами 1, 2, 6, 8. Режимы их связывания схожи с таковыми для комплекса ULK1 (из-за высокой степени гомологии изоформ). Большая часть лидеров воспроизводит

паттерн коррелированного взаимодействия с остатком Cys88 и Lys39 (на выходе из сайта), однако лидирующие структуры могут образовывать также дополнительную связь с консервативным Glu86. В сравнении с нативным лигандом не наблюдается четкого совпадения ароматических фрагментов, как было в комплексе ULK1, но ориентация осуществляется приблизительно в те же области сайта (рисунок 23).



Желтый пунктир – водородные связи

А – Структуры соединений-лидеров, их наложение с нативным лигандом в связывающих конформациях. Б – Структура нативного лиганда **44**, значения XP GScore и MMGBSA  $\Delta G_{bind}$  нативного лиганда и соединений-лидеров.

Рисунок 23 – Связывание в комплексе ULK1 (PDB ID: 4WNP)

При идентификации хитов мы руководствовались следующими соображениями. Во-первых, были проведены ранжирование лигандов согласно значениям их свободной энергии связывания и отбор тех структур, которые одновременно демонстрировали как низкое значение MMGBSA  $\Delta G_{\text{bind}}$ , так и низкие значения XP функции. Во-вторых, особое внимание обращалось на те хемотипы, которые встречались в верхних строчках рейтинга результатов для обеих структур. Отобранные соединения представлены в таблице ниже (таблица 6).

Таблица 6 – Отобранные потенциальные хиты

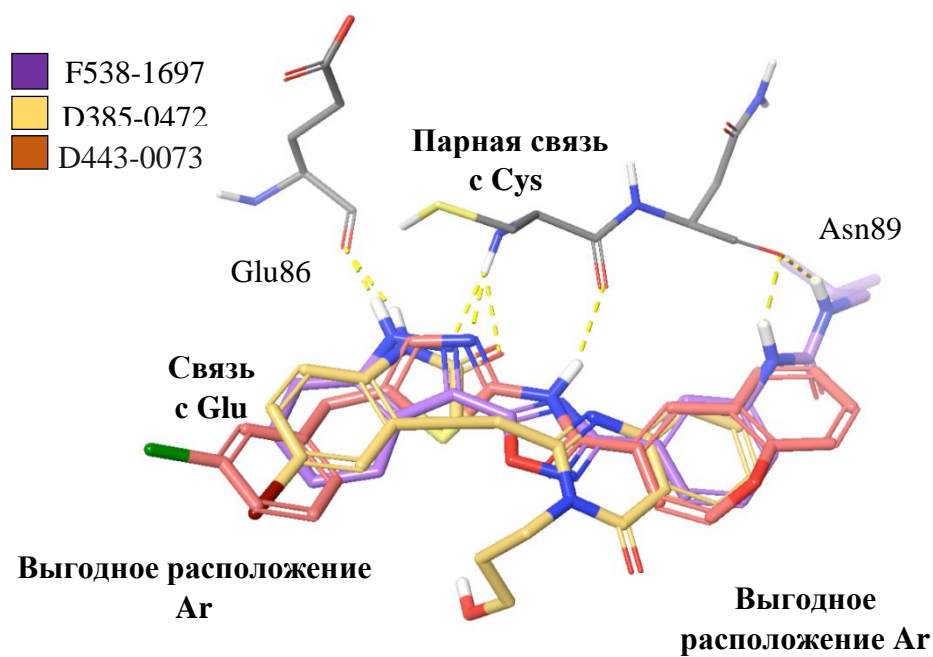
| Код соединения | MMGBSA $\Delta G_{\text{bind}}$ , ккал/моль | ULK1 (PDB ID: 4WNP)  | ULK2 (PDB ID: 6YID)  |
|----------------|---|----------------------|----------------------|
|                |   | XP GScore, ккал/моль | XP GScore, ккал/моль |
| 1              | 2   | 3                    | 4                    |
| F538-1697      | -56.24                                      | -8.777               | -9.031               |
| M350-0197      | -56.20                                      | -9.293               | -8.538               |
| 2389-2848      | -55.56                                      | -8.366               | -8.254               |
| 4109-1941      | -54.11                                      | -6.499               | -6.850               |
| 3966-3951      | -53.90                                      | -8.347               | -7.974               |
| 4109-2010      | -53.88                                      | -7.408               | -6.792               |
| 2381-0931      | -53.56                                      | -7.702               | -8.136               |
| 2389-2102      | -52.29                                      | -8.169               | -8.044               |
| 4264-1935      | -51.99                                      | -8.181               | -7.479               |
| D367-0056      | -50.74                                      | -9.027               | -8.276               |
| 4109-1944      | -49.20                                      | -6.867               | -8.069               |
| D367-0246      | -48.90                                      | -8.150               | -8.217               |
| D443-0073      | -48.62                                      | -7.928               | -8.137               |
| D367-0436      | -47.91                                      | -8.529               | -7.919               |
| D367-0427      | -47.17                                      | -7.994               | -7.755               |

Продолжение таблицы 6

| 1         | 2      | 3      | 4      |
|-----------|--------|--------|--------|
| D367-0275 | -46.93 | -8.048 | -5.034 |
| D126-0182 | -46.78 | -8.485 | -8.651 |
| 2389-2207 | -46.67 | -8.169 | -7.599 |
| 8341-0092 | -46.25 | -7.682 | -8.031 |
| 8582-1709 | -54.02 | -      | -8.369 |
| 4109-2097 | -48.03 | -5.617 | -7.817 |
| S606-0855 | -46.34 | -6.482 | -8.501 |
| 8341-0092 | -46.25 | -7.682 | -8.031 |
| 8582-1709 | -54.02 | -      | -8.369 |
| 4109-2097 | -48.03 | -5.617 | -7.817 |
| S606-0855 | -46.34 | -6.482 | -8.501 |
| D380-0151 | -46.17 | -4.682 | -7.542 |
| D367-0434 | -44.76 | -9.003 | -8.201 |
| 8582-1676 | -41.96 | -8.142 | -7.778 |
| P592-0447 | -36.08 | -8.039 | -7.340 |

Обращаясь к режимам связывания отобранных соединений, можно отметить следующие структурные закономерности. Во-первых, все структуры неизменно содержат скаффолды, образующие парную связь с консервативными остатками Cys и Glu. Во-вторых, все лиганды располагают в концевых областях сайта ароматические фрагменты (рисунок 24).

Немаловажным аспектом, обуславливающим аффинное связывание нативных лигандов, также является оккупация локальной гидрофобной полости, образованной остатками Ala164, Val76, Lys46, Ile 22. Ориентация в данную область гидрофобных групп вносит дополнительный вклад в связывание (рисунок 25).



(ULK1; PDB ID: 4WNP)

Рисунок 24 – Режимы связывания абсолютных лидеров

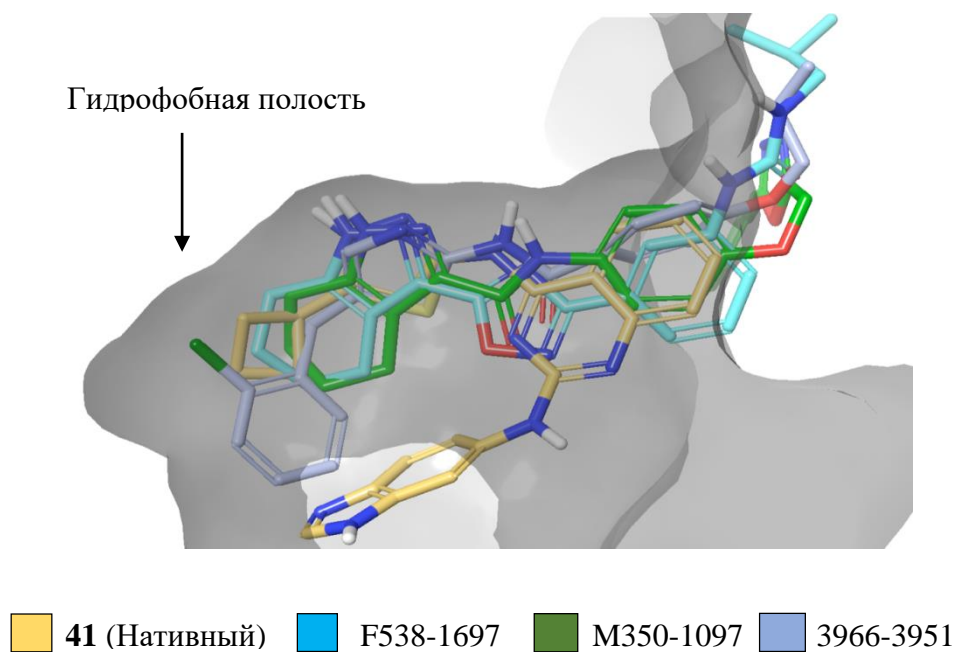


Рисунок 25 – Выгодное связывание в локальном гидрофобном кармане сайта



## 2.5 Результат *in vitro* исследования

После осуществления виртуального скрининга было проведено *in vitro* исследование на клональной клеточной линии НЕК 293, стабильно экспрессирующей плазмидную ДНК (Autophagy LC3 HiBiT Reporter). LC3 выступает в качестве маркера, который позволяет количественно определить уровень индукции/ингибирования процесса аутофагии с помощью люминесцентного сигнала. Белок LC3 участвует в образовании аутофагосомы; во время ингибирования аутофагии происходит его накопление, а в случае индукции, когда каскад аутофагии запускается, LC3 подвергается расщеплению в аутолизасоме.

Метод анализа представляет собой количественный формат, основанный на считывании люминесценции. Когда реагент, содержащий субстрат фуримазин и большую субъединицу LgBiT, добавляют к клеткам, экспрессирующим репортер аутофагии, HiBiT прочно связывается с LgBiT с образованием яркого люминесцентного фермента NanoLuc. Люминесцентный сигнал пропорционален количеству HiBiT-меченого репортера в клеточном лизате. Изменение люминесцентного сигнала отражает изменение аутофагического потока. Индукция аутофагии приводит к снижению уровней репортеров и уменьшению люминесцентного сигнала, в то время как ингибирование будет приводить к увеличению уровней репортеров и, соответственно, увеличению люминесцентного сигнала (таблица 7).

Таблица 7 – Результат оценки уровня экспрессии LC3-HiBiT (%)

| Код соединения | Уровень LC3-HiBiT (% от контроля) | Код соединения | Уровень LC3-HiBiT (% от контроля) | Код соединения | Уровень LC3-HiBiT (% от контроля) |
|----------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| 2389 2102      | 187.09±4.34                       | P592 0475      | 100.04±7.8                        | D367 0054      | 91.61±1.11                        |
| F091 0880      | 165.98±11.71                      | D367 0056      | 99.89±0.58                        | M008 3495      | 91.56±5.39                        |
| F725 0015      | 156.84±6.91                       | D367 0033      | 98.85±3.55                        | D367 0275      | 91.31±7.39                        |
| F725 0720      | 148.56±3.23                       | 8211 0186      | 98.69±1.68                        | 4109 2009      | 91.03±12.58                       |
| 8582 1676      | 143.88±10.95                      | 8341 0092      | 98.5±3.33                         | D718 1652      | 88.83±9.3                         |
| P592 0447      | 132.93±0.2                        | 2389 2207      | 98.43±3.56                        | D367 0335      | 88.47±5.28                        |
| 3966 3951      | 131.36±2.41                       | Y020 1398      | 98.28±0.36                        | J106 0271      | 88.1±4                            |
| D330 0151      | 117.97±4.69                       | SD30 0092      | 97.63±4.78                        | 8211 0170      | 87.78±6.71                        |
| D367 0328      | 114.88±2.97                       | 4109 2011      | 97.38±3.74                        | D367 0279      | 87.65±6.3                         |
| D367 0434      | 113.99±0.95                       | Y020 2784      | 96.67±9.06                        | 4109 2012      | 87.6±6.65                         |
| Y504 8080      | 109.89±10.63                      | Y030 3500      | 96.07±3.14                        | M350 0197      | 87.44±5.4                         |
| 4264 1935      | 109.25±7.01                       | Y020 1398      | 95.04±5.14                        | F722 0236      | 87.23±5.05                        |
| D163 0946      | 108.9±8.07                        | P774 4295      | 95.04±6.36                        | 8578 0231      | 87.05±1.09                        |
| D367 0269      | 108.54±6.39                       | 6383 0877      | 95.02±2.96                        | F722 0047      | 86.19±0.54                        |
| L367 0566      | 107.57±3.41                       | D443 0073      | 94.97±5.87                        | F722 0061      | 85.94±4.94                        |
| D385 0472      | 107.27±2.15                       | D367 0152      | 94.81±3.49                        | Y020 1462      | 85.69±6.74                        |
| 2389 2848      | 107.07±1.3                        | D367 0322      | 94.6±0.34                         | D367 0248      | 85.49±3.71                        |
| 8582 1709      | 106.94±1.07                       | D367 0429      | 94.35±0.22                        | F722 0074      | 84.45±2.58                        |
| K788 4490      | 106.88±1.27                       | D367 0246      | 94.29±10.32                       | C387 1583      | 84.37±10.03                       |
| P592 0452      | 106.48±2.96                       | Y030 3507      | 94.27±3.51                        | D367 0436      | 84.03±4.12                        |
| F091 0100      | 106.44±4.67                       | S055 1353      | 94.11±0.78                        | D367 0350      | 82.41±3.59                        |
| 4109 2010      | 105.09±7.02                       | S606 0855      | 93.9±2.07                         | 4109 2097      | 81.99±0.51                        |
| D367 0236      | 104.47±3.62                       | 4109 1944      | 93.48±5.16                        | D481 0066      | 81.95±11.76                       |
| Y030 3487      | 104.39±5.28                       | D367 0386      | 93.15±5.44                        | C768 0885      | 79.67±3.21                        |
| P592 0478      | 103.94±8.11                       | 2381 0931      | 92.92±1.36                        | 4109 1941      | 76.11±0.51                        |
| M008 0168      | 103.49±6                          | 4109 1933      | 92.73±5.91                        | D463 0114      | 73.66±6.36                        |
| D163 0942      | 102.16±6.25                       | D367 0277      | 92.52±1.78                        | D481 0040      | 72.24±8.28                        |
| D367 0183      | 101.6±1.83                        | D367 0427      | 92.09±2.52                        | E006 0403      | 69.44±6.53                        |
| 8211 0179      | 101.59±3.58                       | 7997 0024      | 91.75±2.84                        | F538 1697      | 68.69±0.56                        |
| Y020 1399      | 100.27±9.47                       | D367 0158      | 91.75±0.73                        | D481 0098      | 66.59±1.26                        |

Красным цветом выделены соединения-ингибиторы аутофагии, синим обозначены соединения-индукторы.

