

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

Институт химии и инженерной экологии

(наименование института полностью)

Кафедра «Химия, химические процессы и технологии»

(наименование кафедры)

04.03.01 «Химия»

(код и наименование направления подготовки, специальности)

«Медицинская и фармацевтическая химия»

(наименование(профиль)/специализации)

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

на тему: Анализ структуры комплексов белок - лиганд на примере  
ингибиторов мутантных форм EGFR-киназы

Студент

В.Н. Панкрушина

\_\_\_\_\_  
(И.О. Фамилия)

\_\_\_\_\_  
(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

\_\_\_\_\_  
(И.О. Фамилия)

\_\_\_\_\_  
(личная подпись)

Консультанты

Н.В. Яценко

\_\_\_\_\_  
(И.О. Фамилия)

\_\_\_\_\_  
(личная подпись)

\_\_\_\_\_  
(И.О. Фамилия)

\_\_\_\_\_  
(личная подпись)

**Допустить к защите**

Заведующий кафедрой д.х.н., профессор Г.И. Остапенко

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

\_\_\_\_\_  
(личная подпись)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 г.

Тольятти 2017

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ

(институт)

Химия, химические процессы и технологии

(кафедра)

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Кафедрой

\_\_\_\_\_ Остапенко Г.И.

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение бакалаврской работы**

Студентке Панкрушиной Валентине Николаевне

1. Тема «Анализ структуры комплексов белок-лиганд на примере ингибиторов мутантных форм EGFR-киназы»
2. Срок сдачи студентом законченной бакалаврской работы: 29 июня 2017 года
3. Исходные данные к бакалаврской работе литература по теме исследования
4. Содержание бакалаврской работы (перечень подлежащих разработке вопросов, разделов) Введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальная часть, заключение, список литературы.
5. Ориентировочный перечень графического и иллюстративного материала: презентация
6. Дата выдачи задания «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Руководитель выпускной  
квалификационной работы

\_\_\_\_\_  
(подпись)

А.С. Бунев  
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

\_\_\_\_\_  
(подпись)

В.Н. Панкрушина  
(И.О. Фамилия)

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ТОЛЬЯТТИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ И ИНЖЕНЕРНОЙ ЭКОЛОГИИ

(институт)

Химия, химические процессы и технологии

(кафедра)

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий Кафедрой

\_\_\_\_\_ Остапенко Г.И.

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

**КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН**

**выполнения бакалаврской работы**

Студента: Панкрушиной Валентины Николаевны

по теме: Анализ структуры комплексов белок-лиганд на примере ингибиторов мутантных форм EGFR-киназы

Наименование раздела работы	Плановый срок выполнения раздела	Фактический срок выполнения раздела	Отметка о выполнении	Подпись руководителя
Подбор литературных источников и написание раздела «Литературный обзор»			Выполнено	
Выполнение экспериментальной части работы			Выполнено	
Написание раздела «Экспериментальная часть»			Выполнено	
Написание разделов «Результаты и обсуждения»,				

«Введение» «Заключение», «Литература»			Выполнено	
Верстка работы, проверка работы научным руководителем			Выполнено	
Проверка работы в системе «Антиплагиат.ВУЗ»			Выполнено	
Оформление демонстрационного материала и устного доклада			Выполнено	

Руководитель выпускной  
квалификационной работы

\_\_\_\_\_  
(подпись)

А.С.Бунев  
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

\_\_\_\_\_  
(подпись)

В.Н Панкрушина  
(И.О. Фамилия)

## АННОТАЦИЯ

Представленная работа посвящена детальному исследованию результатов рентгеноструктурного анализа ряда комплексов низкомолекулярный лиганд (ингибитор) – киназа семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR).

Для каждого комплекса определены базовые межмолекулярные взаимодействия лиганд-белок, отвечающие за эффективность связывания. Особое внимание уделено анализу особенностей связывания ингибиторов для немногочисленных комплексов EGFR-киназы с различными мутациями T790M, L858R, V948R.

Полученные результаты представляют значительный интерес для дальнейшей целенаправленной разработки высокоэффективных ингибиторов киназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста, в том числе их мутантных форм.

## **ABSTRACT**

This diploma paper project is devoted to a detailed study of the results X-ray diffraction analysis of a number of complexes of a low molecular weight ligand (inhibitor) - kinase of the family of receptors of epidermal growth factor (EGFR).

The aim of the work is to determine the basic intermolecular interactions of the ligand-protein responsible for the binding efficiency.

The object of the diploma paper is inhibitors of mutant forms of EGFR-kinase.

The subject of the diploma paper is the structure of protein-ligand complexes.

The graduation work may be divided into several logically connected parts which are design of kinase inhibitors and mechanism of action. Much attention is given to analysis of inhibitor binding properties for a few EGFR-kinase complexes with various mutations of T790M, L858R, V948R.

The work is of interest for further targeted development of high-performance kinase inhibitors of the family of epidermal growth factor receptors, including their mutant forms.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	11
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1. Дизайн ингибиторов киназы.....	12
1.2. Механизм действия.....	14
1.3. Рациональный дизайн ингибиторов.....	19
1.4. Обратимые ингибиторы на основе субстрата .....	21
1.5. Обратимые ингибиторы на основе АТФ.....	24
1.6. Ингибиторы бисубстрата.....	27
1.7. Необратимые ингибиторы на основе субстрата.....	28
1.8. Необратимые ингибиторы на основе АТФ.....	30
1.9. Биофлавоноиды и сопутствующие соединения.....	33
1.10. Агенты химической модификации.....	36
1.11. Различные ингибиторы.....	39
2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	43
2.1. Комплекс EGFR(G719S) – лиганд.....	48
2.2. Комплекс EGFR(L858R) – лиганд.....	50
2.3. Комплекс EGFR(T790M) – лиганд.....	52
2.4. Комплекс EGFR(V924R) – лиганд.....	55

2.5. Комплекс EGFR(T790M, L858R) – лиганд.....	56
2.6. Прочие комплексы EGFR – лиганд.....	58
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
ЛИТЕРАТУРА.....	72

## ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

АТФ	Аденозинтрифосфат
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
АДФ	Аденозиндифосфат
АМФ	Аденозинмонофосфат
тРНК	Транспортная РНК
цАМФ	Циклический аденозинмонофосфат
ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
Leu	Лейцин
Arg	Аргинин
Ala	Аланин
Ser	Серин
Gly	Глицин
pH	Водородный показатель воды
Tyr	Тирозин
цГМФ	Циклический гуанозинмонофосфат
Glu	Глутамин
ГМФ	Гуанозинмонофосфат
DHPG	9-(1,3-Дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанин
c-src	
v-src	
Woc-Leu-CH <sub>2</sub> Br	<i>N</i> - $\alpha$ -третбутилоксикарбонил- <i>L</i> -лейцил бромометилкетон
EGF	Эпидермальный фактор роста
pp60 <sup>src</sup>	Фосфопротеин, кодируемый онкогеном src
Cys	Цистеин

NaBH <sub>3</sub> (CN)	Цианоборогидрид натрия
ГТФ	Гуанозинтрифосфат
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста
IC <sub>50</sub>	Концентрация 50% ингибирования
K <sub>i</sub>	
FSBA	5- <i>p</i> -фторсульфонилбензоил аденозин
FSB <sub>EA</sub>	5'- <i>p</i> -фторсульфонилбензоил-1- N <sup>6</sup> этанoadенозин
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
2-BDB-TAMP	2-[(4-бromo-2,3-диоксибутил)тиo]аденозин- 5'-монофосфат
6-BDB-TdaAMP	6-[(4-бromo-2,3-диоксибутил)тиo]-6- дезаминааденозин-5'-монофосфат
NGF	Фактор роста нервов
W-7	(6-аминогексил)-5-хлоро- нафталсульфонамид

## ВВЕДЕНИЕ

Современная разработка новых ингибиторов протеинкиназ, при наличии структурных данных о строении фармакологической биомишени включает в себя три основные стадии: молекулярное моделирование, синтез и исследование биологической активности. Несмотря на то, что в последние годы методы молекулярного моделирования значительно усовершенствовались, до сих пор получение данных о строении комплексов белок – лиганд является затратным и рутинным процессом. Одним из основных способом позволяющим более корректно интерпретировать и использовать данные молекулярного моделирования (молекулярного докинга) является использование интегрального подхода, где для конструирования новых ингибиторов используются данные рентгеноструктурного анализа комплексов белок-лиганд совместно с данными молекулярного докинга.

Представленная работа посвящена изучению особенностей межмолекулярного взаимодействия в комплексах мутантных форм киназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста с различными низкомолекулярными органическими соединениями (лигандами). Для реализации поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Анализ литературных данных об имеющихся рентгеноструктурных данных для комплексов мутантных форм киназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста.

2. Обработка и анализ данных рентгеноструктурного анализа для комплексов белок-лиганд. Выявление и систематизация основных межмолекулярных взаимодействий в структуре комплексов белок-лиганд.