После проведения виртуального скрининга, было выделено 90 соединений-лидеров, которые в дальнейшем были протестированы *in vitro*. 7 соединений проявили себя в качестве ингибиторов процесса аутофагии. Исходя из полученных данных можно определить значение «Hit rate» проведенного виртуального скрининга, как представлено в формуле 8.

$$\text{Hit rate} = \frac{n(\text{Hit } in \text{ vitro})}{n(\text{CompLib})} \times 100\% = \frac{7}{90} \times 100\% = 7.78\% \quad (8)$$

где  $n(\text{Hit } in \text{ vitro})$  – количество хитов по результатам скрининга соединений на репортерной клеточной линии НЕК 293;  
 $n(\text{CompLib})$  – общее количество исследуемых соединений.

### **3 Экспериментальная часть**

#### **3.1 Компьютерное моделирование**

Все расчеты в процессе выполнения данной выпускной квалификационной работы проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2023-1 на рабочей станции Mac Pro 2013, снабженной процессором Intel Xenon E5 (6 ядер, тактовая частота 3.5 ГГц) под управлением ОС Ubuntu 22.04.

##### **3.1.1 Подготовка структур белка**

Кристаллические структуры ULK1 (PDB ID: 4WNP, 6MNH, 6QAS) и ULK2 (PDB ID: 6QAT и 6YID), обладающие разрешением  $<2.5 \text{ \AA}$  были загружены из Protein Data Bank [52]. Подготовка осуществлялась с помощью модуля ProteinPreparationWorkflow [62]. Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, уточнены порядки связей, состояние протонирования уточнено с использованием алгоритма Epik [72] при диапазоне  $\text{pH} = 7 \pm 2$ . Молекулы воды и гетероатомы кроме лигандов удалены из структур.

##### **3.1.2 Генерация грид-сеток**

Грид-боксы для загруженных структур рассчитаны с помощью модуля ReceptorGridGeneration. Область стыковки определялась как куб с ребром  $20 \text{ \AA}$ , центр которого совпадал с центром масс нативного лиганда. Параметры масштабирования радиусов Ван-дер-Ваальса и отсечки значений частичных зарядов были установлены по умолчанию и не изменялись. Дополнительно были указаны остатки, с которыми нативные лиганды образовывали водородные связи. Всем тиольным или гидроксильным группам аминокислот сайта было позволено вращение.

### **3.1.3 Нативный докинг**

Структуры нативных лигандов были удалены из сайтов, а затем подвергнуты стыковке с помощью модуля LigandDocking в режиме «flexible» на протоколе точности Glide XP [70] с расчетом RMSD. Для проведения виртуального скрининга были отобраны грид-боксы, демонстрирующие  $\text{RMSD} < 1.250 \text{ \AA}$ . Дополнительно с помощью модуля Prime [73] был проведен расчет свободной энергии связывания методом MM GBSA [53], все параметры были установлены по умолчанию.

### **3.1.4 Подготовка виртуальных библиотек**

Для проведения виртуального скрининга из доступных каталогов ChemDiv [51] были загружены следующие библиотеки соединений в формате sdf:

- библиотека фенотипического скрининга [54];
- аннотированная библиотека человеческих киназ [55];
- библиотека ингибиторов протеинкиназ [56];
- библиотека разнообразия на основе 3D-фармакофоров [57];
- библиотека, ориентированная на аутофагию [58].

Структуры лигандов были подготовлены с помощью модуля LigPrep; хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования с использованием алгоритма Epik [72] при диапазоне  $\text{pH} = 7 \pm 2$ . Дополнительно проводился расчет физико-химических свойств с помощью модуля QikProp [60]. Библиотеки использовались для скрининга без предварительной фильтрации.

### **3.1.5 Виртуальный скрининг**

После подготовки все структуры библиотек были подвергнуты процедуре виртуального скрининга, выполняемого с помощью модуля VirtualScreeningWorkflow в грид-боксы 4WNP [49] и 6YID [68] для ULK1 и ULK2, соответственно. Стыковочная воронка включала первичную оценку на протоколе точности HTVS с сохранением 40% лучших соединений, их

повторную стыковку в режиме Glide SP [69] и финальный XP [70] докинг 10% лигандов. Заключительный расчет свободной энергии методом ММ GBSA [53] проводился для 10% структур, обладающих самыми низкими значениями скоринговой функции.

## **3.2 Биологические испытания**

### **3.2.1 Реагенты и оборудования**

Для проведения биологических исследований использовались: ламинарный шкаф II класса защиты (SafeFast Elite, Italy), инвертированный микроскоп (ZEISS Primovert, Germany), CO<sub>2</sub>-инкубатор (Binder, Germany), автоматический счетчик клеток (TC20, Bio-Rad, USA), планшетный ридер (Promega, США), криохранилище (Thermo Fisher Scientific, USA), центрифуга (Elmi centrifuge CM-75, Latvia), механический дозатор на 300 мкл (Eppendorf Research Plus, Germany), механический дозатор на 1000 мкл (Eppendorf, Germany), питательная среда DMEM (Gibco, UK), базальная питательная среда Opti-MEM (Gibco, UK), фетальная бычья сыворотка (FBS) (Gibco, UK), фосфатно-буферный раствор (PBS) (Capricorn Scientific, USA), 0.4% раствор трипанового синего (cGMP, USA), GlutaMax (Gibco, UK), клеточная культура НЕК 293 (ATCC, USA), плазмидная ДНК (Autophagy LC3-HiBiT Reporter, Promega, USA), реагент для трансфекции (FuGENE HD, Promega, USA), ДМСО (Invitrogen, USA), культуральный флакон 75 см<sup>2</sup> (Eppendorf, Germany), белые 96-луночные планшеты (Eppendorf, Germany), 6-луночные планшеты для адгезивных культур (Eppendorf, Germany), центрифужные пробирки (Eppendorf, Germany), серологические пипетки на 5 мл, 10 мл, 25 мл и 50 мл (Eppendorf, Germany), наконечники на 300 мкл и 1000 мкл (Vertex, USA), планшетный ридер (Promega, USA), Nano-Glo HiBiT Lytic Buffer (Promega, USA), антибиотик G-418, субстрат фуримазин (Promega, USA).

### **3.2.2 Культивирование клеток**

Клетки НЕК 293 поддерживали в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки FBS и GlutaMax (2 мкМ). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95% воздуха 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Субконфлюэнтные монослои в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express в фосфатно-солевом буфере и трижды промывали PBS. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

### **3.2.3 Получение клональных клеточных линий**

Условия культивирования клеток и трансфекция:

Клеточная линия НЕК293 культивировалась в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5% концентрации углекислого газа. Пассаж клеток происходил каждые 3-4 дня с плотностью посева  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.

Подготовка клеток к трансфекции включала в себя процесс трипсинизации и подсчета. Трансфекцию выполняли с использованием соотношения 1:3 ДНК и реагента для трансфекции (FuGENE HD) в базальной среде Opti-MEM. За день до трансфекции клеточную линию пересадили в 6-луночный планшет в количестве  $5 \times 10^5$  на лунку, инкубировали при 37 °С и 5% содержанием CO<sub>2</sub> в течение ночи. Конструкцию для трансфекции получали разведением 1 мкг плазмидной ДНК (Autophagy LC3-HiBiT Reporter) в 250 мкл базальной среды Opti-MEM I, последовательно вносили 3 мкл FuGENE HD, инкубировали 15 минут при комнатной температуре, после полученную смесь по каплям вносили в лунки с клетками, инкубируя при 37 °С и 5% содержанием CO<sub>2</sub>, через 24 часа после трансфекции заменили исходную на свежую питательную среду.

Отбор трансфицированных клеток производили при помощи препарата селекции G-418: адгезивные клетки трипсинизировали и пересаживали в 6-ти

луночные планшеты со средой, содержащей антибиотик G-418 (500 мкг/мл) в целях масштабирования.

Далее следовал этап клонирования клеток с разведением. Клетки трипсинизировали для получения суспензии единичных клеток, разводили суспензию для достижения концентрации 10 кл/мл, пересаживали в 96-луночные планшеты с учетом достижения низкой плотности клеток в одной лунке, инкубировали в среде, содержащей препарат селекции, до формирования колоний. Выделенные гомоколонии подвергались масштабированию. В результате было получено 11 клонов, в дальнейшем оценивали уровень экспрессии LC3-HiBiT при помощи репортерной системы.

#### **3.2.4 Скрининг соединений на репортерной клеточной линии HEK293 LC3-HiBiT**

Трипсинизировали, ресуспендировали и производили расчет клеточной линии согласно методике культивирования.

Приготовили суспензию клеток, необходимую для анализа. Разбавили клетки дополнительной средой для культивирования для репортерных клеток HEK293 Autophagy LC3 HiBiT. Далее происходило клеточное разведение в каждой из лунок стерильных белых 96-луночных планшетов, с обработанной поверхностью.

Спустя ночь инкубации приготовили рабочие растворы исследуемых соединений в предварительно подогретой (22–37°C) среде для культивирования клеток. Внесли исследуемые образцы в лунки при трех повторах и инкубировали. После определенного времени инкубации клеток с соединениями приступили к оценке ингибирования/индукции аутофагии. Рассчитали количество литического реагента Nano-Glo HiBiT, необходимое для проведения эксперимента. Этот объем обычно равен общему количеству среды в лунках плюс любое дополнительное количество, необходимое для дозирования. Разбавили LgBiT Protein 1:100 и Nano-Glo HiBiT Lytic Substrate



1:50 в подходящем объеме Nano-Glo HiBiT Lytic Buffer при комнатной температуре в новой пробирке и перемешали.

Достали планшеты, содержащие клетки, которые экспрессируют Autophagy LC3 HiBiT Reporter, из инкубатора и оставили их при комнатной температуре в течение 10 минут.

Добавили объем Nano-Glo HiBiT Lytic Reagent, равный объему, присутствующему в каждой лунке. Для получения оптимальных результатов смешали образцы, поместили планшет на орбитальный шейкер (300–400 об/мин).

Спустя 10 минут, включая время встряхивания, для уравнивания связывания LgBiT и HiBiT в лизате, измерили люминесценцию на планшетном ридере Promega.

## Заключение

По результатам проделанной работы можно прийти к следующему заключению:

- были проведены подготовка кристаллических структур и анализ режимов связывания в них различных ингибиторов ULK1/2, в результате которого были идентифицированы ключевые взаимодействия лигандов в активных сайтах: большинство соединений взаимодействуют с Glu93/86 с образованием акцепторной водородной связи, а также демонстрируют киназный паттерн связывания – парное взаимодействие с Cys95/88;

- был проведен виртуальный скрининг пяти различных библиотек, в ходе которого удалось идентифицировать 90 коммерчески доступных соединений-хитов. В качестве лидирующих хемотипов были определены 2-аминодигидрохиназолиноновый скаффолд (кластер 1), 2-аминотиазольный скаффолд (кластер 2), а также *N*-фенилбензамид (кластер 6) и 5-метил-2-(метиламино)-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7(4*H*)-он (кластер 8). Ни одному из соединений не удалось продемонстрировать оценку XP GScore лучше, чем у кристаллических лигандов, однако разница незначительная и составляет для лидеров 0.5-2 ккал/моль;

- проанализированы режимы связывания выделенных нами лидеров: все они содержат скаффолды, образующие парную водородную связь с остатком Cys и одиночную – с Glu в центральной области сайта, а в концевых областях располагают сайта ароматические фрагменты;

- было проведено *in vitro* исследование на репортерной клеточной линии HEK293, стабильно экспрессирующей LC3-NiViT, в ходе которого выделено 7 соединений, ингибирующих процесс аутофагии (уровень LC3-NiViT у выявленных соединений составил  $131.36 \pm 2.41 - 187.09 \pm 4.34$  % от контроля); таким образом, проведенный *in vitro* скрининг демонстрирует хорошее значение Hit Rate = 7.78%

## Список используемой литературы

1. Shintani T. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword / T. Shintani // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – №. 5698. – P. 990-995.
2. White E. The role for autophagy in cancer / E. White // *J. Clin Invest.* – 2015. – Vol. 125. – №. 1. – P. 42-46.
3. Xie Z. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. / Z. Xie, D.J. Klionsky // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 1102-1109.
4. Wirawan E. Autophagy: for better or for worse / E. Wirawan, T. Vanden, S.Lippens et al. // *Cell Res.* – 2012. – Vol. 22. – №. 2. – P. 43-61.
5. Feng Y. The machinery of macroautophagy / Y. Feng, D. He, Z. Yao et al. // *Cell Res.* – 2014. – Vol. 24. – №. 4. – P. 24-41.
6. Oku M. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries / M. Oku, Y. Sakai // *BioEssays*. – 2018. – Vol. 40. – №. 6. – P. 1018-1025.
7. Dice J.F. Chaperone-Mediated Autophagy / J.F. Dice // *Autophagy*. – 2007. – Vol. 3. – №. 4. – P. 295-299.
8. Bejarano E. Chaperone-Mediated Autophagy / E. Bejarano, A.M. Cuervo // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2010 – Vol. 7. – №. 1. – P. 29-39.
9. Hurley J.H. Mechanisms of Autophagy Initiation / J.H. Hurley, L.N. Young // *Annu. Rev. Biochem.* – 2017. – Vol. 86. – P. 225-244.
10. Zhou Z. Phosphorylation regulates the binding of autophagy receptors to FIP200 Claw domain for selective autophagy initiation / Z. Zhou, J. Liu, T. Fu, et al. // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12. – №. 2. – P. 400-417.
11. Jewell J. L. Amino acid signalling upstream of mTOR / J. L. Jewell, R. C. Russell, K.-L Guan. // *Mol. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 14. – №. 3. – P. 133-139.
12. Wong P.-M. The ULK1 complex. Autophagy / P.-M. Wong, C. Puente, I. G. Ganley, et al. // *Nat. Rev.* – 2013. – Vol. 9. – №. 2. – P. 124-137.

13. Liu C.-C. Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination / C.-C. Liu, Y.-C. Lin, Y.-H. Chen, et al. // *Mol. Cell.* – 2016. – Vol. 61. – №. 1. – P. 84-97.
14. Yun, C. The Roles of Autophagy in Cancer / C. Yun, S. Lee // *Int. J. of Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19. – №. 11. – P. 254-269.
15. Yoshida G.J. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment / G.J. Yoshida // *J. Hematol. Oncol.* – 2017. Vol. 10. – №67. – P. 67.
16. Yun C.W. The Dual Role in Autophagy in Cancer Development and a Therapeutic Strategy for Cancer by Targeting Autophagy / C.W. Yun, J. Jeon, G. Go et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – №. 1. – P. 179.
17. Kimmelman, A. C. Autophagy and Tumor Metabolism / A. C. Kimmelman, E. White. // *Cell. Metab.* – 2017. – Vol. 25. – №. 5. P. – 1037-1043.
18. Zaarour R. F. Role of Hypoxia-Mediated Autophagy in Tumor Cell Death and Survival / R. F. Zaarour, B. Azakir, E. Y. Hajam et al. // *Cancers.* – 2017. – Vol. 13. – №. 3. – P. 521-533.
19. Noman M. Z. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression / M. Z. Noman, B. Janji, B. Kaminska et al. // *Cancer. Res.* – 2012. – Vol. 71. – №. 18. – P. 5976-5986.
20. Chaikuad A. Conservation of structure, function and inhibitor binding in UNC-51-like kinase 1 and 2 (ULK 1/2) / A. Chaikuad, S. E. Koschade, A. Stolz et al. // *Biochem. J.* – 2019. – Vol. 476. – №.5. – P. 875-887.
21. Demeter A. ULK1 and ULK2 are less redundant than previously thought: computational analysis uncovers distinct regulation and functions of these autophagy induction proteins / A. Demeter, M. C. Romero-Mulero, L. Csabai et al. // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – №. 1. – P. 10940.
22. Lazaruc M. B. Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors / M. B. Lazarus, C.J. Novotny, K.M. Shokat // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – Vol. 10. – №.1. – P. 257-261.

23. Wang B. Canonical and Noncanonical Functions of ULK/Atg1 / B. Wang, M. Kundu // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2017. – Vol. 45. – P. 47-54.
24. Liu L. A Review of ULK1-Mediated Autophagy in Drug Resistance of Cancer / L. Liu, L. Yan, N. Liao et al. // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12. – №.2. – P. 352.
25. Kiriya Y. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases / Y. Kiriya, H. Nochi. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – №. 11. – P. 26797-26812.
26. Liu J. Mitophagy in Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Treatment / J. Liu, W. Liu, R. Li et al. // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – №. 7. – P. 712.
27. Dias. R. Molecular Docking Algorithms / R. Dias, W. de A. Jr. // *Curr. Drug. Targets*. – 2008. – Vol. 9. – №. 12. – P. 1040-1047.
28. Mestres J. Ligand-based approach to *in silico* pharmacology: nuclear receptor profiling / J. Mestres, L. Martin-Couce, E. Gregori-Puigjane et al. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2006. – Vol. 46. – №. 6. – P. 2725.
29. Cramer R.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins / R.D. Cramer, D. E. Patterson, J. D. Bunce // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – №. 18. – P. 5959-5967.
30. Cerqueira N. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery / N. Cerqueira, D. Gestó, E. F. Oliveira et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2015. – Vol. 582. – P. 56-67.
31. Gilson M. K. calculation of protein-ligand binding affinities / M/ K/ Gilson, H-X Zhou // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2007. – Vol. 36. – P. 21-42.
32. Sousa S. F. Protein-ligand docking: current status and future challenges / S. F. Sousa, P. A. Fernandes, M. J. Ramos // *Proteins*. – 2006. – Vol. 65. – №. 1. – P. 15-26.

33. Kuntz L. D. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions / J. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley et al // J. Mol. Biol. – 1982. – Vol. 161. – №. 2. – P. 269-288.
34. Vakser I. A. Protein-protein docking: from interaction to interactome / I. A. Vakser // Biophys. J. – 2014. – Vol. 107. – №. 8. – P. 1785-1793.
35. Salmaso V. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview / V. Salmaso, S. Moro // Front. Pharmacol. – 2018. – Vol. 9. – №. 923. – P. 1-16.
36. Tripathi A. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock / A. Tripathi, V. A Bankaitis // J. Mol. Med. Clin. Appl. – 2017. – Vol. 2. – №. 1. – P. 1-19.
37. Li J. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking / J. Li, A. Fu, L. Zhang // Interdiscip. Sci.– 2019. – Vol. 11. – P. 320-328.
38. Meng X-Yu. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery / X-Yu Meng, H-Xing Zhang, M. Mezei et al. // Curr Comput. Aided. Drug. Des. – 2011. – Vol. 7. – №. 2. – P. 146-157.
39. Feher M. A Simple Knowledge-Based Scoring Function to Improve the Efficiency of Database Screening / M. Feher, E. Deretey, S. Roy // J. Chem. Comput. Sci. – 2003. – Vol. 43. – №. 4. – P. 1316-1327.
40. Genheden S. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities / S. Genheden, U. Ryde // Expert. Opin. Drug. Discov. – 2015. – Vol. 10. – №. 5. P. 449-461.
41. Friesner R. A. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy / R. A. Friesner, J. L. Blank, R. B. Murphy et al. // J. Med. Chem. – 2004. – Vol. 47. – №. 7. – P. 1739-1749.

42. Urich R. *De Novo* Design of Protein Kinase Inhibitors by *in Silico* Identification of Hinge Region-Binding Fragments / R. Urich, G. Wishart, M. Kiczun et al. // *ACS Chem. Biol.* – 2013. – Vol. 8. – №. 5. – P. 1044-1052

43. Dixon S. L. PHASE: A novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching / S. L. Dixon, A. M. Smondyrev, S. N. Rao // *J. Chem. Inf. Model.* – 2006. – Vol. 57. – №. 5. – P. 370-372.

44. Halgren T. A. Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability / T. A. Halgren // *J. Chem. Inf. Model.* – 2009. – Vol. 49. – №. 2. – P. 377-389.

45. Mu P. Discovery of human autophagy initiation kinase ULK1 inhibitors by multi-directional *in silico* screening strategies / P. Mu, R. Karuppasamy // *J. Recept. Signal Transduct. Res.* – 2019. – Vol. 39. – №. 2. – P. 122-133.

46. Wood S. D. *In Silico* HTS and Structure Based Optimization of Indazole-Derived ULK1 Inhibitors / S.D. Wood, W. Grant, I. Adrados et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 8. – №. 12. – P. 1258-1263.

47. Lazarus M. B. Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors / M. B Lazarus, C. J Novotny, K. M Shokat // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – Vol. 10. – №. 1. – P. 257-261.

48. Sun D. Discovery of 5-bromo-4-phenoxy-N-phenylpyrimidin-2-amine derivatives as novel ULK1 inhibitors that block autophagy and induce apoptosis in non-small cell lung cancer / D. Sun, Z. Yang, Y. Zhen et al. // *Eu.r J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 208 – P. 1-14.

49. Lazarus M. B. Discovery and structure of a new inhibitor scaffold of the autophagy initiating kinase ULK1 / M. B Lazarus, K. M Shokat // *Bioorg. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 23. – №. 17. – P. 5483-5488.

50. Ren H. Design, Synthesis, and Characterization of an Orally Active Dual-Specific ULK1/2 Autophagy Inhibitor that Synergizes with the PARP Inhibitor Olaparib for the Treatment of Triple-Negative Breast

Cancer / H. Ren, N. A Bakas, M. Vamos et al. // J. Med. Chem. – 2020. – Vol. 63. – №. 23. – P. 14609-14625.

51. ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/> (дата обращения 14.02.2023).

52. RCSB Protein Data Bank (PDB). URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения 9.02.2023).

53. Prime MM-GBSA. URL: <https://www.schrodinger.com/kb/1875> (дата обращения 15.02.2023).

54. Target Identification, Phenotypic Screening library (TIPS) - ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/catalog/sets/target-identification-phenotypic-screening-library-tips/> (дата обращения 3.04.2023).

55. Human Kinases Annotated Library – ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/catalog/sets/target-identification-phenotypic-screening-library-tips/> (дата обращения 3.04.2023).

56. Protein Kinases Inhibitors Library – ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/catalog/focused-and-targeted-libraries/protein-kinases-inhibitors-library/> (дата обращения 3.04.2023).

57. 3D-Pharmacophore Based Diversity Library – ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/catalog/diversity-libraries/3d-pharmacophore-based-diversity-library/> (дата обращения 3.04.2023).

58. Autophagy Targeted Library – ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/catalog/focused-and-targeted-libraries/autophagy-targeted-library/> (дата обращения 3.04.2023).

59. LigPrep 3.4 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015, P. 45.

60. QikProp 4.4 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015, P. 31

61. Lipinski C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A.



Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – V. 46, № 1-3 – P. 3-26.

62. Protein Preparation Guide Schrödinger Suite 2012 Update 2, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012, P. 26.

63. Glide 6.7 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015, P. 15.

64. Ro S.H. Distinct functions of Ulk1 and Ulk2 in the regulation of lipid metabolism in adipocytes / S.H Ro, C.H. Jung, W. S. Hahn et al. // *Autophagy* – 2013. – Vol. 9. – №. 12. – P. 2103-2114.

65. Martim K. R. A Potent and Selective ULK1 Inhibitor Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Nutrient Stress / K. R. Martin, S. L. Celano, A. R. Solitro et al. // *iScience*. – 2018. – Vol. 26. – №. 8. – P. 74-84.

66. Nicolaou C.A. Idea2Data: Toward a New Paradigm for Drug Discovery / C.A. Nicolaou, C. Humblet, H. Hu et al. // *ACS Med. Chem.* – 2019. – Vol. 10. – №. 3. – P. 278-286.

67. Chaikuad A. Conservation of structure, function and inhibitor binding in UNC-51-like kinase 1 and 2 (ULK1/2) / A. Chaikuad, S. E. Koschade, A. Stolz et al. // *Biochem. J.* – 2019. – Vol. 476. – №. 5. – P. 875-887.

68. Ren H. Design, Synthesis, and Characterization of an Orally Active DualSpecific ULK1/2 Autophagy Inhibitor that Synergizes with the PARP Inhibitor Olaparib for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer / H. Ren, N. A. Bakas, M. Vamos et al. // *J. Med. Chem.* – 2020. – Vol. 63. – №. 23. – P. 14609-14625.

69. Murphy R. B. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening / R.B. Murphy // *J. Med. Chem.* – 2004. – №. 47. – P. 1750-1759.

70. Friesner R. A. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes / R. A. Friesner, R.

B. Mirphy, M. P. Repasky et al. // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49. – №. 21. – P. 6177-6196.

71. Jacobson M. P. On the Role of Crystal Packing Forces in Determining Protein Sidechain Conformations / M. P. Jacobson, R. A. Friesner, Z. Xiang et al. // J. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 320. – №. 3. – P. 597-608.

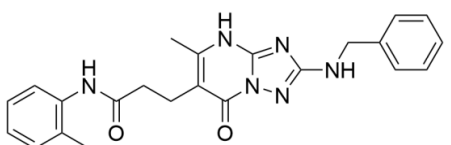
72. Shelley J. C. Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules / Epik: a software program for pKa prediction and protonation state generation for drug-like molecules // J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye et al. // J. Comput. Aided. Mol. Des. – 2007. – Vol. 21. – №. 12. – P. 681-691.

73. Sastry G. M. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments / G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day et al. // J. Comput. Aided. Mol. Des. – 2013. – Vol. 27. – №. 3. – P. 221-234.