# 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. Дизайн ингибиторов киназы

Фосфорилированные соединения широко распространены в живых системах. Приблизительно половина известных белков или связывают или обрабатывают комплексы, обладающие фосфатными группами [1]. Так называемый «высокоэнергетический фосфат» в виде аденозинтрифосфата (АТФ), как уже давно известно, выступает в качестве хранителя энергии для живых организмов. ДНК и РНК, генетические материалы живых организмов, состоят из полимерных фосфодиэфиров нуклеозида. Биологические мембраны являются по существу двойными слоями фосфолипида. Во всех этих случаях биологическая передача фосфатных групп (элементы  $PO_3^-$ ) установлены классом ферментов, названных киназами (нуклеотидтрифосфатфосфотрансфераза).

Процесс фосфорилирования, осуществляемый киназами, как было показано, участвует в ДНК/РНК синтезе [2], регулировании выделения нейромедиатора [3], модуляции ионных каналов [4-6], регулировании метаболизма гликогена [5] и контроле эукариотической экспрессии генов [7]. Фосфорилирование белка - важный процесс в преобразовании гормональных сигналов через клеточную мембрану, ведущий к митогенезу или, в некоторых случаях, к малигнизации [8-9].

Киназы могут быть разделены на три основные категории, основанные на АТФ субстрате, с которым они взаимодействуют (Таблица I). Нуклеотидные киназы, как правило, отвечают за фосфорилирование нуклеозидов/нуклеотидов, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот, а также для восстановления АДФ из АМФ, образующихся в синтезе белка тРНК (например, аденилаткиназы). Другие малые молекулы киназы выступают в качестве хранителей «высокоэнергетического фосфата» (например, креатинкиназа), участвуют в гликолизе (например, гексокиназа, фосфофруктокиназа) и синтезе фосфолипидов (например, диацилглицеринкиназа).

Недавние результаты показали, что тирозиновые протеинкиназы (рецепторы факторов роста и продуктов онкогена) непосредственно участвуют в трансдукции гормональных сигналов через клеточную мембрану, и сосредоточили большое внимание исследователей на этих ферментах. Хотя точные механизмы, с помощью которых происходит митогенез и преобразования не известны, понятно, что в процессе фосфорилирования белков участвуют остатки тирозина. Протеинкиназы (включая серин- и треонин-специфические типы) как уже давно известно, участвуют в модуляции активности ферментов (фосфоорилаза служит примером). Schacter и коллеги [10,11] недавно описали циклическую систему процесса фосфорилирования/дефосфорилирования каскада, в которой они показали, что с участием протеинкиназы можно добиться усиления сигнала и повышения чувствительности, затрачивая при этом небольшое количество энергии. Smith и коллеги сообщили о протеинкиназе "кислотного неустойчивого фосфата", функция которой неизвестна [12-14]. Предполагалось, что мишень этой киназы может быть гистидин или остатки лизина [15].

Очевидно, что способность селективно ингибировать киназы могла обеспечить механизм, через который могут быть далее объяснены их физиологические роли. Ингибиторы киназы также обладают потенциалом для оказания терапевтического подхода в лечении определенных болезненных состояний.

Таблица I (Классификация киназы)

Категория	Специфическое средство	Примеры	Функция
Нуклеотиды	Тимидин	Тимидилаткиназа	Синтез РНК ДНК
	Уридин	Уридилаткиназа	Синтез РНК ДНК
	АТФ \ АМФ	Аденилаткиназа	АДФ регенерации

Другие малые молекулы	Креатин	Креатинкиназа	Хранение энергии
	Пируват	Пируваткиназа	Гликолиз
	Глюкоза	Гексокиназа	Гликолиз
	Фруктозо-6-фосфат	Фосфофруктокиназа	Гликолиз
	Диацилглицерин	Диацилглицеринкиназа	Синтез липидов
Протеины	Серин\Треонин	цАМФ-зависимые	Трансмембранный сигнал
		Ca <sup>+2</sup> /кальмодулин-зависимые	Трансмембранный сигнал
	Тирозин	Ca <sup>+2</sup> /фосфолипид-зависимые	Трансмембранный сигнал
		EGF-рецептор	Митогенез
		PDGF-рецептор	Митогенез
		Рецептор инсулина	Митогенез
	Некоторые продукты онкогена	Действие инсулина	
Гистидин\Лизин	Неизвестно	Неизвестно	

## 1.2. Механизм действия

Для того, чтобы подойти к дизайну ингибиторов киназ рационально, необходимо иметь некоторые знания о механизме действия киназы. Рабочая модель механизма показала, что ингибиторы могут быть разработаны для использования конкретных аспектов механизмов. Ниже приводится общее обсуждение механизмов действия киназы. Последние работы механизма действия креатинкиназы и кинетические исследования цАМФ-зависимой протеинкиназы и  $pp60^{v-src}$  являются примером иллюстративного механизма действия малой молекулы киназы и двух протеинкиназ.

Киназы являются белками, каталитической функцией которых является передача фосфатной группы из нуклеозидтрифосфата, как правило, в АТФ, с определенной молекулой акцептора.

Обе АТФ и акцепторные молекулы становятся обратимо и избирательно связаны с ферментом в ходе катализа. В одном из возможных механизмов "прямое смещение", фосфорильный акцептор атакует фосфат в АТФ (Рис. 1). Другой, механизм "двойного разложения", включает в себя промежуточное звено фосфатного фермента, которое затем подвергается атаке фосфорильного акцептора. В зависимости от природы фосфорильного акцептора, фермент может отсоединять протон от акцептора для того, чтобы акцептор атаковал фосфатную группу. До сих пор киназы, в которых напрямую происходила передача фосфила между АТФ и основанием, показывали строгую инверсию конфигурации в фосфоре, а киназы с промежуточным звеном фосфатного фермента показывали полное сохранение конфигурации в фосфоре [16].

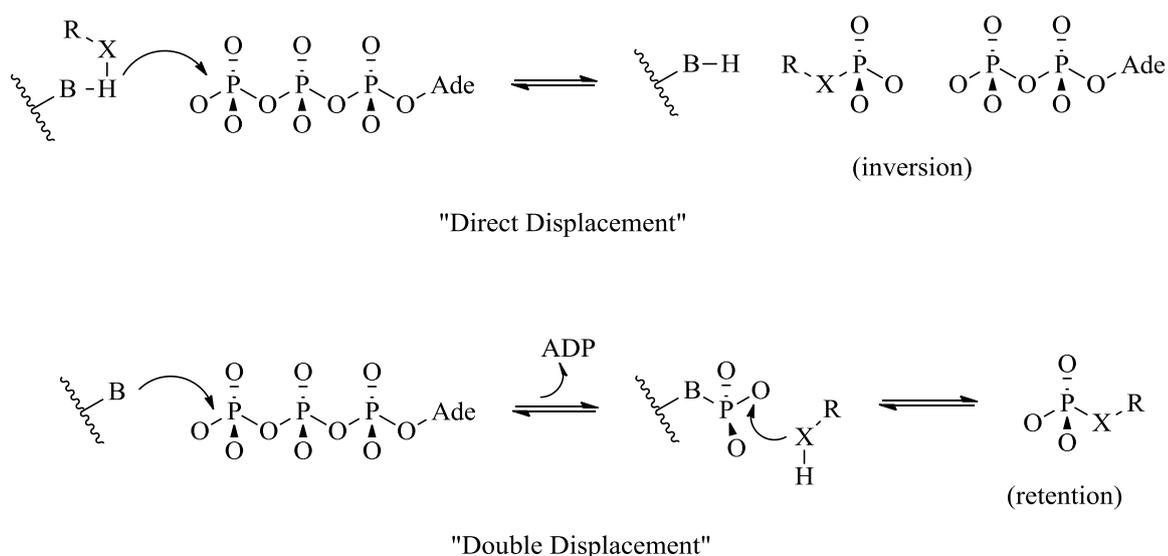


Рисунок 1 - Предложенные механизмы действия киназ

В обоих из "ассоциативных механизмов", описанных выше, разумно предлагать ферментативное основание (или нуклеофил) в активном центре. Такое основание в активном центре креатинкиназы атакует аналог эпоксикреатина, безвозвратно инактивируя фермент. Другой механизм основывается на передаче фосфатной группы. Этот механизм, "диссоциативный механизм", включает диссоциацию АТФ в виде АДФ и метафосфата ( $PO_3^-$ ). Существование предполагаемого промежуточного ферментативного процесса метафосфата спорно [17].

Все известные АТФ ферменты требуют использования двухвалентных катионов металлов для деятельности, хотя роли, которые эти ионы металлов играют не выяснены. Как правило,  $Mg^{+2}$  и  $Mn^{+2}$  активны, а другие ионы металлов, такие как  $Ca^{+}$  и  $Ba^{+}$  менее активны и тормозят реакцию. Способность креатинкиназы использовать  $Mg^{+2}$  или  $Mn^{+2}$  в качестве катализатора двухвалентных катионов сделало возможным детальное изучение связывания АТФ, АДФ и креатинфосфата с ферментом [18].

Креатинкиназа катализирует обратимую реакцию (показано на рис. 2) [19].

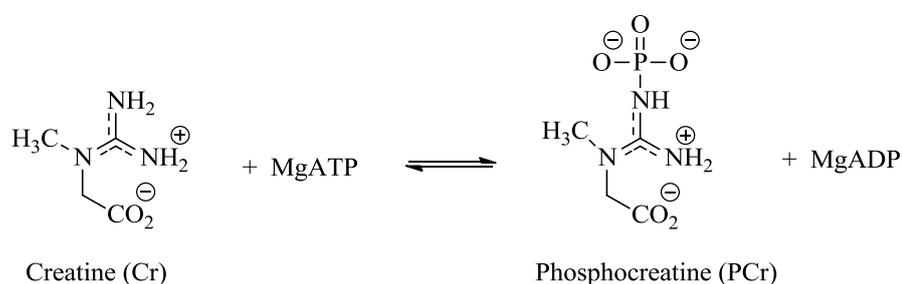
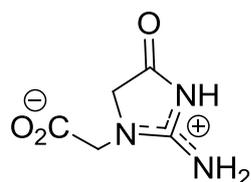


Рисунок 2 - Реакция креатинкиназы

В естественных условиях константа равновесия для реакции креатинкиназы приближается к единице. С избытком фермента в равновесной смеси два главных комплекса сосуществуют и быстро межпреобразовываются, а именно,  $E \cdot MgATP \cdot Cr$  комплекс и  $E \cdot MgADP \cdot PCr$  комплекс. Ион марганца ( $Mn^{+2}$ ) может заменить  $Mg^{+2}$ . Когда Leyh и соавторы [18] исследовали ЭПР спектры равновесной смеси этих двух комплексов, описанных выше, интерпретация спектров была осложнена перекрыванием двух наборов резонансов. Чтобы разделить эти спектры, был разработан новый конкурентоспособный ингибитор (карбоксикреатин), который связывается в связывающем участке креатина, но не переходит в продукт (по крайней мере, в условиях эксперимента). Его структура приведена на рис. 3.



Carboxycreatinine

### Рисунок 3 - Конкурентоспособный ингибитор креатинкиназы

Таким образом впервые стало возможно исследовать «фермент · MnATФ · субстрат-аналог» комплекс, связанный с киназой, спектроскопией ЭПР. Используя меченный изотоп кислорода-17, Leyh и соавторы [18] смогли показать недвусмысленно, что MnATФ в этом комплексе является  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – тридентатным хелатом. Подобные эксперименты с E · MnADФ · PCr комплексом показали, что MnADФ является  $\alpha$ ,  $\beta$  – бидентатным хелатом и что фосфатная группа PCr привязана к иону  $Mn^{+2}$  до высвобождения из фермента. Прямой механизм смещения также согласовывается с более ранней работой Leyh и коллег [20] и стереохимических результатов Hansen и Knowles [21], которые показали, что передача фосфорила происходит при инверсии конфигурации в фосфатной группе АТФ. Таким образом все данные свидетельствуют о том, что никакой фосфорилированный ферментный промежуточный продукт не включен.

В другой работе [22] авторы показали определенный остаток гистидина в качестве основания/кислоты, который участвует в депротонирование/протонирование гуанидинового фрагмента креатина во время катализа. Аргинин [23] и остаток лизина [24] предположительно близки к трифосфатной группе АТФ; остаток триптофана, по-видимому, близок к связывающему участку аденина [25]; и карбоксильная группа участвует в связывании гуанидинового субстрата [26].

Хотя такие подробности о протеинкиназах пока не известны, недавние исследования механизма действия каталитической субъединицы циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ)-зависимой протеинкиназы и механизма действия тирозинкиназы pp60<sup>src</sup> оказались объяснимы.

Кинетические исследования Cook и сотрудников [27], Whitehouse и Walsh [28], и Whitehouse и коллег [29] предполагают, что механизм действия каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы является случайный-упорядоченный-бимолекулярный-бимолекулярный. Таким образом, субстраты могут связываться случайным образом, но продуктивный комплекс формируется только тогда, когда MgАТФ связывается первым. Whitehouse и сотрудники предположили, что есть конформационное изменение, связанное с фосфатом MgАТФ, которое происходит только при связывании Ser пептида (кемптид; Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) или белка-ингибитора. Это конформационное изменение MgАТФ позволило авторам объяснить "очевидные несоответствия в данных, о которых сообщили различные лаборатории". Cook и коллеги [27] характеризовали участок связывания двухвалентного металла, о котором ранее сообщают. Они сообщили, что после увеличения концентрации свободного  $Mg^{+2}$ ,  $V_{max}$  уменьшается в 5-6 раз, а  $V/K$  для MgАТФ увеличивается в 5 раз. Это согласуется с постулатом о том, что второй  $Mg^{+2}$  связывается с полифосфатом участком MgАТФ и увеличивает близость нуклеотида к ферменту.

Исследование pH, проведенное Yoon и Cook, показало, что имеются два ферментативных остатка со значениями рК 6.2 и 8.5 в профилях  $V/K$  для пептида Ser. Идентичные рК<sub>s</sub> были найдены для  $1/K$ ; профиль для пептида Ala. Предположительно, остаток с рК=6.2 является каталитическим основанием, которое абстрагирует протон от гидроксила Ser во время катализа.

Wong и Goldberg изучили кинетику ( $Val_5$ ) процесса фосфорилирования ангиотензина II протеинкиназой тирозина рр60<sup>v-src</sup> [30]. Они сообщают, что наблюдаемая кинетика согласуется со случайными связями как с пептидом, так и с АТФ, но что для связывания необходим «упорядоченный-бимолекулярный-бимолекулярный» механизм, связанный в первую очередь с АТФ. Эти результаты идентичны тем, которые были найдены для

кинетического механизма каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы, обсуждавшейся выше. Инактивация фермента диэтилпирокарбонатом предполагала наличие существенного остатка гистидина или лизина в активном центре. Отсутствие защиты путем предварительной инкубации с АТФ против инактивации диэтилового пирокарбоната и невозможность выделения любой фосфоаминокислоты, отличной от фосфотирозина из основных гидросиликатов, приводило авторов к исключению присутствия промежуточного звена фосфорил-фермента в реакции. Таким образом, механизмы протеинкиназы, по-видимому, не отличаются от механизмов креатинкиназы.

Недавние технологические достижения в области сбора и обработки данных сделали определение структуры белка методом рентгеноструктурного анализа затрачивая гораздо меньше усилий, чем это было в прошлом. Рентгеноструктурные данные, безусловно, бесценны, но они дают статическую картинку только одной конформации белка. Даже когда структуры обоих комплексов субстрата и комплексов продуктов доступны, они не всегда объясняют молекулярный механизм реакции. Однако, если бы была известна пространственная структура киназы была, то можно было бы разработать ингибиторы, которые используют ферментативные остатки в активном центре или вблизи него, которые не должны участвовать в каталитическом процессе. Кристаллическая структура фосфоглицераткиназы связанной с АТФ была определена по данным рентгеновской дифракции Bruant и коллегами.

### 1.3. Рациональный дизайн ингибиторов

Ниже мы кратко рассмотрим общие подходы к разработке различных типов ингибиторов ферментов. Более детально рассмотрели эту тему Santi и Kenyon [31] и Stark и Bartlett [32].

Существует два основных класса ингибиторов ферментов, обратимые ингибиторы и необратимые ингибиторы.

Обратимые ингибиторы - это молекулы, которые связываются с ферментом нековалентным образом и находятся в равновесии со свободным ферментом и ингибитором. Связанный обратимый ингибитор предотвращает катализ, как правило, блокируя доступ субстрата к активному центру. Обратимые ингибиторы обычно являются ферментативно неактивными аналогами субстрата. По сути, они обычно конкурируют с субстратом для связывания в активном центре. Аналогами переходного состояния являются ингибиторы, которые используют преимущества повышенной близости связывания [33], которые имеют ферменты для переходного состояния реакции по субстратам или продуктам. Для ферментов, которые имеют дело с двумя субстратами, можно сконструировать аналог бисубстрата, который включает в одну молекулу аспекты обоих субстратов, используя не только энергию связи каждого субстрата, но и энтропийный вклад, имея связывающие фрагменты, ковалентно связанные в одной молекуле.

Необратимые ингибиторы - это молекулы, которые ковалентно связываются с ферментом. Фермент инактивируется из-за того, что ингибитор блокирует активный центр или реагирует с каталитически важным остатком. Необратимые ингибиторы почти всегда содержат электрофильные частицы, которые нападают на нуклеофилы на остатки боковой цепи фермента. Существует два общих подхода к разработке этих ингибиторов.