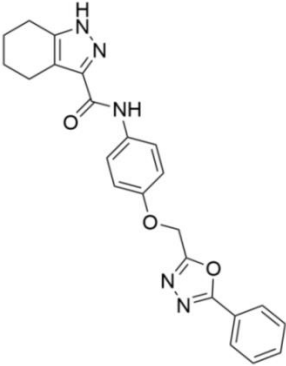
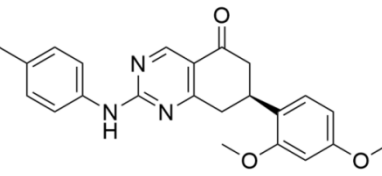
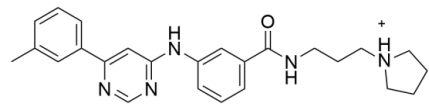
## Приложение А

### Результаты виртуального скрининга

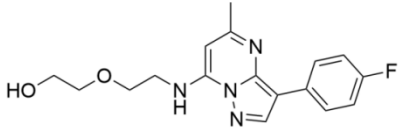
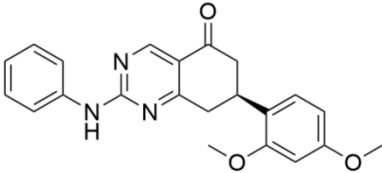
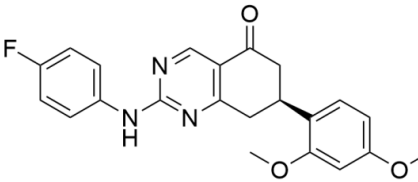
Таблица А.1 – Результаты виртуального скрининга (PDB ID: 4WNP)

| Код соединения | Индекс кластера | Структура  | XP Gscore, ккал/моль | MMGBSA $\Delta G$ Bind, ккал/моль | Дескрипторы XP, ккал/моль |           |             |          |             |                  |                 |            |            |               |
|----------------|-----------------|--|----------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------|-------------|----------|-------------|------------------|-----------------|------------|------------|---------------|
|                |                 |  |                      |                                   | XP HBond                  | XP PhobEn | XP PhobEnHB | XP LowMW | XP RotPenal | XP LipophilicEvW | XP PhobEnPairHB | XP Electro | XP Sitemap | XP ExposPenal |
| 1              | 2               | 3  | 4                    | 5                                 | 6                         | 7         | 8           | 9        | 10          | 11               | 12              | 13         | 14         | 15            |
| D481-0041      | ∞               |  | -9.753               | -51.37                            | -1.943                    | -0.125    | 0.000       | -0.112   | 0.273       | -4.177           | -2.600          | -0.832     | -0.637     | 0.398         |

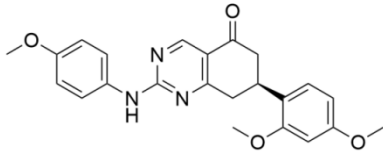
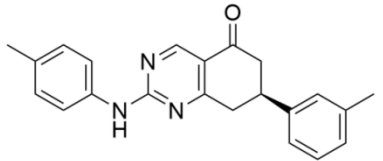
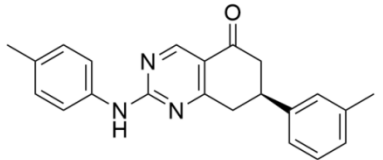
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3   | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|---|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Y020-1398 | 6  |    | -9.293 | -58.76 | -1.636 | -0.440 | 0.000 | -0.115 | 0.240 | -4.696 | -1.950 | -0.596 | -0.329 | 0.229 |
| D367-0350 | 1  |    | -9.241 | -44.96 | -1.304 | -0.373 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -4.459 | -2.052 | -0.451 | -0.739 | 0.224 |
| F725-0015 | 12 |  | -9.167 | -44.73 | -2.298 | -0.314 | 0.000 | -0.112 | 0.273 | -3.721 | -2.190 | -1.014 | -0.400 | 0.609 |

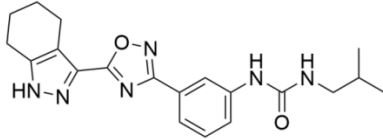
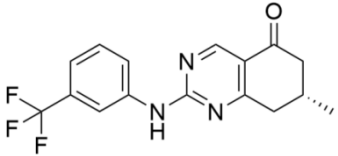
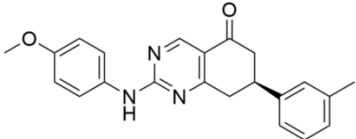
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D463-0114 | 6 |   | -9.145 | -44.07 | -1.712 | -0.677 | -1.500 | -0.399 | 0.517 | -4.549 | 0.000  | -0.576 | -0.469 | 0.219 |
| D367-0056 | 1 |   | -9.027 | -44.06 | -1.297 | -0.373 | 0.000  | -0.249 | 0.124 | -4.453 | -2.058 | -0.447 | -0.739 | 0.465 |
| D367-0434 | 1 |  | -8.996 | -44.54 | -1.336 | -0.422 | 0.000  | -0.189 | 0.114 | -4.217 | -2.030 | -0.375 | -0.729 | 0.188 |

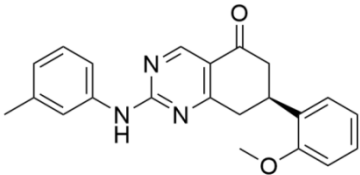
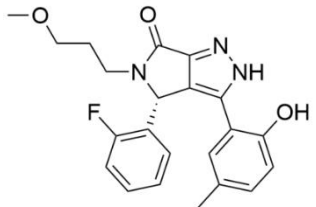
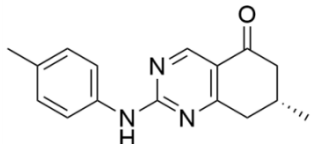
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0277 | 1 |   | -8.996 | -54.51 | -1.187 | -0.400 | 0.000 | -0.149 | 0.108 | -4.512 | -2.051 | -0.530 | -0.729 | 0.454 |
| D367-0248 | 1 |   | -8.992 | -52.93 | -1.176 | -0.400 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -4.268 | -2.045 | -0.517 | -0.728 | 0.228 |
| D367-0158 | 1 |  | -8.838 | -52.58 | -1.186 | -0.350 | 0.000 | -0.355 | 0.145 | -4.133 | -2.063 | -0.457 | -0.725 | 0.286 |

Продолжение таблицы А.1

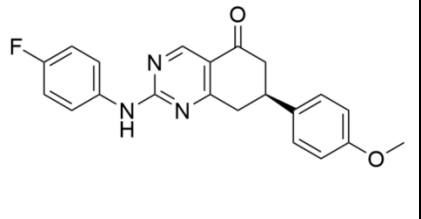
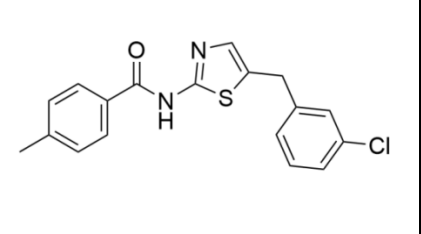
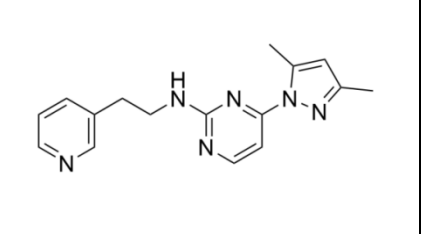
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0386 | 9 |   | -8.777 | -55.77 | -2.089 | -0.494 | 0.000 | -0.232 | 0.241 | -3.876 | -1.950 | -0.708 | -0.252 | 0.585 |
| M350-0197 | 1 |   | -8.746 | -44.82 | -1.271 | -0.467 | 0.000 | -0.429 | 0.109 | -3.783 | -2.140 | -0.464 | -0.736 | 0.444 |
| D367-0183 | 1 |  | -8.614 | -46.85 | -1.188 | -0.425 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.817 | -2.075 | -0.459 | -0.745 | 0.264 |

Продолжение таблицы А.1

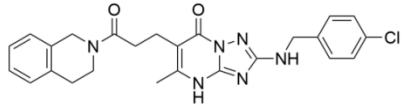
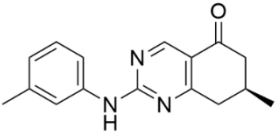
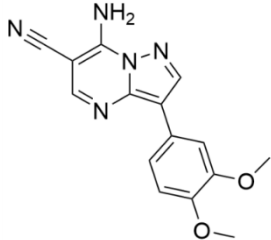
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0335 | 1 |   | -8.529 | -51.53 | -1.230 | -0.456 | 0.000  | -0.302 | 0.134 | -4.248 | -2.010 | -0.521 | -0.719 | 0.825 |
| D367-0328 | 6 |   | -8.485 | -48.81 | -1.545 | -0.125 | -1.500 | -0.182 | 0.268 | -4.404 | 0.000  | -0.768 | -0.431 | 0.202 |
| D367-0236 | 1 |  | -8.414 | -44.84 | -1.225 | -0.575 | 0.000  | -0.500 | 0.150 | -3.678 | -2.080 | -0.472 | -0.758 | 0.724 |



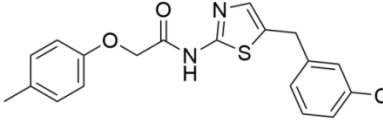
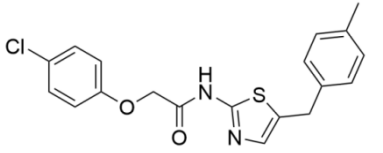
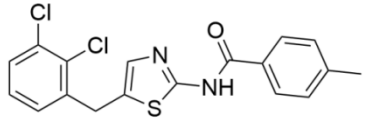
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0436 | 1  |   | -8.388 | -51.14 | -1.194 | -0.400 | 0.000 | -0.289 | 0.131 | -4.052 | -2.102 | -0.391 | -0.719 | 0.627 |
| D367-0322 | 2  |   | -8.366 | -56.54 | -0.834 | -0.522 | 0.000 | -0.357 | 0.242 | -4.430 | -2.137 | -0.247 | -0.302 | 0.220 |
| Y020-1462 | 14 |  | -8.361 | -46.43 | -1.596 | 0.000  | 0.000 | -0.500 | 0.253 | -3.070 | -2.195 | -0.655 | -0.599 | 0.000 |

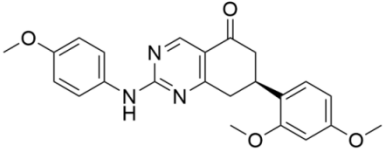
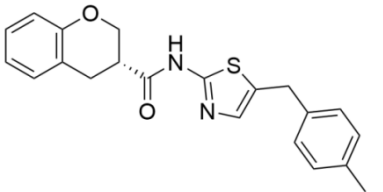
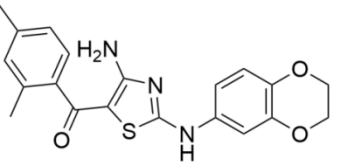
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| F538-1697 | 6 |   | -8.301 | -54.96 | -0.822 | -0.125 | -1.500 | 0.000  | 0.160 | -3.566 | -1.164 | -0.736 | -0.674 | 0.126 |
| P592-0478 | 1 |   | -8.220 | -45.13 | -1.220 | -0.425 | 0.000  | -0.500 | 0.150 | -3.552 | -2.075 | -0.485 | -0.744 | 0.631 |
| 3966-3951 | 6 |  | -8.183 | -44.12 | -1.103 | -0.186 | 0.000  | -0.500 | 0.063 | -3.475 | -2.160 | -0.349 | -0.536 | 0.063 |

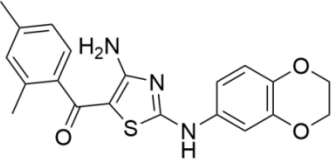
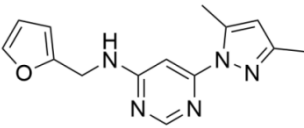
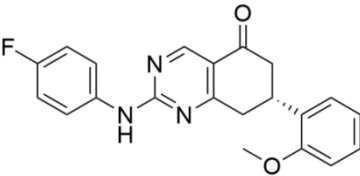
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Y020-1399 | 2 |   | -8.181 | -54.21 | -1.181 | -0.819 | 0.000 | -0.257 | 0.292 | -3.924 | -2.156 | -0.476 | -0.281 | 0.622 |
| 7997-0024 | 2 |   | -8.169 | -53.14 | -1.329 | -0.514 | 0.000 | -0.257 | 0.250 | -4.025 | -2.135 | -0.521 | -0.283 | 0.645 |
| 4264-1935 | 2 |  | -8.169 | -49.41 | -1.323 | -0.469 | 0.000 | -0.242 | 0.204 | -4.042 | -2.068 | -0.521 | -0.278 | 0.571 |

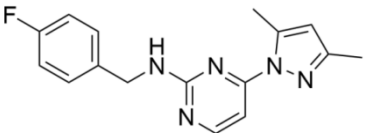
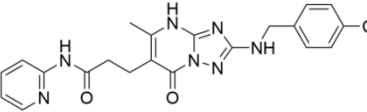
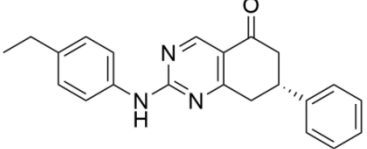
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 2389-2207 | 1  |   | -8.150 | -46.62 | -1.184 | -0.400 | -1.500 | -0.149 | 0.154 | -4.167 | 0.000  | -0.401 | -0.709 | 0.207 |
| 2389-2102 | 6  |   | -8.142 | -46.11 | -0.887 | -0.517 | 0.000  | -0.285 | 0.217 | -4.346 | -2.172 | -0.251 | -0.303 | 0.402 |
| D367-0246 | 13 |  | -8.126 | -42.36 | -1.330 | 0.000  | 0.000  | -0.229 | 0.229 | -3.715 | -2.600 | -0.606 | -0.242 | 0.367 |

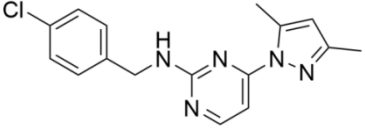
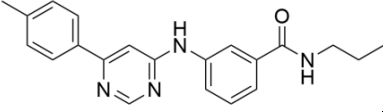
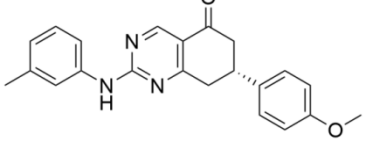
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0246 | 13 |   | -8.126 | -42.36 | -1.330 | 0.000  | 0.000 | -0.229 | 0.229 | -3.715 | -2.600 | -0.606 | -0.242 | 0.367 |
| 8582-1676 | 14 |   | -8.078 | -41.39 | -1.325 | 0.000  | 0.000 | -0.500 | 0.296 | -3.175 | -2.190 | -0.491 | -0.691 | 0.000 |
| F091-0880 | 1  |  | -8.048 | -46.47 | -1.102 | -0.446 | 0.000 | -0.289 | 0.131 | -3.795 | -1.821 | -0.409 | -0.756 | 0.438 |

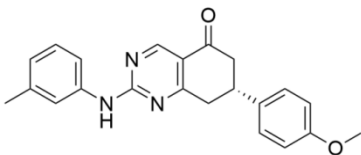
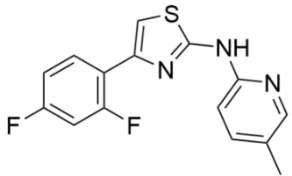
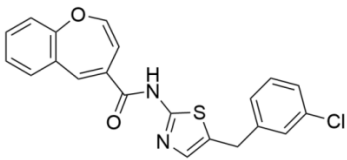
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0275 | 14 |   | -8.039 | -40.37 | -1.144 | -0.147 | 0.000 | -0.500 | 0.249 | -3.627 | -2.153 | -0.356 | -0.632 | 0.270 |
| 8211-0179 | 8  |   | -8.008 | -50.83 | -1.496 | -0.170 | 0.000 | -0.040 | 0.218 | -4.031 | -1.950 | -0.779 | -0.673 | 0.912 |
| P774-4295 | 1  |  | -8.045 | -44.66 | -1.058 | -0.424 | 0.000 | -0.355 | 0.145 | -3.645 | -2.113 | -0.516 | -0.743 | 0.663 |