Первый подход заключается во включении активного электрофила в обратимую молекулу ингибитора. В этом случае можно получить специфичность для рассматриваемого фермента из-за обратимого связывания молекулы. После удерживания в активном центре электрофил может быть подвергнут воздействию ферментативного нуклеофила. Этот тип ингибитора обычно называют либо аналогом, либо необратимым ингибитором активного центра.

Второй и, как правило, более элегантный подход заключается в разработке молекулы, которая включает в себя некоторые неактивные функции, которые активируются ферментом, когда фермент пытается

осуществить нормальный каталитический процесс на аналоге. (Это описано как предоставление ферментам ручной гранаты и фермент выталкивает штифт.) Этот, теперь активный, фрагмент ковалентно связывается с ферментом. Эти классы ингибиторов упоминаются либо как инактиваторы на основе механизмов, либо как суицидальные субстраты.

В таблице II приведены типы ингибиторов ферментов, рассмотренные выше, и приведены примеры для каждого из них.

Учитывая этот краткий обзор, мы теперь представляем обзор последних ингибиторов киназы, о которых сообщалось на сегодняшний день. В тех случаях, когда имеются достаточные доказательства, отмечается тип ингибирования, который проявляет соединение.

Таблица II (Типы ингибиторов ферментов)

Общий тип	Определенный вид	Пример ингибитора	Ингибируемый фермент
Обратимый	Субстратный аналог	Карбоксикреатин	Креатинкиназа
	Бисубстратный аналог	$P^1, P^2$ -ди(аденозин-5') пентафосат [34]	Аденилаткиназа
	Аналог переходного состояния	<i>N</i> -(фосфоацетил)- <i>L</i> -аспартат [35]	Аспартат-транскарбамилаза
Необратимый	Родственный аналог	Эпоксикреатин [36]	Креатинкиназа
	Суицидный субстрат	$\beta$ -Фтораланин [37]	Аланинацетаза

#### 1.4. Обратимые ингибиторы на основе субстрата

В этом разделе мы обсудим некоторые подходы, которые были приняты для разработки обратимых ингибиторов, которые являются конкурентоспособными по отношению к основанию нуклеотида. Большая часть работы, которая будет обсуждаться, была выполнена на протеинкиназах.

Протеинкиназы несколько необычны в том, что их субстраты являются макромолекулами. Однако было показано, что и цАМФ-зависимые протеинкиназы и  $pp60^{src}$  могут распознавать и фосфорилировать небольшие пептиды [27-30].

Wong и Goldberg [30] синтезировали аналог субстрата ( $Val_5$ ) ангиотензина II, где остаток тирозина был заменен дегидрофенилаланином. Они обнаружили, что при концентрации 1 моль, в аналоге ингибируется  $pp60^{src}$  - каталитическое фосфорилирование ( $Val_5$ ) на 83%. Kemp и коллеги [38] заменили остаток серина в синтетическом пептидном субстрате (Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly) для цАМФ-зависимой протеинкиназы на аланин и обнаружили, что пептид аланин является ингибитором этой киназы, конкурентоспособной по отношению к пептидному субстрату. В других исследованиях [29] использовался аналог пептидного субстрата с серином, замененным аланином в качестве конкурентоспособного ингибитора цАМФ-зависимой протеинкиназы.

Вышеприведенные исследования показывают, что, удаляя гидроксильную группу, фосфорилированную из субстрата, можно получить ингибирующую молекулу. Ингибиторы, разработанные таким образом, обычно не оптимальны, так как они обычно не связываются плотно с ферментом, чем сам субстрат.

Другое исследование Wong и Goldberg [39] продемонстрировало, что декапептид соответствующий остаткам 412 - 421 из  $pp60^{src}$  ингибирует ряд тирозинкиназ ( $K_i$   $pp60^{src} = 0.25$  моль). Этот пептид содержит остаток тирозина, но не является субстратом для любой из изученных киназ. В белке ( $pp60^{src}$ ) этот Тирозин-416 фосфорилируется. Непонятно, почему синтетический пептид не фосфорилируется. (Примечание: Wong и Goldberg сообщили об этом декапептиде как соответствующие остаткам 415-424 из  $pp60^{src}$  на основе ранней неправильной последовательности для  $pp60^{src}$ .)

Cheng и соавторы [40] синтезировали пептид с 20 остатками, который соответствует активному центру белка с устойчивостью к цАМФ-зависимой

протеинкиназе. Этот пептид ингибирует киназу со значением  $K_i=2.3$  нмоль. В следующем исследовании Glass и сотрудники [41] использовали этот тот же синтетический пептид, чтобы исследовать различия между цАМФ- и цГМФ-зависимыми протеинкиназами. Они обнаружили, что пептид ингибирует обе киназы, но он избирателен для цАМФ-зависимой в более чем 50 000 случаев.

Полимерные пептиды использовались Meggio и сотрудниками [42] и Braun, Raymond и Racker [43] для изучения протеинкиназ. Meggio и сотрудники [42] установили, что полиглутамат<sub>70</sub> (то есть, глутаматный полимер, содержащий 70 остатков), является наиболее эффективным ( $K_i=0.11$  моль) ингибитором казеинкиназы второго типа. Полиглутамат<sub>70</sub> был конкурентоспособным по отношению к казеину. Braun и коллеги [43] использовали случайные полимеры тирозина, глутамата, аланина и лизина и обнаружили, что поли (Glu,Tyr)<sub>n</sub> (80:20) является хорошим субстратом для тирозинкиназ ( $K_m$  в диапазоне  $\mu\text{molar}$  для  $\text{pp60}^{\text{src}}$ ). Интересно отметить, что полимер (Ala-Tyr-Glu-Gly)<sub>n</sub> почти полностью ингибировался при 0,1 мг/мл против катализируемого инсулиновым рецептором фосфорилирования поли (Glu,Tyr)<sub>n</sub> (80:20).

Вышеописанные исследования показывают существенное различие в субстратных особенностях серин/треонинкиназы по сравнению со специфическими тирозинкиназами. Серин/треонинкиназы требуют последовательности с двумя основными остатками (аргинин является лучшим) по отношению к аминокислоте из фосфорилированного серина/треонина. Специфичность субстрата для тирозинкиназ не так четко определена. Однако, похоже, предпочтение отдается кислотным остаткам, имеющим аминогруппу к тирозину. Это может объяснить, в частности, эффективность полимеров Glu, Tyr в качестве субстратов для тирозинкиназ.

Кюо и соавторы [44] обнаружили, что ряд встречающихся в природе полипептидных цитотоксинов являются мощными и селективными ингибиторами кальций-фосфолипид-содержащей протеинкиназы. Известно, что эти цитотоксины взаимодействуют с мембранно-липидными

двухслойными компонентами. Авторы отмечают, что неясно, связано ли ингибирование фосфорилирования белка с цитотоксичностью этих полипептидов.

Bishop и коллеги [45] синтезировали ряд аналогов диацилглицерина и оценили их влияние на диацилглицерин-киназу. Было установлено, что два аналога диоктаноилэтиленгликоль и 1-моноолеилглицерин ингибируют со значениями  $K_i$  58 моль и 91 моль, соответственно. Оба эти аналога были конкурентоспособными по отношению к субстрату 1,2-диоктаноилглицерину. Структуры этих соединений показаны на рис. 4. Аналог этиленгликоля не содержит гидроксиметильную группу, которая фосфорилирована, но в остальном идентична субстрату. Непонятно, почему 1-моноолеилглицерин не является субстратом для киназы.

В исследовании глицеринкиназы Seltzer и сотрудники [46] сообщили, что 1-тиоглицерин является ингибитором, конкурентоспособным по отношению к глицерину ( $K_i=2-3$  моль). Было высказано предположение, что тиоглицерин может быть фосфорилирован ферментом и что фосфотиоглицерин может быть фактическим ингибитором. Авторы не сообщили о какой-либо попытке определить точный характер ингибирующих видов.

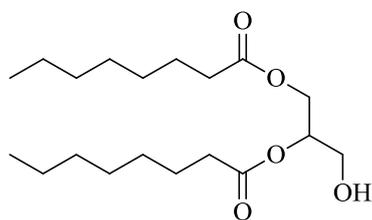
### 1.5. Обратимые ингибиторы на основе АТФ

Аналоги нуклеотида, которые не являются необратимыми ингибиторами, были очень полезны при исследовании механизмов киназы. Например, молекулы  $\beta, \gamma$ -аденилил-метилendifосфонат (АМФ-PCP) и  $\beta, \gamma$ -аденилилимидодифосфат (АМФ-PNP) являются аналогами АТФ, которые, как правило, не подвергаются реакции передачи фосфорила. Эти аналоги были использованы в качестве конкурентоспособных ингибиторов АТФ для исследования кинетики многих ферментативных систем.

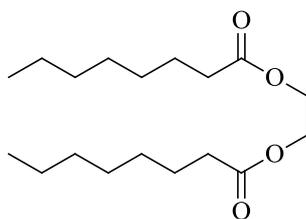
Гуанозонтрифосфатные аналоги, выборочно замещенные с серы на кислород в трифосфатном фрагменте, использовались Lee, Goody и Nowak [47] для изучения ионно-зависимой селективности в отношении

фосфоенолпируваткарбокскиназы. Они обнаружили, что некоторые аналоги являются ингибиторами, а другие - субстратами. Они также сообщили, что различные стереоизомеры (в тиофосфорильной части) имеют отличительную активность в качестве субстратов.

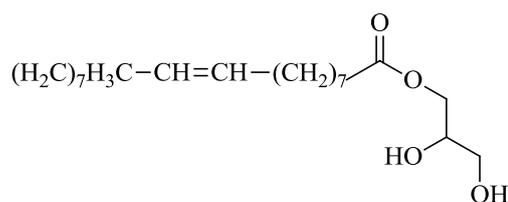
Соединения 9-(1,3-дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанин (DHPG, Рис. 8) и 9-(2-гидроксиэтоксиметил)гуанин (ацикловир, Рис. 5) являются хорошо известными противовирусными средствами. Эти молекулы фосфорилируются в естественных условиях их трифосфатным аналогом, которые, как считается, являются биологически активными разновидностями [48,49]. Воеhне [50] изучил фосфорилирование производных монофосфата этих аналогов изозимами гуанилаткиназы. Он нашел, что оба - субстраты, которые являются конкурентоспособными относительно ГМФ. Активность DHPG была схожа со всеми изозимами, тогда как активность ацикловира варьировала в четырехкратном диапазоне. Было также обнаружено, что ацикловир взаимодействует со связывающим участком АТФ.



1,2-Dioctanoylglycerol

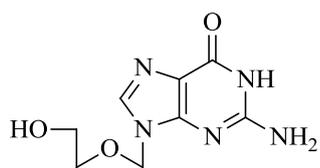


1,2-Dioctanylethyleneglycol

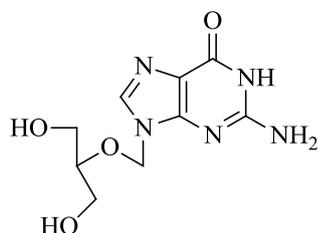


1-Monooleoylglycerol

Рисунок 4 - Аналоги диацилглицерина

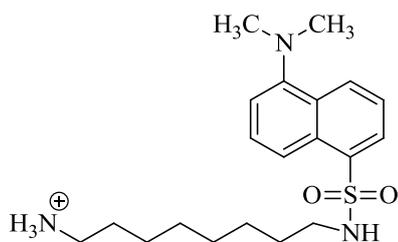


Acyclovir



DHPG

Рисунок 5 - Ациклические противовирусные аналоги гуанозина



N-Dansyl-1,8-diaminooctane

Рисунок 6 - Ингибитор пиридоксалькиназы

Hurley, Lin и Fox [51] изучили взаимодействие ряда аналогов нуклеозида с аденозинкиназой. Они обнаружили, что ряд аналогов являются ингибиторами фосфорилирования дезоксиаденозина. Неизвестно, являются ли эти ингибиторующие аналоги просто конкурентными субстратами.

Kerry и Kwok [52] сообщили, что различные амины являются ингибиторами пиридоксалькиназы, конкурентоспособными относительно АТФ. *N*-dansyl, 1,8-диаминооктан (Рис. 6), был самым сильным ингибитором ( $K_i=10$  моль). Их результаты показали, что аминогруппы необходимы для активности и что увеличение длины цепи аналогов алифатических аминов увеличивает их ингибиторную активность. Было высказано предположение, что могут быть гидрофобные взаимодействия между ингибиторами и ферментом.

## 1.6. Ингибиторы бисубстрата

Как описано ранее, аналоги бисубстратов обладают потенциалом чрезвычайно сильных ингибиторов связывания. В раннем исследовании такого рода Lienhard и Secemski [34] сообщили, что  $P^1$ ,  $P^5$ -ди(аденозин-5') пентафосфат( $AP_5A$ ) является мощным ингибитором аденилаткиназы.  $K_i$ , о котором они сообщили (2.5 нмоль) на самом деле меньше, чем произведение значений  $K_d$  MgATФ (100 моль) и АМФ (600 моль). Hampton, Kappler, и Picker [53] синтезировали 8-SEt  $AP_5A$  и обнаружили, что этот замещенный аналог бисубстрата демонстрирует избирательность для ингибирования изозимов аденилаткиназы. В другом исследовании, Hampton и сотрудники [54] построили бисубстратные аналоги АТФ и глюкозы, АТФ и тимидина ( $AP_3$ -глюкозы,  $AP_4$ -глюкозы, и  $AP_3T$ ) и обнаружили, что аналоги ингибируют гексокиназы и тимидинкиназы, соответственно. Cheng и соавторы [55] изучили ряд бинуклеозидных олигофосфатов в качестве потенциальных ингибиторов бисубстрата уридинкиназы и обнаружили, что  $AP_4U$  является самым сильным ( $K_i=197$  моль). Совсем недавно, Bone, Cheng и Wolfenden [56] изучали взаимодействия  $AP_nA$  ( $n=3-6$ ) с аденозинкиназой и  $AP_ndT$  ( $n=4-6$ ,  $dT$ =диокситимидин) с тимидилаткиназой. Они обнаружили, что  $AP_4A$  является самым сильным ингибитором аденилаткиназы. Они также обнаружили, что тимидилаткиназа наиболее сильно ингибируется  $AP_6dT$  и что ингибирование является конкурентоспособным по отношению к обоим субстратам. Авторы полагают, что эти результаты подтверждают мнение о том, что эти киназы опосредуют прямой перенос фосфорильной группы и не связаны с промежуточным звеном фосфорилированной ферментной группы.

Maness, Perry, и Levy [57] показали, что  $AP_4A$  ингибирует  $pp60^{src}$ -катализируемое фосфорилирование иммуноглобулина G у опухолевидных кроликов. В дальнейшем исследовании, Levy и коллеги [58] сообщают, что  $AP_4A$  проявляет отличительную активность по отношению к киназе, кодируемой вирусным геном src ( $v-src$ ) по сравнению с кодированным геном src клетки (c-src). По-видимому,  $AP_4A$  взаимодействует со связывающим

участком АТФ. Второй адениновый фрагмент в ингибиторе может быть соединен со связывающим участком тирозина.

### 1.7. Необратимые ингибиторы на основе субстрата

Необратимые ингибиторы, которые предназначены в качестве аналогов субстрата, вероятно, обладают наибольшим потенциалом для использования как при изучении ферментных систем в естественных условиях, так и в качестве химиотерапевтических агентов. Эти ингибиторы приобретают специфичность для рассматриваемого фермента путем их мимикрией естественного субстрата для ферментативной реакции. Они приобретают потенцию по необратимой природе своего ингибирования.

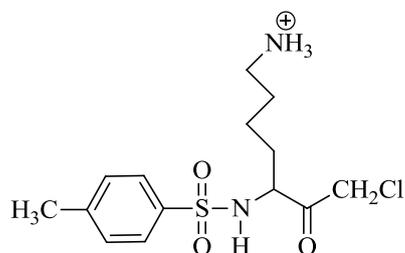
Richert и соавторы [59] установили, что *N*- $\alpha$ -тозил-*L*-лизил хлорометилкетон (ТЛСК, Рис. 7), мощный необратимый ингибитор трипсина [60], а также ингибитор pp60<sup>src</sup>. Данное явление наблюдалось как в естественных условиях, так и как инверсия к нормальной морфологии трансформированных клеток, и в пробирке, как ингибирование фосфорилирования иммунного комплекса. Они сообщили, что аналог фенилаланина (ТРСК, Рис. 7) из ТЛСК также ингибировал активность киназы в пробирке, но был цитотоксичен для клеток. Фенилметилсульфонилфторид (PMSF), еще один ингибитор протеазы, неэффективен против активности киназы, что подразумевает прямое влияние как ТЛСК, так и ТРСК на pp60<sup>src</sup>.

Navarro и коллеги [61] изучили ряд производных галогенметилкетона в качестве потенциальных ингибиторов тирозинкиназ. Соединение *N*- $\alpha$ -третбутилоксикарбонил-*L*-лейцил бромометилкетон (Woc-Leu-CH<sub>2</sub>Br, рис. 7) является наиболее эффективным аналогом. Было обнаружено, что Woc-Leu-CH<sub>2</sub>Br ингибирует EGF-стимулированное фосфорилирование экстрактами из мембран А-431, pp60<sup>src</sup>-катализируемое фосфорилирование и p130<sup>fps</sup>-катализируемое фосфорилирование.