Продолжение таблицы А.1

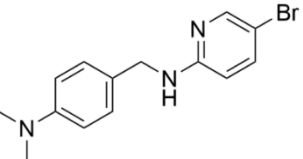
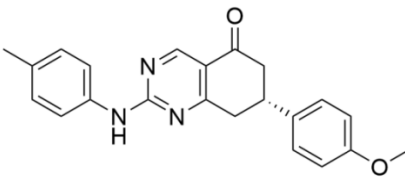
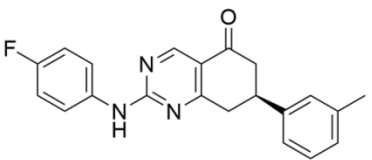
| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P592-0447 | 14 |   | -8.000 | -43.84 | -1.285 | 0.000  | 0.000  | -0.454 | 0.226 | -3.590 | -2.165 | -0.416 | -0.649 | 0.333 |
| D126-0182 | 12 |   | -7.994 | -45.28 | -2.221 | -0.259 | -1.500 | -0.018 | 0.390 | -4.163 | 0.000  | -0.751 | -0.400 | 0.927 |
| P592-0452 | 1  |  | -7.994 | -48.62 | -1.002 | -0.400 | 0.000  | -0.302 | 0.134 | -3.957 | -1.479 | -0.409 | -0.722 | 0.142 |

Продолжение таблицы А.1

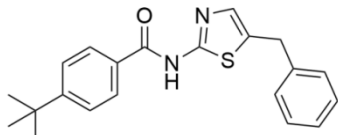
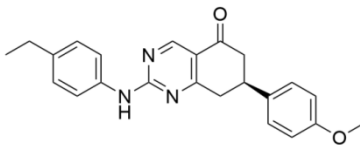
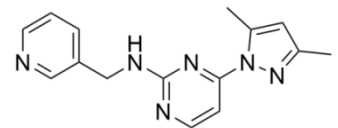
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P592-0452 | 1 |   | -7.994 | -48.62 | -1.002 | -0.400 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.957 | -1.479 | -0.409 | -0.722 | 0.142 |
| F725-0720 | 2 |   | -7.952 | -45.53 | -1.309 | -0.500 | 0.000 | -0.489 | 0.180 | -3.256 | -2.156 | -0.606 | 0.000  | 0.183 |
| D367-0427 | 2 |  | -7.928 | -54.73 | -0.630 | -0.691 | 0.000 | -0.184 | 0.188 | -4.112 | -2.132 | -0.474 | -0.286 | 0.394 |



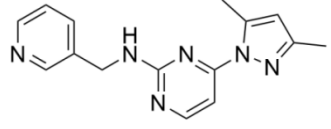
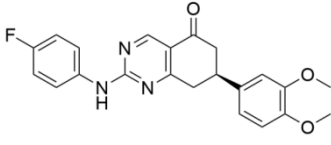
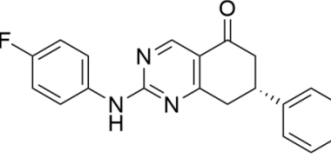
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D481-0066 | 10 |   | -7.919 | -39.47 | -1.057 | -0.150 | 0.000 | -0.479 | 0.177 | -3.852 | -2.228 | -0.330 | 0.000  | 0.000 |
| M008-0168 | 1  |   | -7.917 | -48.87 | -0.987 | -0.400 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.886 | -1.576 | -0.491 | -0.727 | 0.318 |
| D367-0152 | 1  |  | -7.871 | -46.17 | -1.055 | -0.425 | 0.000 | -0.342 | 0.142 | -3.818 | -2.089 | -0.417 | -0.719 | 0.852 |

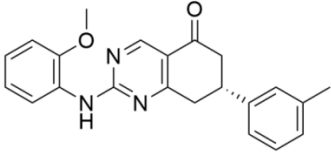
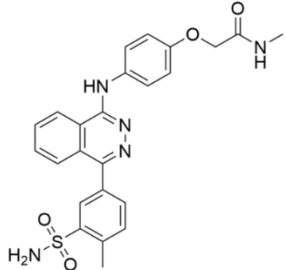
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D443-0073 | 2  |   | -7.702 | -55.34 | -0.400 | -0.393 | 0.000 | -0.332 | 0.233 | -4.406 | -2.239 | -0.288 | -0.309 | 0.432 |
| 6383-0877 | 1  |   | -7.682 | -47.64 | -1.162 | -0.400 | 0.000 | -0.255 | 0.125 | -3.873 | -2.119 | -0.565 | -0.747 | 0.316 |
| D367-0269 | 14 |  | -7.668 | -38.84 | -1.080 | -0.219 | 0.000 | -0.500 | 0.276 | -3.257 | -2.195 | -0.335 | -0.588 | 0.230 |

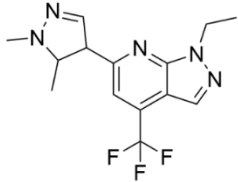
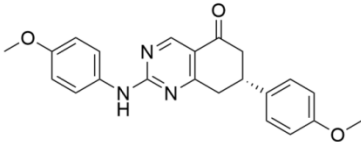
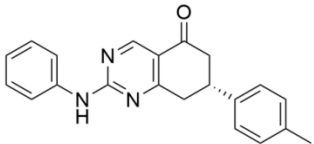
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0269 | 14 |   | -7.668 | -38.84 | -1.080 | -0.219 | 0.000 | -0.500 | 0.276 | -3.257 | -2.195 | -0.335 | -0.588 | 0.230 |
| 2381-0931 | 1  |   | -7.630 | -54.39 | -1.135 | -0.325 | 0.000 | -0.189 | 0.114 | -4.402 | -2.041 | -0.503 | -0.699 | 0.551 |
| 8341-0092 | 1  |  | -7.594 | -49.02 | -1.219 | -0.493 | 0.000 | -0.342 | 0.142 | -3.589 | -2.141 | -0.410 | -0.749 | 0.208 |

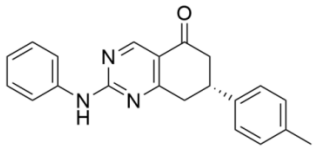
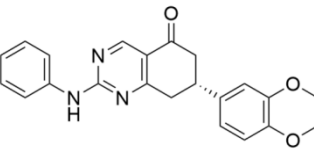
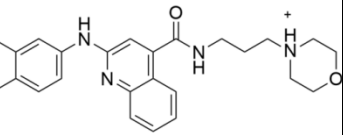
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3   | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|---|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P592-0475 | 1 |  | -7.534 | -47.46 | -0.978 | -0.450 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.642 | -2.006 | -0.366 | -0.723 | 0.799 |
| D367-0279 | 4 |  | -7.408 | -56.38 | -1.563 | -0.475 | 0.000 | 0.000  | 0.228 | -4.747 | 0.000  | -0.957 | 0.000  | 0.105 |

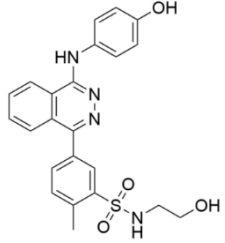
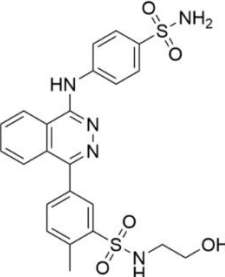
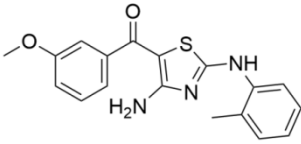
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 8211-0186 | 14 |   | -7.403 | -39.04 | -0.700 | -0.438 | -1.500 | -0.469 | 0.083 | -2.918 | 0.000  | -0.294 | -1.244 | 0.077 |
| Y020-2784 | 1  |   | -7.338 | -44.63 | -0.914 | -0.450 | 0.000  | -0.249 | 0.124 | -3.580 | -1.593 | -0.286 | -0.730 | 0.341 |
| Y504-8080 | 1  |  | -7.255 | -48.17 | -1.079 | -0.375 | 0.000  | -0.402 | 0.156 | -3.731 | -2.077 | -0.395 | -0.747 | 0.395 |

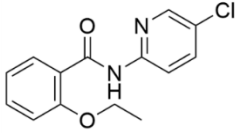
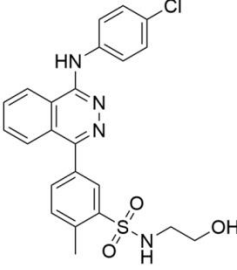
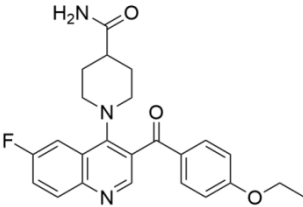
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Y504-8080 | 1  |   | -7.255 | -48.17 | -1.079 | -0.375 | 0.000 | -0.402 | 0.156 | -3.731 | -2.077 | -0.395 | -0.747 | 0.395 |
| 4109-2010 | 1  |   | -7.006 | -44.76 | -0.807 | -0.450 | 0.000 | -0.249 | 0.124 | -4.206 | -1.774 | -0.286 | -0.747 | 0.389 |
| 8211-0170 | 11 |  | -6.987 | -43.49 | -1.578 | -0.726 | 0.000 | -0.102 | 0.337 | -4.367 | 0.000  | -0.938 | -0.182 | 0.567 |

Продолжение таблицы А.1

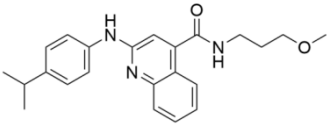
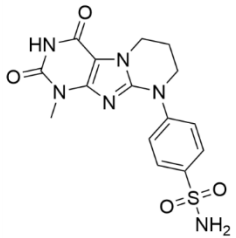
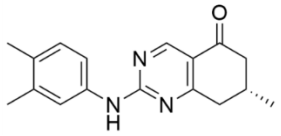
| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0033 | 4  |   | -6.926 | -51.08 | -1.168 | -0.475 | 0.000 | 0.000  | 0.296 | -4.812 | 0.000  | -0.795 | 0.000  | 0.028 |
| D481-0098 | 4  |   | -6.867 | -45.07 | -1.118 | -0.450 | 0.000 | 0.000  | 0.233 | -4.850 | 0.000  | -0.834 | 0.000  | 0.153 |
| D367-0054 | 13 |  | -6.858 | -44.52 | -1.190 | 0.000  | 0.000 | -0.369 | 0.197 | -3.839 | -1.300 | -0.496 | -0.277 | 0.414 |

Продолжение таблицы А.1

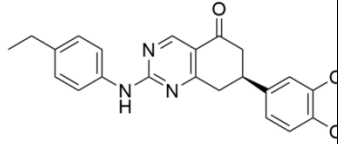
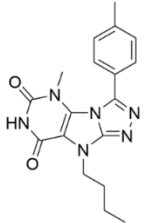
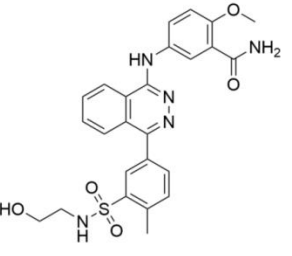
| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 4109-1933 | 10 |   | -6.840 | -39.42 | -1.217 | -0.575 | -1.500 | -0.500 | 0.403 | -3.338 | 0.000  | -0.363 | -0.264 | 0.514 |
| 4109-1944 | 4  |   | -6.499 | -40.42 | -0.923 | -0.425 | 0.000  | 0.000  | 0.275 | -4.696 | 0.000  | -0.730 | 0.000  | 0.000 |
| F091-0100 | 11 |  | -6.482 | -50.87 | -1.449 | 0.000  | 0.000  | -0.459 | 0.171 | -3.022 | -1.950 | -0.758 | -0.779 | 0.263 |



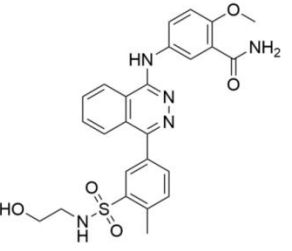
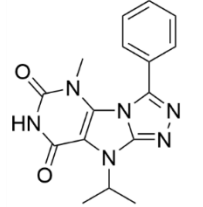
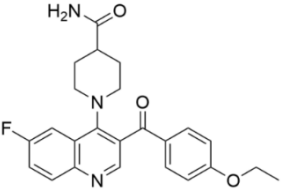
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Y030-3507 | 11 |   | -6.397 | -45.25 | -1.235 | -0.700 | 0.000 | -0.242 | 0.408 | -4.272 | 0.000  | -0.441 | -0.168 | 0.253 |
| K788-4490 | 7  |   | -6.036 | -41.72 | -1.575 | -0.175 | 0.000 | -0.245 | 0.041 | -2.312 | -1.950 | -0.705 | -0.734 | 0.119 |
| 4109-1941 | 1  |  | -5.987 | -46.83 | -1.262 | -0.550 | 0.000 | -0.500 | 0.137 | -3.767 | -2.081 | -0.501 | -0.756 | 0.533 |

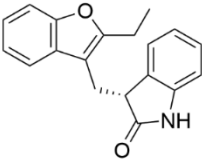
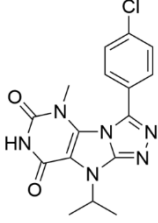
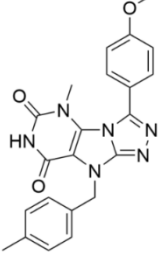
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| S606-0855 | 1 |   | -5.881 | -55.20 | 0.000  | -0.400 | 0.000 | -0.155 | 0.109 | -2.064 | -2.064 | -0.550 | -0.731 | 0.272 |
| C387-1583 | 7 |   | -5.792 | -48.28 | -0.835 | 0.000  | 0.000 | -0.325 | 0.138 | -3.449 | -1.950 | -0.281 | -0.800 | 0.210 |
| 8578-0231 | 4 |  | -5.617 | -58.65 | -1.575 | 0.000  | 0.000 | 0.000  | 0.238 | -3.587 | 0.000  | -0.984 | -0.055 | 0.346 |

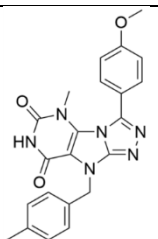
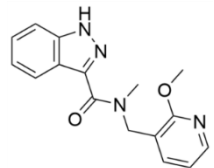
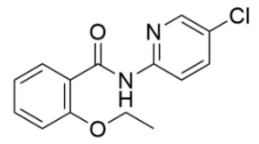
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 8578-0231 | 4  |   | -5.617 | -58.65 | -1.575 | 0.000  | 0.000  | 0.000  | 0.238 | -3.587 | 0.000  | -0.984 | -0.055 | 0.346 |
| F722-0074 | 5  |   | -5.605 | -42.41 | -1.153 | 0.000  | 0.000  | -0.419 | 0.053 | -2.780 | -1.950 | -0.335 | -0.762 | 0.241 |
| 4109-2097 | 11 |  | -5.601 | -37.16 | -0.263 | -0.671 | -1.500 | -0.095 | 0.191 | -3.979 | 0.000  | -0.483 | -0.448 | 0.647 |

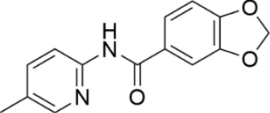
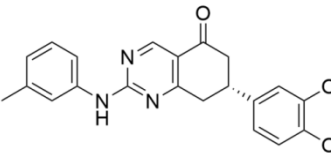
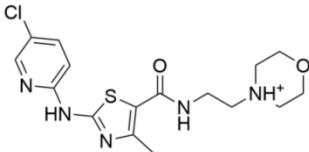
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| C768-0885 | 6 |   | -4.682 | -44.95 | -1.330 | -0.318 | 0.000  | -0.500 | 0.129 | -4.136 | -1.950 | -0.379 | -0.400 | 0.177 |
| F722-0047 | 5 |   | -4.546 | -48.46 | -0.846 | -0.376 | -1.000 | -0.304 | 0.064 | -2.815 | 0.000  | -0.219 | -0.706 | 0.156 |
| D330-0151 | 5 |  | -4.428 | -40.53 | -1.018 | -0.154 | 0.000  | -0.112 | 0.103 | -2.684 | -1.950 | -0.223 | -0.725 | 0.835 |

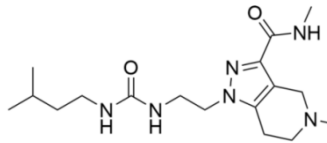
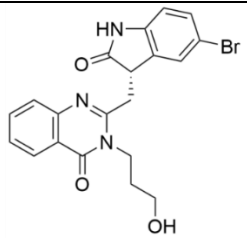
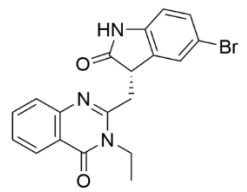
Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D330-0151 | 5  |   | -4.428 | -40.53 | -1.018 | -0.154 | 0.000  | -0.112 | 0.103 | -2.684 | -1.950 | -0.223 | -0.725 | 0.835 |
| F722-0061 | 6  |   | -4.349 | -36.03 | -0.715 | -0.125 | -0.111 | -0.500 | 0.268 | -3.754 | 0.000  | -0.597 | -0.316 | 0.000 |
| F722-0236 | 10 |  | -4.202 | -42.53 | -0.355 | -0.502 | 0.000  | -0.500 | 0.304 | -3.920 | 0.000  | -0.028 | -0.400 | 0.198 |

Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| S055-1353 | 6  |   | -3.981 | -36.94 | -0.405 | -0.747 | 0.000 | -0.500 | 0.345 | -3.541 | 0.000  | -0.019 | -0.578 | 0.464 |
| Y030-3500 | 1  |   | -3.933 | -50.42 | -0.601 | -0.500 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -4.084 | -1.864 | -0.413 | -0.706 | 0.322 |
| Y030-3487 | 13 |  | -3.878 | -48.04 | -0.018 | 0.000  | 0.000 | -0.224 | 0.341 | -3.369 | 0.000  | -0.596 | -0.158 | 0.146 |

Продолжение таблицы А.1

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12    | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| D367-0429 | 6 |   | -3.334 | -30.32 | -0.822 | 0.000  | -1.000 | -0.238 | 0.464 | -3.622 | 0.000 | -0.199 | -0.523 | 0.245 |
| SD30-0092 | 1 |   | -3.012 | -38.69 | -1.330 | -0.621 | -1.000 | -0.072 | 0.232 | -4.205 | 0.000 | -0.439 | -0.143 | 0.507 |
| D385-0472 | 3 |  | -2.578 | -44.08 | -0.744 | -0.362 | 0.000  | -0.172 | 0.106 | -3.644 | 0.000 | -0.278 | -0.571 | 0.000 |

Продолжение таблицы А.1

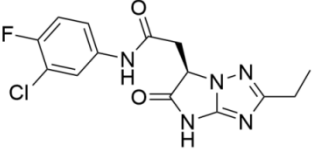
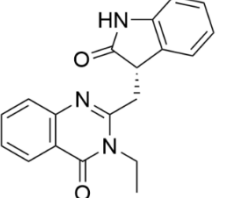
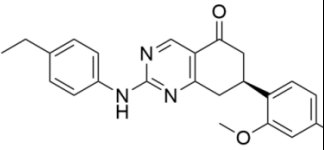
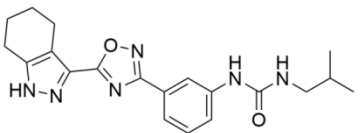
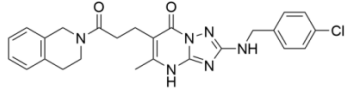
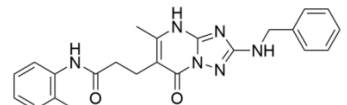
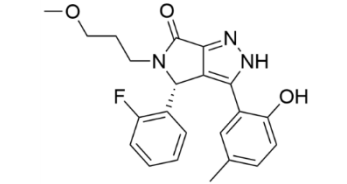
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| M008-3495 | 6 |   | -2.531 | -39.94 | -1.330 | 0.000  | -1.000 | -0.374 | 0.149 | -2.119 | -1.950 | -0.617 | -1.259 | 0.624 |
| D163-0946 | 3 |   | -2.029 | -46.99 | -0.700 | -0.381 | 0.000  | -0.435 | 0.157 | -3.582 | 0.000  | -0.317 | -0.554 | 0.710 |
| D718-1652 | 1 |  | -0.018 | -52.68 | 0.000  | -0.428 | 0.000  | -0.155 | 0.109 | -4.263 | -2.040 | -0.464 | -3.981 | 0.314 |



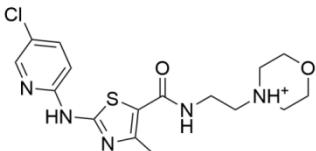
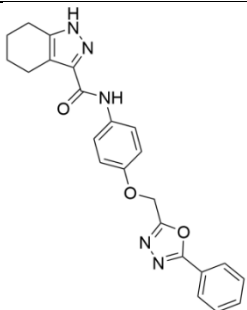
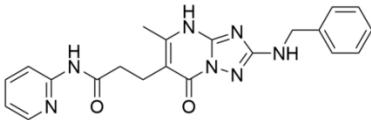
Таблица А.2 – Результаты виртуального скрининга (PDB ID: 6YID)

| Код соединения | Индекс кластера | Структура   | XP Gscore, ккал/моль | MMGBSA $\Delta G$ Bind, ккал/моль | Дескрипторы XP, ккал/моль |           |             |          |             |                  |                 |            |            |               |
|----------------|-----------------|---|----------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------|-------------|----------|-------------|------------------|-----------------|------------|------------|---------------|
|                |                 |   |                      |                                   | XP HBond                  | XP PhobEn | XP PhobEnHB | XP LowMW | XP RotPenal | XP LipophilicEvW | XP PhobEnPairHB | XP Electro | XP Sitemap | XP ExposPenal |
| 1              | 2               | 3   | 4                    | 5                                 | 6                         | 7         | 8           | 9        | 10          | 11               | 12              | 13         | 14         | 15            |
| F538-1697      | 9               |  | -9.031               | -56.24                            | -2.772                    | -0.405    | 0.000       | -0.232   | 0.241       | -3.590           | -1.950          | -0.785     | -0.174     | 0.404         |

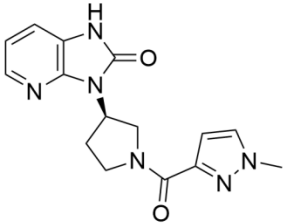
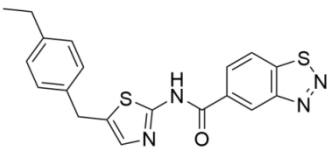
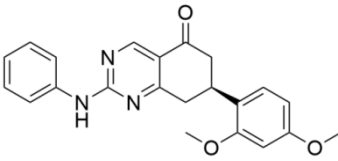
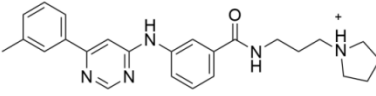
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7     | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D481-0066 | 6 |   | -8.906 | -39.88 | -1.929 | 0.000 | 0.000  | 0.000  | 0.160 | -3.330 | -2.600 | -0.958 | -0.703 | 0.288 |
| D481-0040 | 8 |   | -8.846 | -42.68 | -1.736 | 0.000 | -1.500 | -0.112 | 0.273 | -3.077 | -1.950 | -0.770 | -0.684 | 0.700 |
| D126-0182 | 6 |  | -8.651 | -46.78 | -1.654 | 0.000 | 0.000  | -0.182 | 0.188 | -4.089 | -1.950 | -0.635 | -0.328 | 0.000 |

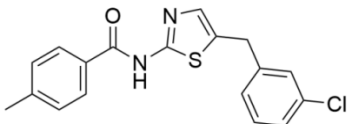
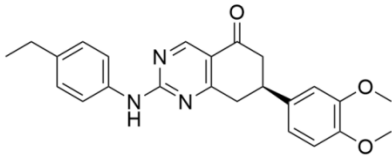
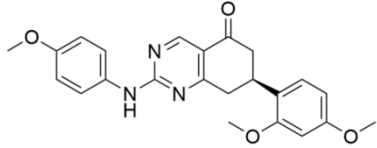
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3   | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|---|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| M008-3495 | 13 |    | -8.549 | -43.90 | -1.793 | -0.568 | 0.000 | -0.224 | 0.239 | -3.304 | -2.214 | -0.838 | 0.000  | 0.653 |
| M350-0197 | 6  |    | -8.538 | -56.20 | -1.493 | -0.267 | 0.000 | -0.115 | 0.240 | -4.336 | -1.950 | -0.530 | -0.274 | 0.156 |
| D481-0098 | ∞  |  | -8.516 | -40.80 | -1.995 | 0.000  | 0.000 | -0.040 | 0.218 | -3.148 | -2.600 | -0.753 | -0.701 | 0.501 |

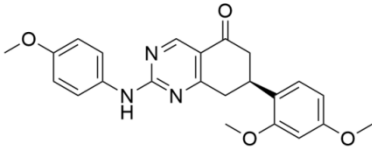
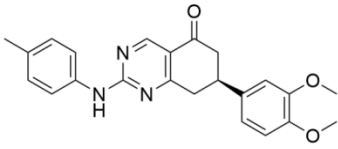
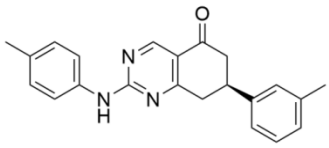
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3   | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| S606-0855 | 6  |    | -8.501 | -46.34 | -1.565 | -0.295 | -2.500 | -0.459 | 0.245 | -2.699 | 0.000  | -0.801 | -0.559 | 0.111 |
| 8582-1709 | 2  |    | -8.369 | -54.02 | -1.330 | -0.510 | 0.000  | -0.232 | 0.201 | -3.623 | -2.172 | -0.572 | -0.234 | 0.035 |
| D367-0056 | 1  |   | -8.276 | -50.74 | -1.562 | -0.480 | 0.000  | -0.249 | 0.124 | -3.091 | -2.058 | -0.475 | -0.637 | 0.124 |
| F725-0015 | 12 |  | -8.276 | -42.23 | -2.444 | -0.225 | 0.000  | -0.112 | 0.273 | -2.946 | -2.152 | -0.973 | -0.294 | 0.596 |

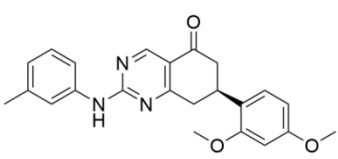
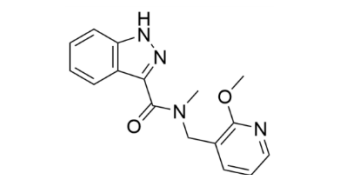
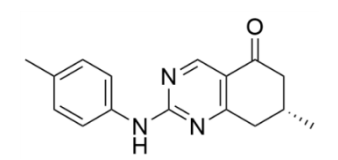
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 2389-2848 | 2 |   | -8.254 | -55.56 | -1.330 | -0.550 | 0.000 | -0.357 | 0.242 | -3.606 | -2.125 | -0.651 | -0.213 | 0.314 |
| D367-0350 | 1 |   | -8.221 | -39.31 | -1.308 | -0.475 | 0.000 | -0.155 | 0.109 | -3.184 | -2.142 | -0.546 | -0.686 | 0.166 |
| D367-0246 | 1 |  | -8.217 | -48.90 | -1.663 | -0.464 | 0.000 | -0.149 | 0.108 | -2.923 | -2.074 | -0.519 | -0.632 | 0.098 |

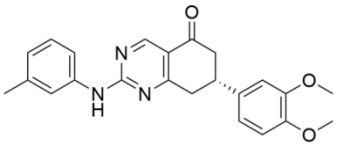
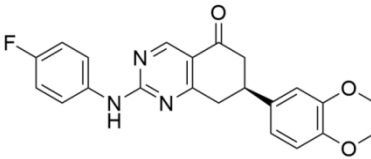
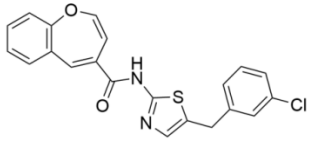
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0246 | 1 |   | -8.217 | -48.90 | -1.663 | -0.464 | 0.000 | -0.149 | 0.108 | -2.923 | -2.074 | -0.519 | -0.632 | 0.098 |
| D367-0158 | 1 |   | -8.217 | -40.65 | -1.315 | -0.483 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -3.146 | -2.064 | -0.554 | -0.638 | 0.069 |
| D367-0183 | 1 |  | -8.202 | -44.38 | -1.330 | -0.500 | 0.000 | -0.355 | 0.145 | -3.119 | -2.090 | -0.473 | -0.650 | 0.171 |