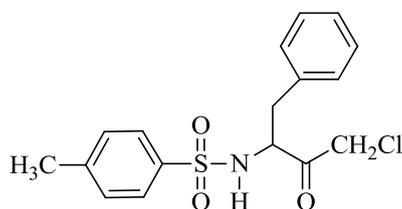
Ни в одном из вышеприведенных исследований не рассматривалась возможность необратимого ингибирования. Нетрудно представить, что эти

пептидные аналоги галогенметилкетона связываются в активных центрах этих протеинкиназ и что нуклеофил в активном центре может вытеснять галоген, необратимо инактивируя фермент.

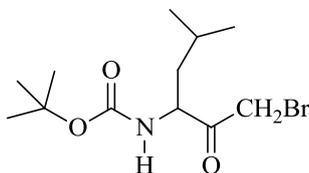
В особенно элегантном исследовании Bramson и соавторы [62] разработали метку близости для каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы. Аналог был производным пептидного субстрата Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly, где серин заменен на S-(3-нитро-2-пуридинсульфенил)-цистеин (Рис. 8). Авторы обнаружили, что аналог специфически и стехиометрически помечен одним остатком цистеина (Cys-198) на белке. Ингибирование было уменьшено путем добавления dithiothreitol, восстанавливая 90-100% первоначальной активности.



N-a-tosyl-L-lysyl chloromethylketone (TLCK)



N-a-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone (TPCK)



N-tretbutoxycarbonyl-leucyl bromomethylketone (Boc-leu-CH<sub>2</sub>Br)

Рисунок 7 - Аналоги галогенметилкетона

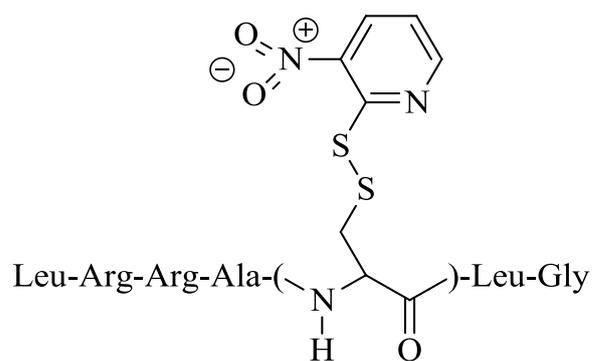


Рисунок 8 – цАМФ-зависимый ингибитор протеинкиназы

### 1.8. Необратимые ингибиторы на основе АТФ

Реактивные аналоги нуклеотида были очень полезны при изучении связывающих белков нуклеотида.

Desamp и Colman [63] использовали 5-*p*-фторсульфонилбензоил аденозин (FSBA, Рис. 9-1) для необратимой инактивации пируваткиназы. После протеолитического расщепления фермента, меченный радиоактивным FSBA, они определили три пептида, модифицированные на тирозине и два пептида, модифицированные на лизине. Они пришли к выводу, что эти остатки расположены в связывающем участке нуклеотида белка. Tomich и Colman использовали флуоресцентный аналог 5'-*p*-фторсульфонилбензоил-1-*N*<sup>6</sup>этанаденозин (FSB<sub>E</sub>A, Рис. 9-2) для изучения того же фермента. Они обнаружили, что этот аналог помечен одним гистидином и взаимодействует с парой цистеинов, таким образом, что тиосульфонат образуется промежуточным звеном. Этот промежуточный продукт быстро реагирует со вторым цистеином, с образованием дисульфида и высвобождением ингибитора. Эксперименты ЯМР показали, что бензоильная группа поддерживает сильное взаимодействие с группой ethenoadenine. Это означает, что флуоресцентный аналог маркирует ферментные группы около связывающего участка аденина. Исследования ЯМР показывают, что явление укладки намного менее сильно для нефлуоресцентного аналога. Таким образом нефлуоресцентный аналог, FSBA, может связывать в расширенной структуре, тем самым модифицируя ферментные остатки в области связывания полифосфата.

Светочувствительный, радиоактивный 8-азидо-[<sup>32</sup>P]цАМФ (Рис. 9-3) использовался Corbin и Doskeland [64] для изучения цГМФ-зависимой протеинкиназы. Они обнаружили, что один меченый полипептид (M<sub>r</sub> = 12,000) был получен из электрофореза триптического усваивания модифицированного фермента.

Van Obberghen и сотрудники использовали диальдегидный аналог АТФ (Рис. 9-4) для изменения рецептора инсулина. Инкубация частично очищенного рецептора инсулина с АТФ-диальдегидом сопровождалась обработкой NaBH<sub>3</sub>(CN) для уменьшения оснований Шиффа, образованных из диальдегида и ферментных аминов. Это привело к ковалентной маркировке β-субъединицы.

Tamura, Rakov и Cross [65] разработали аналог пиридоксаль-5'-дифосфо-5'-аденозина (PLP-АМФ, Рис. 9-5) в качестве метка близости для связывающих участков нуклеотида на белках. Авторы рационализировали, что как и в случае аналога диальдегида АТФ, пиридоксальная часть PLP-АМФ может образовывать основание Шиффа с ферментативной аминокислотной группой, которая после восстановления будет достаточно стабильной, чтобы сформировать характеристику. Это действительно оказалось так. Авторы смогли модифицировать ковалентно-дрожжевую спиртовую дегидрогеназу, дрожжевую гексокиназу, пируваткиназу кроличьей мышцы и фосфолицераткиназу.

Colman и соавторы [66] и Kapetanovic с коллегами [67] разработали соответствующие аналоги АМФ 2-[(4-бromo-2,3-диоксибутил)тио]аденозин-5'-монофосфат (2-BDB-TAMP, Рис. 9-6), и 6-[(4-бromo-2,3-диоксибутил)тио]-6-дезаминоаденозин-5'-монофосфат (6-BDB-TdaAMP, Рис. 9-7). Обе эти молекулы содержат 4-бром-2,3-диоксибутил группу. Эта группа включает в себя фрагмент бромметилкетона, который реагирует с большинством ферментных нуклеофилов и диоксогруппой, которая является реакционноспособной к остаткам аргинина. Colman и коллеги [66] обнаружили, что 6-BDB-TdaAMP необратимо инактивирует пируваткиназу и

что дифосфатный аналог 6-BDB-TdaADP необратимо реагирует с изоцитратдегидрогеназой, предположительно в аллостерическом связывающем участке АДФ. Каретановиc и коллеги [67] использовали 2-BDB-TAMP, чтобы маркировать пируваткиназу.