Продолжение таблицы А.2

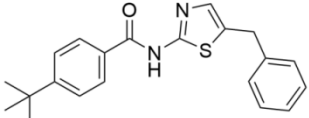
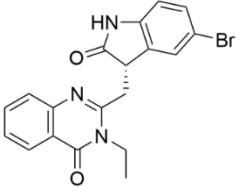
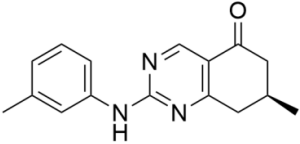
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0434 | 1 |   | -8.201 | -44.76 | -1.253 | -0.486 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -3.178 | -2.045 | -0.604 | -0.620 | 0.071 |
| S055-1353 | 6 |   | -8.178 | -31.69 | -1.330 | -0.375 | 0.000 | -0.500 | 0.188 | -3.470 | -1.950 | -0.476 | -0.331 | 0.062 |
| D367-0322 | 1 |  | -8.171 | -38.00 | -1.248 | -0.507 | 0.000 | -0.500 | 0.150 | -2.916 | -2.127 | -0.351 | -0.673 | 0.000 |

Продолжение таблицы А.2

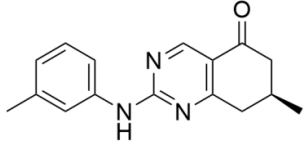
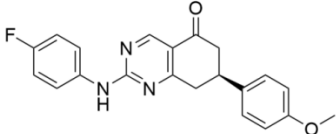
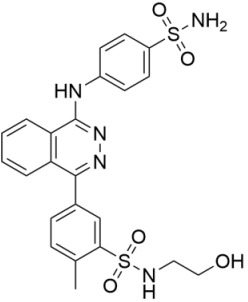
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0429 | 1 |   | -8.168 | -36.61 | -1.330 | -0.474 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -3.123 | -2.114 | -0.569 | -0.666 | 0.194 |
| D367-0279 | 1 |   | -8.153 | -37.66 | -1.285 | -0.475 | 0.000 | -0.189 | 0.114 | -3.181 | -2.147 | -0.436 | -0.688 | 0.135 |
| D443-0073 | 2 |  | -8.137 | -48.62 | -1.254 | -0.576 | 0.000 | -0.184 | 0.188 | -3.674 | -2.173 | -0.567 | -0.217 | 0.319 |



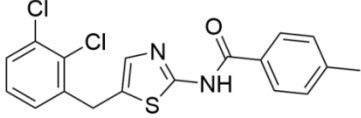
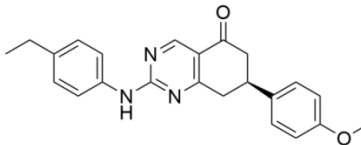
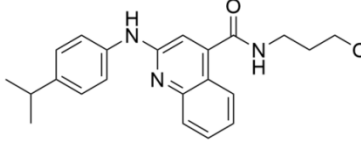
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 2381-0931 | 2 |   | -8.136 | -53.56 | -1.286 | -0.425 | 0.000 | -0.332 | 0.233 | -3.420 | -2.169 | -0.538 | -0.230 | 0.028 |
| D163-0946 | 3 |   | -8.100 | -40.23 | -1.264 | -0.250 | 0.000 | -0.172 | 0.074 | -3.667 | -1.950 | -0.231 | -0.639 | 0.000 |
| Y020-1399 | 1 |  | -8.086 | -39.13 | -1.311 | -0.509 | 0.000 | -0.500 | 0.150 | -2.850 | -2.122 | -0.382 | -0.671 | 0.109 |

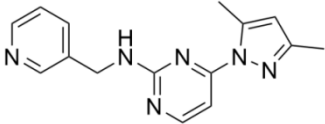
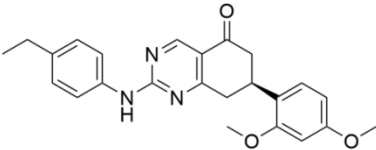
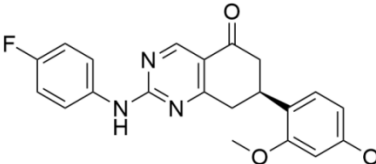
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Y020-1399 | 1 |   | -8.086 | -39.13 | -1.311 | -0.509 | 0.000  | -0.500 | 0.150 | -2.850 | -2.122 | -0.382 | -0.671 | 0.109 |
| Y020-1462 | 1 |   | -8.072 | -41.39 | -1.330 | -0.500 | 0.000  | -0.289 | 0.131 | -3.120 | -2.083 | -0.381 | -0.652 | 0.151 |
| 4109-1944 | 4 |  | -8.069 | -49.20 | -1.330 | -0.400 | -1.500 | 0.000  | 0.233 | -4.310 | 0.000  | -0.904 | 0.000  | 0.000 |

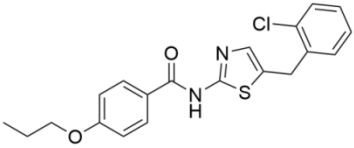
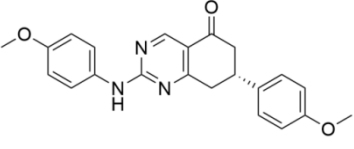
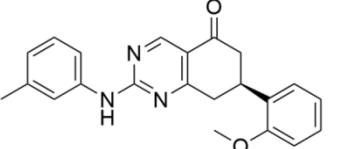
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 2389-2102 | 2  |   | -8.044 | -52.29 | -1.330 | -0.547 | 0.000 | -0.242 | 0.204 | -3.659 | -2.119 | -0.479 | -0.210 | 0.318 |
| 8341-0092 | 1  |   | -8.031 | -46.25 | -1.330 | -0.510 | 0.000 | -0.255 | 0.125 | -3.162 | -2.095 | -0.395 | -0.658 | 0.250 |
| C387-1583 | 11 |  | -8.005 | -39.76 | -1.011 | -0.750 | 0.000 | -0.242 | 0.408 | -4.047 | -1.950 | -0.589 | -0.052 | 0.228 |

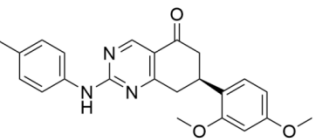
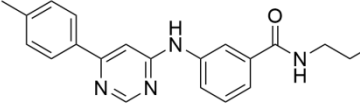
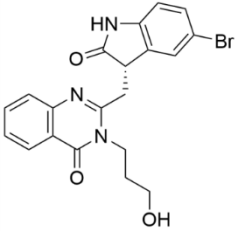
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P592-0475 | 14 |   | -8.005 | -38.83 | -1.330 | -0.200 | 0.000 | -0.500 | 0.276 | -3.051 | -2.188 | -0.462 | -0.550 | 0.000 |
| D367-0386 | 1  |   | -8.002 | -45.10 | -1.235 | -0.434 | 0.000 | -0.155 | 0.109 | -3.189 | -2.041 | -0.605 | -0.617 | 0.166 |
| D367-0277 | 1  |  | -7.982 | -44.26 | -1.493 | -0.426 | 0.000 | -0.189 | 0.114 | -2.970 | -2.002 | -0.502 | -0.607 | 0.092 |

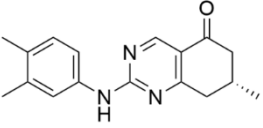
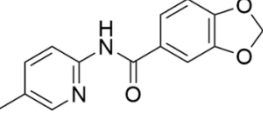
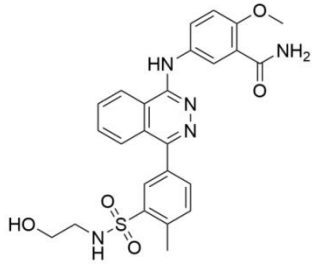
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 3966-3951 | 2 |   | -7.974 | -53.90 | -1.330 | -0.575 | 0.000 | -0.210 | 0.273 | -3.661 | -2.122 | -0.464 | -0.213 | 0.297 |
| 8211-0170 | 1 |   | -7.972 | -45.60 | -1.279 | -0.428 | 0.000 | -0.249 | 0.124 | -3.093 | -2.067 | -0.497 | -0.638 | 0.147 |
| D367-0436 | 1 |  | -7.919 | -47.91 | -1.644 | -0.507 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -2.968 | -2.090 | -0.467 | -0.644 | 0.568 |

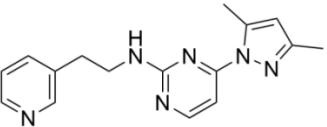
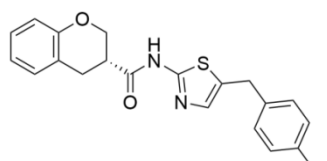
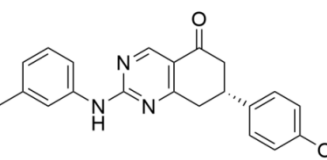
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Y020-1398 | 1  |   | -7.912 | -44.26 | -1.177 | -0.445 | 0.000 | -0.202 | 0.116 | -3.190 | -2.041 | -0.624 | -0.615 | 0.267 |
| F725-0720 | 12 |   | -7.900 | -41.66 | -2.409 | -0.149 | 0.000 | -0.018 | 0.273 | -2.998 | -2.107 | -0.971 | -0.364 | 0.838 |
| D385-0472 | 1  |  | -7.879 | -49.76 | -1.313 | -0.225 | 0.000 | -0.072 | 0.162 | -3.644 | -1.950 | -0.245 | -0.648 | 0.055 |

Продолжение таблицы А.2

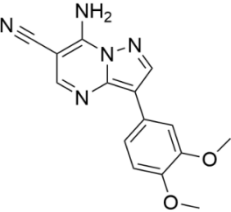
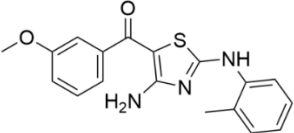
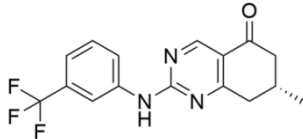
| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0335 | 1 |   | -7.873 | -38.98 | -1.330 | -0.555 | 0.000  | -0.500 | 0.137 | -2.501 | -2.134 | -0.322 | -0.667 | 0.000 |
| Y030-3487 | 6 |   | -7.857 | -42.95 | -1.292 | -0.500 | 0.000  | -0.500 | 0.242 | -3.151 | -2.166 | -0.390 | -0.199 | 0.041 |
| 4109-2097 | 4 |  | -7.817 | -48.03 | -1.143 | -0.350 | -1.500 | 0.000  | 0.238 | -4.260 | 0.000  | -0.934 | 0.000  | 0.105 |

Продолжение таблицы А.2

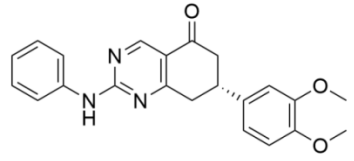
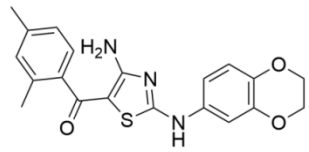
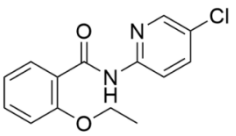
| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P592-0478 | 14 |   | -7.800 | -37.42 | -1.374 | 0.000  | 0.000 | -0.500 | 0.253 | -2.877 | -2.175 | -0.595 | -0.532 | 0.000 |
| 8582-1676 | 6  |   | -7.778 | -41.96 | -1.309 | -0.514 | 0.000 | -0.285 | 0.217 | -3.534 | -2.147 | -0.510 | -0.224 | 0.403 |
| D367-0427 | 1  |  | -7.755 | -47.17 | -1.259 | -0.411 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.087 | -2.056 | -0.384 | -0.630 | 0.241 |



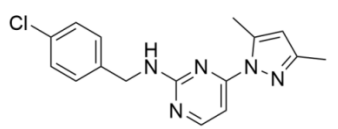
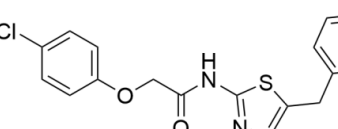
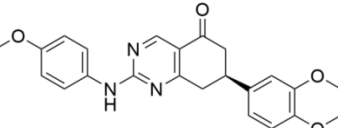
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 7997-0024 | 6  |   | -7.753 | -41.30 | -1.221 | -0.122 | 0.000 | -0.500 | 0.063 | -3.197 | -2.187 | -0.479 | -0.361 | 0.252 |
| F091-0100 | 13 |   | -7.730 | -39.88 | -1.551 | 0.000  | 0.000 | -0.369 | 0.197 | -2.991 | -2.396 | -0.567 | -0.162 | 0.000 |
| D367-0328 | 1  |  | -7.690 | -35.55 | -1.330 | -0.437 | 0.000 | -0.429 | 0.109 | -2.954 | -2.076 | -0.351 | -0.644 | 0.422 |

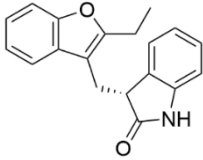
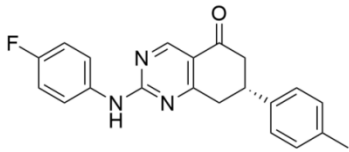
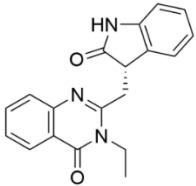
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0054 | 1  |   | -7.658 | -35.53 | -1.122 | -0.375 | 0.000 | -0.249 | 0.124 | -3.018 | -2.042 | -0.482 | -0.609 | 0.115 |
| F091-0880 | 13 |   | -7.656 | -45.80 | -1.464 | 0.000  | 0.000 | -0.229 | 0.160 | -2.896 | -2.600 | -0.763 | -0.127 | 0.263 |
| Y030-3507 | 10 |  | -7.632 | -41.55 | -1.184 | -0.500 | 0.000 | -0.500 | 0.282 | -3.250 | -2.110 | -0.422 | -0.176 | 0.118 |

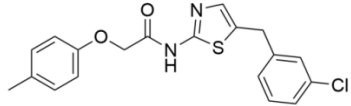
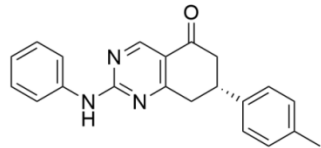
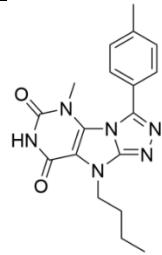
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| P592-0452 | 14 |   | -7.632 | -43.98 | -1.317 | -0.126 | 0.000 | -0.454 | 0.226 | -2.906 | -2.271 | -0.462 | -0.570 | 0.202 |
| 2389-2207 | 2  |   | -7.599 | -46.67 | -1.330 | -0.554 | 0.000 | -0.257 | 0.250 | -3.103 | -2.186 | -0.571 | -0.257 | 0.408 |
| D367-0248 | 1  |  | -7.593 | -37.75 | -1.189 | -0.450 | 0.000 | -0.149 | 0.108 | -2.780 | -2.133 | -0.406 | -0.670 | 0.077 |

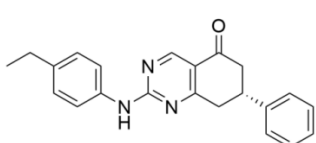
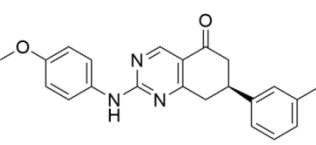
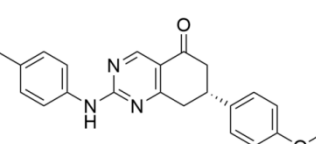
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D330-0151 | 6 |   | -7.542 | -46.17 | -1.330 | -0.261 | 0.000 | -0.500 | 0.129 | -3.093 | -1.950 | -0.314 | -0.366 | 0.143 |
| 8211-0186 | 1 |   | -7.537 | -44.65 | -1.314 | -0.463 | 0.000 | -0.342 | 0.142 | -3.065 | -2.080 | -0.439 | -0.659 | 0.683 |
| D163-0942 | 3 |  | -7.523 | -46.82 | -1.330 | -0.325 | 0.000 | -0.435 | 0.110 | -2.772 | -1.950 | -0.377 | -0.598 | 0.155 |

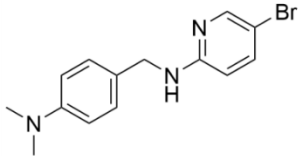
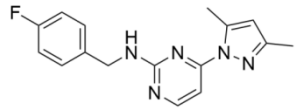
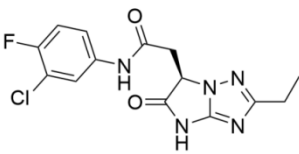
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 4264-1935 | 2 |   | -7.479 | -51.99 | -1.330 | -0.575 | 0.000  | -0.257 | 0.292 | -3.350 | -2.128 | -0.573 | -0.249 | 0.685 |
| D367-0033 | 1 |   | -7.434 | -44.53 | -1.305 | -0.465 | 0.000  | -0.402 | 0.156 | -3.079 | -2.089 | -0.464 | -0.662 | 0.874 |
| F722-0074 | 7 |  | -7.394 | -44.33 | -1.330 | 0.000  | -2.500 | -0.325 | 0.198 | -3.003 | 0.000  | -0.521 | -0.600 | 0.688 |

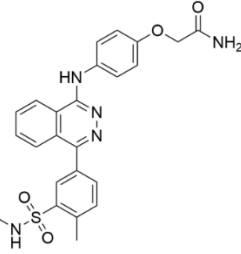
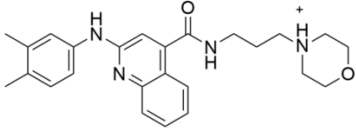
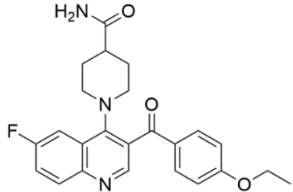
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 8211-0179 | 1 |   | -7.393 | -45.76 | -1.061 | -0.471 | 0.000 | -0.355 | 0.145 | -3.008 | -2.095 | -0.356 | -0.634 | 0.443 |
| D367-0236 | 1 |   | -7.370 | -44.38 | -1.300 | -0.475 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.045 | -2.073 | -0.415 | -0.646 | 0.753 |
| D367-0152 | 1 |  | -7.365 | -45.57 | -1.260 | -0.412 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.094 | -2.076 | -0.364 | -0.639 | 0.649 |

Продолжение таблицы А.2

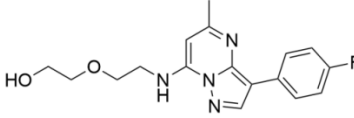
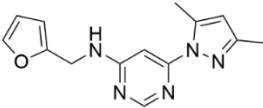
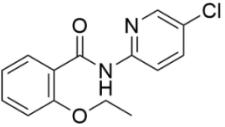
| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 6383-0877 | 10 |   | -7.352 | -37.55 | -1.266 | -0.271 | 0.000 | -0.479 | 0.177 | -3.038 | -2.215 | -0.478 | 0.000  | 0.112 |
| P592-0447 | 14 |   | -7.340 | -36.08 | -1.330 | -0.220 | 0.000 | -0.500 | 0.249 | -2.580 | -2.220 | -0.436 | -0.565 | 0.262 |
| D718-1652 | 6  |  | -7.181 | -45.51 | -1.357 | 0.000  | 0.000 | -0.374 | 0.149 | -2.351 | -1.950 | -0.460 | -1.001 | 0.159 |

Продолжение таблицы А.2

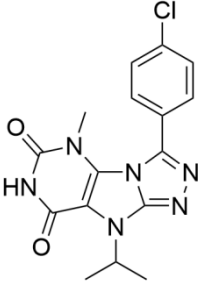
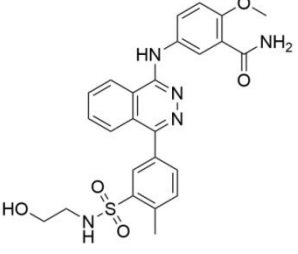
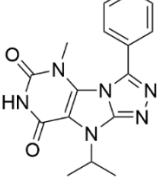
| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12    | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 4109-2011 | 4  |   | -7.176 | -50.80 | -1.084 | -0.350 | -1.076 | 0.000  | 0.228 | -4.180 | 0.000 | -0.847 | 0.000  | 0.000 |
| K788-4490 | 11 |   | -7.174 | -39.59 | -0.920 | -0.725 | -1.500 | -0.102 | 0.337 | -3.870 | 0.000 | -0.920 | -0.008 | 0.533 |
| C768-0885 | 11 |  | -7.169 | -39.75 | -0.879 | -0.798 | -1.500 | -0.095 | 0.191 | -4.448 | 0.000 | -0.403 | -0.366 | 0.129 |



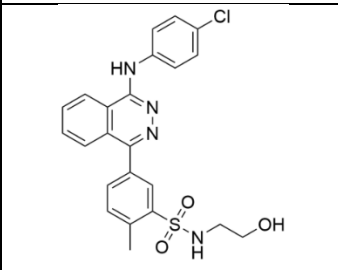
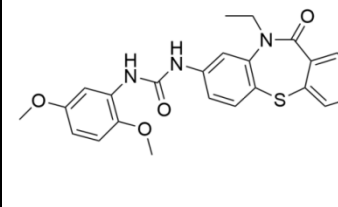
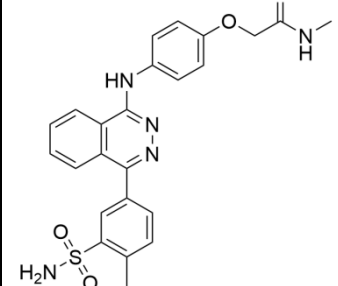
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D463-0114 | 6  |   | -7.127 | -43.52 | -1.387 | -0.475 | -1.500 | -0.399 | 0.517 | -3.045 | 0.000  | -0.726 | -0.244 | 0.044 |
| P774-4295 | 14 |   | -7.086 | -34.91 | -1.278 | 0.000  | 0.000  | -0.500 | 0.296 | -3.063 | -2.189 | -0.373 | -0.541 | 0.562 |
| Y030-3500 | 10 |  | -7.084 | -41.55 | -0.630 | -0.500 | 0.000  | -0.500 | 0.213 | -3.193 | -2.159 | -0.387 | -0.174 | 0.203 |

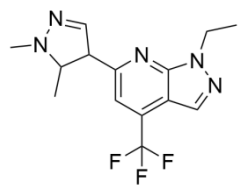
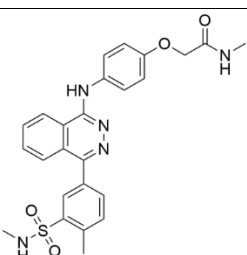
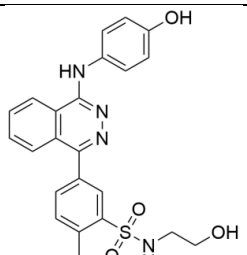
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3   | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12    | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| F722-0061 | 5 |    | -7.049 | -45.01 | -1.330 | 0.000  | -2.500 | -0.304 | 0.064 | -2.873 | 0.000 | -0.429 | -0.588 | 0.911 |
| 4109-2009 | 4 |    | -6.977 | -54.56 | -1.557 | -0.350 | -1.500 | 0.000  | 0.201 | -4.120 | 0.000 | -0.818 | 0.000  | 0.000 |
| F722-0047 | 5 |  | -6.874 | -44.27 | -1.330 | 0.000  | -2.500 | -0.419 | 0.076 | -2.599 | 0.000 | -0.471 | -0.545 | 0.915 |

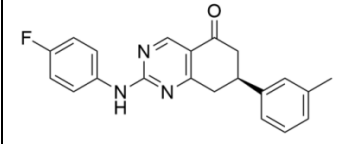
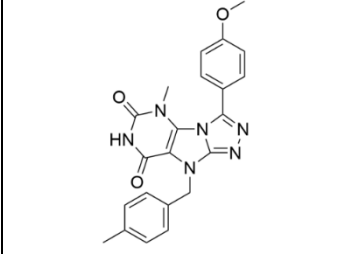
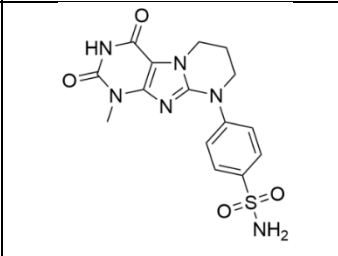
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12    | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 4109-1941 | 4 |   | -6.850 | -54.11 | -1.625 | -0.350 | -1.500 | 0.000  | 0.275 | -4.226 | 0.000 | -0.930 | 0.000  | 0.000 |
| E006-0403 | 9 |   | -6.842 | -53.52 | -1.049 | -0.530 | -1.500 | -0.002 | 0.170 | -3.748 | 0.000 | -0.396 | -0.158 | 0.150 |
| 4109-2010 | 4 |  | -6.808 | -55.66 | -1.573 | -0.350 | -1.500 | 0.000  | 0.228 | -4.379 | 0.000 | -0.786 | 0.000  | 0.384 |

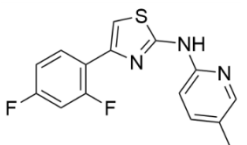
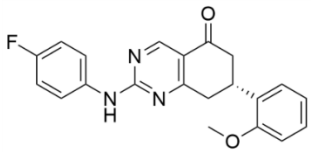
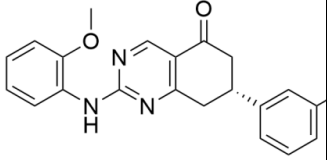
Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2  | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12    | 13     | 14     | 15    |
|-----------|----|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|
| Y504-8080 | 14 |   | -6.796 | -40.09 | -0.700 | -0.547 | -1.500 | -0.469 | 0.083 | -2.531 | 0.000 | -0.175 | -1.053 | 0.096 |
| 4109-2012 | 4  |   | -6.667 | -49.52 | -1.100 | -0.350 | -1.500 | 0.000  | 0.253 | -4.039 | 0.000 | -0.766 | 0.000  | 0.042 |
| 4109-1933 | 4  |  | -6.612 | -46.83 | -1.145 | -0.400 | -1.500 | 0.000  | 0.296 | -4.308 | 0.000 | -0.831 | 0.000  | 0.000 |

Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| D367-0269 | 1 |   | -6.524 | -43.37 | -1.229 | -0.434 | 0.000  | -0.342 | 0.142 | -2.953 | -2.022 | -0.472 | -0.614 | 1.400 |
| F722-0236 | 5 |   | -6.267 | -36.98 | -1.182 | -0.400 | -2.395 | -0.112 | 0.146 | -2.775 | 0.000  | -0.470 | -0.515 | 0.434 |
| 8578-0231 | 7 |  | -6.175 | -46.12 | -1.824 | 0.000  | 0.000  | -0.245 | 0.041 | -2.356 | -1.950 | -0.475 | -0.552 | 0.528 |

Продолжение таблицы А.2

| 1         | 2 | 3  | 4      | 5      | 6      | 7      | 8     | 9      | 10    | 11     | 12     | 13     | 14     | 15    |
|-----------|---|--|--------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|
| M008-0168 | 2 |   | -6.130 | -43.80 | -1.330 | -0.571 | 0.000 | -0.489 | 0.180 | -3.106 | -2.180 | -0.544 | 0.000  | 0.909 |
| D367-0275 | 1 |   | -5.034 | -46.93 | -0.670 | -0.500 | 0.000 | -0.289 | 0.131 | -3.118 | -0.448 | -0.377 | -0.637 | 0.874 |
| Y020-2784 | 1 |  | -4.887 | -40.01 | -1.257 | -0.525 | 0.000 | -0.302 | 0.134 | -3.081 | -2.055 | -0.364 | -0.664 | 0.729 |