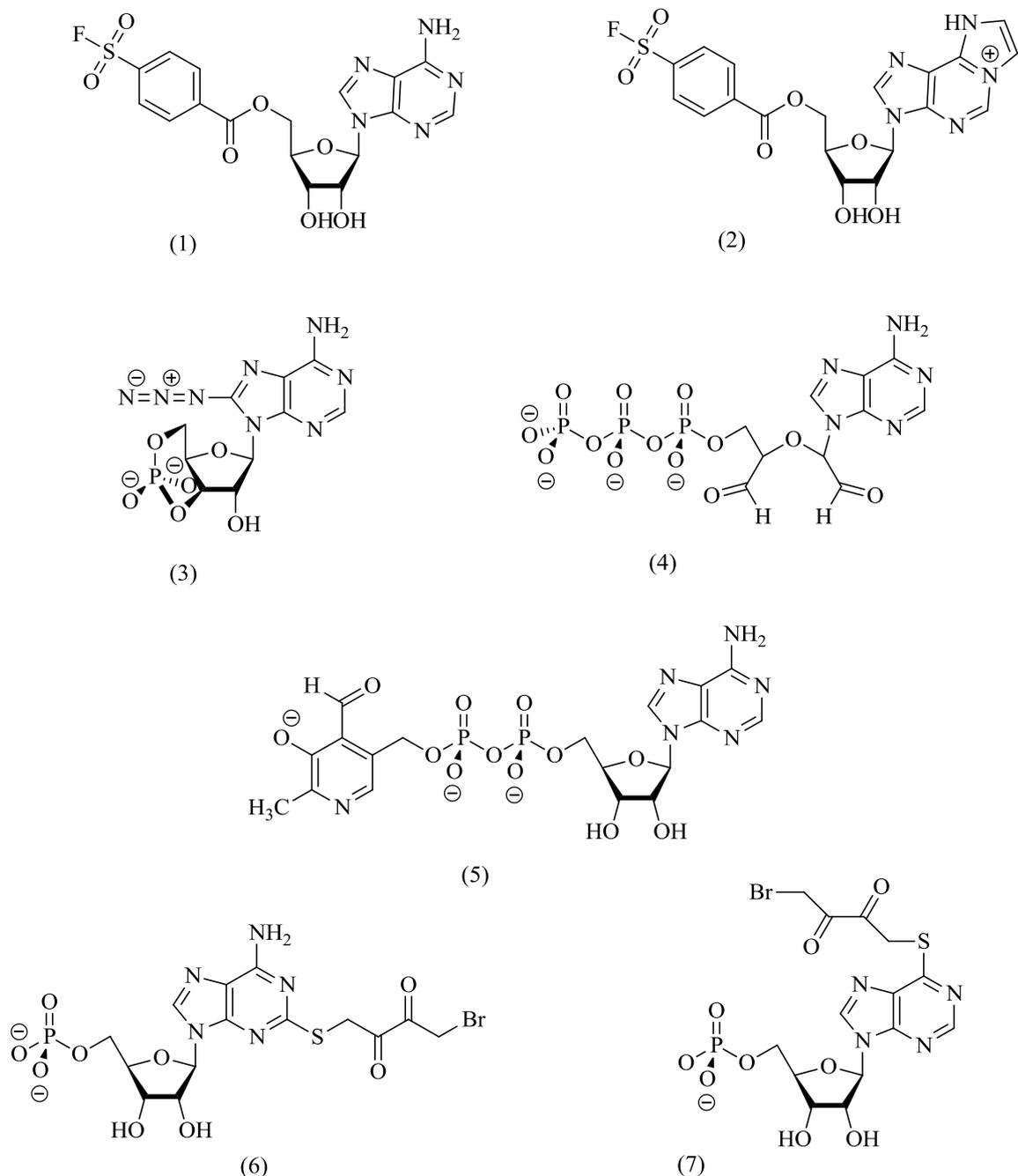


Рисунок 9 – Аналоги на основе АТФ. (1: FSBA, 2: FSB<sub>E</sub>A, 3: 8-азидо-цАМФ, 4: АТФ-диальдегид, 5: PLP-АМФ, 6: 2-BDB-TAMP, 7: 6-BDB-TdaAMP)

Все нуклеотидные аналоги, описанные выше, включают реакционноспособную функциональную группу. Отличительное размещение этих реакционноспособных групп в нуклеотидных структурах этих аналогов дает возможность использовать ряд этих аналогов для «выкладки» ферментных остатков в активном центре связывающего белка нуклеотида (например, киназы). Следует отметить, что хотя эти аналоги полезны для исследований в пробирке, они вряд ли могут быть достаточно эффективными для использования в естественных условиях, поскольку они могут обозначать любой нуклеотид-связывающий белок.

### 1.9. Биофлавоноиды и сопутствующие соединения

Ряд комплексов биофлавоноида (производные флавонов, общая структура которых показана на рис. 10), как сообщают, ингибируют рост опухолевых клеток [68]. Кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) является самым активным проверенным аналогом. Дальнейшие исследования с кверцетином показали, что аналог ингибирует активность киназы  $pp60^{src}$  [69], DMBA-индуцированной опухоли молочной железы крыс [70], и G-тип (второй тип) казеинкиназы [71]. Graziani и коллеги [69] сообщили, что с  $pp60^{src}$  кверцетин имеет значение  $K_i$  равное 6-11 моль в пробирке и является конкурентоспособным по отношению к АТФ. В особенно интересном исследовании, Cochet и соавторы [71] продемонстрировали, что кверцетин является очень мощным конкурентоспособным ингибитором казеинкиназы G-типа, который может использовать и АТФ и ГТФ в качестве доноров фосфорильной группы ( $K_i$  по сравнению с ГТФ равно 0.22 моль). Они также сообщили, что кверцетин не ингибирует ни казеинкиназу A-типа (только АТФ), ни каталитическую субъединицу АМФ-зависимой протеинкиназы. Сообщалось, что  $pp60^{src}$  может использовать и АТФ и ГТФ. О предпочтении нуклеозидтрифосфата тирозинкиназы для опухоли молочной железы крысы не сообщалось, только для использования АТФ. Сообщалось также, что генистеин, изофлавоноид (Рис. 10), ингибирует как  $pp60^{src}$ , так и рецептор эпидермального фактора роста (EGF) для тирозинкиназы [72].

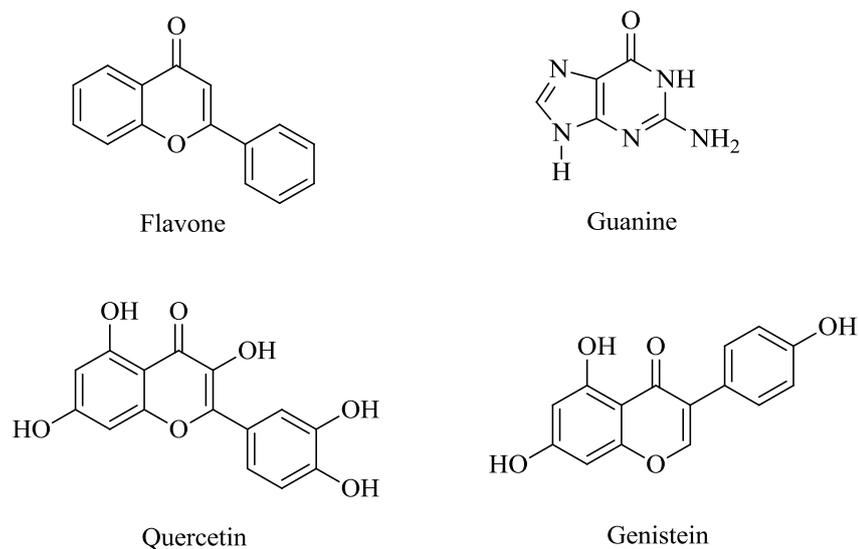
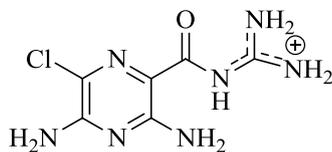


Рисунок 10 - Биофлавоноиды и родственные соединения

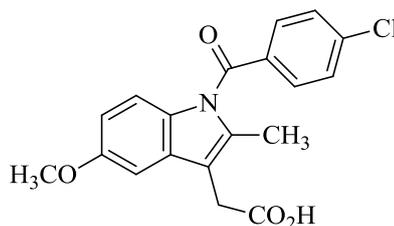
Интригует предположить, что сходство между структурой бициклического ароматического ядра флавиноидов и гуаниновой частью ГТФ (Рис. 10) может быть ответственным за селективное и мощное ингибирование, которое эти соединения проявляют к ГТФ с использованием киназ. Экзоциклический карбонил флавоноидов может имитировать экзоциклический карбонил фрагмента гуанина. Как обсуждалось ранее, центр связывания аденина в киназах может содержать акцептор водородной связи (например, остаток аспартата в аденин-связывающем кармане фосфоглицераткиназы). Те киназы, которые могут использовать как АТФ, так и ГТФ, могут не иметь такого подходящего акцептора водородной связи. Это может объяснять и способность этих киназ использовать нуклеотид и селективное ингибирование этих киназ кверцетином.

Амилорид (Рис. 11) - это калийсберегающее мочегонное средство. Недавнее исследование Ralph и коллег [73] показало, что амилорид ингибирует рост клеток мастоцитомы мыши в культуре. Они также сообщили, что амилорид ингибирует и тип 1 и тип 2 цАМФ-зависимой протеинкиназы, выделенные из тех же клеток. В другом исследовании, Holland и коллеги [74] сообщили, что при концентрации 0.1 моль, амилорид ингибирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, кальмодулин-зависимую гликогенсинтазы киназу, фосфорилазы киназу, гликогенсинтазы киназу-3,

гликогенсинтазу киназы-4, гликогенсинтазы киназу-5, и казеинкиназ-1 (при 1.0 моль). Степень ингибирования варьирует от 40% до 75% контрольной активности. В случае цАМФ-зависимой протеинкиназы, они утверждают, что ингибирование является конкурентоспособным по отношению к АТФ.



Amiloride



Indomethacin

Рисунок 11 – Амилорид и индометацин

Davis и Czech [75] исследовали влияние амилорида на аутофосфорилирование рецептора EGF, рецептора PDGF и рецептора инсулина тирозинкиназ. Было обнаружено, что амилорид ингибирует каждую из этих киназ. В случае очищенного фосфорилирования рецептор EGF гистона H2В амилорида был конкурентным по отношению к АТФ ( $K = 350$  моль).

Эти результаты свидетельствуют о том, что амилорид, в отличие от биофлавиноидного кверцетина, не проявляет селективности для киназ, использующих ГТФ и АТФ. Весьма разумно предположить, что амилорид может связываться и конкурировать со связывающим участком основы нуклеотида.

Индометацин является ингибитором синтеза простагландина, который используется клинически в качестве противовоспалительного средства. Kantor и Hampton [76] установили, что индометацин ингибирует цАМФ-зависимую протеинкиназу. Они сообщили, что  $ID_{50}$  для активности протеинкиназы составляет от 30 до 50 нмоль и что степень ингибирования

зависит от времени предварительной инкубации индометацина с киназой. Эти результаты контрастируют с результатами Goueli и Ahmed [77], которые не обнаружили временной зависимости от ингибирования и что степень ингибирования значима только при концентрациях индометацина более 200 кмоль. Malchoff и сотрудники [78] изучили ингибирование катализируемого инсулиновым рецептором фосфорилирования индометацином. Они сообщили, что 1 моль индометацина ингибирует стимулированное инсулином фосфорилирование гистона H2В частично очищенным инсулиновым рецептором на 35%.

Структура полициклического ароматического соединения индометацина (Рис. 14) предполагает, что она также может взаимодействовать со связывающим участком нуклеотидных оснований этих протеинкиназ.

#### 1.10. Агенты химической модификации

Активные химические вещества использовались для изучения ферментативных механизмов и для изменения ферментативной активности [79]. Если они не будут умышленно включены в аналог субстрата, тем самым создавая аффинную метку на основе оснований, маловероятно, что эти реагенты будут специфичны для рассматриваемого фермента в естественных условиях. Тем не менее, исследования в пробирке с использованием этих реагентов могут предоставить ценную информацию о наличии и активности восприимчивых ферментных остатков, которые либо необходимы для катализа, либо близки к активному центру. Эта информация затем может быть использована для разработки конкретных дизайнов, направленных на активный центр ингибиторов.

Shia и коллеги [80] использовали тиол-модифицирующий реагент *N*-этилмалеимид (Рис. 12-1) для ингибирования рецептора инсулина. Тот же самый реагент использовали Volen и Israel [81] для ингибирования активности противовирусной киназы средней опухолевой антигенности в иммунопреципитатах инфицированных полиомой клеток. Это ингибирование зависит от рН, времени инкубации и концентрации реагента. Защита

нуклеотидов (АТФ, ГТФ, и АДФ) от ингибирования показала, что сульфгидридный реагент находится либо в активном центре, либо вблизи него.

Nelson и Taylor [82] использовали йодуксусную кислоту (Рис. 12-2) и сульфгидридный реагент, чтобы ингибировать цАМФ-зависимую протеинкиназу. Им удалось выделить триптические пептиды, меченные ( $^{14}\text{C}$ ) йодуксусной кислотой и определить, что были изменены два цистеина. Они также обнаружили, что ассоциация регулирующий субъединиц защищает один из цистеинов от модификации, предполагая, что этот остаток находится в области связывания между каталитической и регуляторной субъединицами.

Edinger и Penn [83] обнаружили, что бромфенацилбромид (Рис. 12-3) ингибирует фосфорное соединение в эпидермисе мыши. Это открытие и другие доказательства причастности протеинкиназы-С привели авторов к заключению, что реагент ингибирует протеинкиназу-С.

2,3-Бутандион (Рис. 12-4), как известно, является агентом химической модификации, избирательным для остатков аргинила в белках [84]. Riordan и коллеги [85] использовали 2,3-бутандион для изучения ферментов гликолитического пути. Девять из десяти исследуемых ферментов были инактивированы реагентом. Из этих девяти ферментов четыре были киназами. Severin и сотрудники [86] использовали реагент для инактивирования креатинкиназы. Riordan [84] постулировал, что остатки аргинила были связаны со связыванием отрицательно заряженных субстратов, таких как фосфатные группы.

Puri и соавторы [87] использовали *o*-фталальдегид (Рис. 12-5), чтобы ингибировать цГМФ-зависимую протеинкиназу. Спектроскопические данные показали, что производное изоиндола было образовано после обработки фермента *o*-фталальдегидом. Другие данные свидетельствуют о том, что цистеин и лизин, расположенные проксимально, участвуют в образовании изоиндола.

Madelian и Warren [88] определили, что помощник натрия (Рис. 12-6, примечание: мочевая кислота) инактивирует креатинкиназу. Их данные показывают, что четыре из восьми цистеинов в димере были изменены реагентом.

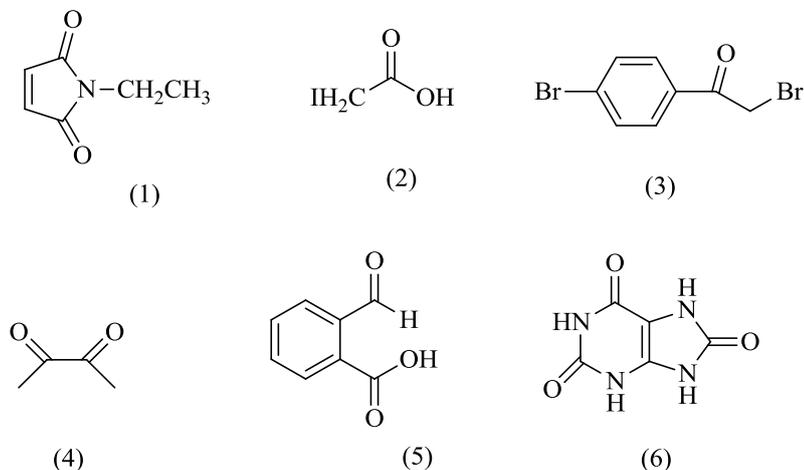


Рисунок 12 – Агенты химической модификации. (1: *N*-этилмалеимид, 2: йодуксусная кислота, 3: бромобензилбромид, 4: 2,3-бутандион, 5: фталальдегид, и 6: мочевая кислота)

Много различных реагентов образования сетчатого полимера (Рис. 13) использовались исследователями, чтобы исследовать составы субъединиц многих белков, включая киназы [89-93]. Изученные киназы включают цАМФ-зависимую протеинкиназу, рецептор инсулина и рецептор фактора роста нервов (NGF).

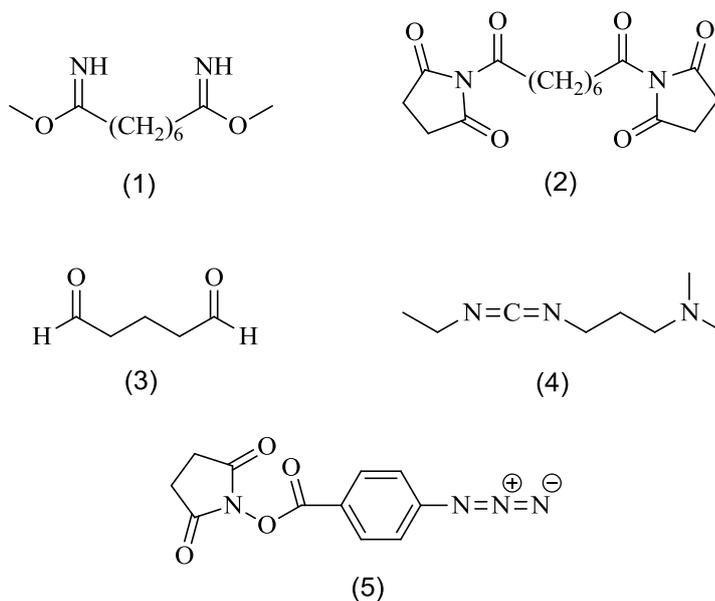


Рисунок 13 - Реагенты образования сетчатого полимера. (1: диметил suberimidate [89], 2: дисукцимидилсуберат [90,91], 3: глутаральдегид [91], 4: 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид [92], 5: гидроксисукцимидил-*p*-фзидобензоат [92,93])

#### 1.11. Различные ингибиторы

Полимиксин-Б представляет собой циклический полипептидный антибиотик, содержащий жирно-ацильный фрагмент. Полимиксина-Б имеет как гидрофильные, так и гидрофобные участки, включенные в молекулу. Считается, что механизм антибиотического действия включает как проникновение в структуру в структуру бактериальных клеточных мембран, так и разрушение их. Этот антибиотик ингибирует кальций-фосфолипид-зависимую протеинкиназу (протеинкиназа-С) [94,95]. Mazzei и коллеги [95] сообщили, что полимиксин-Б конкурентоспособен относительно фосфолипида ( $K_i = 1.8$  моль) и что он также ингибирует кальций-кальмодулин-зависимую протеинкиназу, конкурентоспособную по отношению к кальмодулину ( $K_i = 17$  моль). Stutchfield, Jones, и Howell [96] показали, что полимиксин-Б ингибирует стимулированную форболом и стимулированную глюкозой секрецию инсулина из изолированных островков крысы Лангерганса. Авторы интерпретировали влияние полимиксина-Б на секрецию инсулина за счет ингибирования протеинкиназы-С.

Mazzei и его коллеги [95] предположили, что полимиксин-Б ингибирует протеинкиназу-С, взаимодействуя с гидрофобной областью фермента, которая связана с закреплением фосфолипидов. Этот постулат согласуется с механизмом действия полимиксина-Б в качестве антибиотика.

Кальмодулин является кальцийсвязывающим белком, который служит ко-фактором для ряда ферментов, требующих кальция, включая кальций-кальмодулин-зависимую протеинкиназу. Albert и соавторы [97] изучили влияние кальмодулина на кальций-фосфолипид-зависимую протеинкиназу. Они сообщили, что кальмодулин и некоторые другие связывающие белки

кальция ингибировали стимулированное фосфорилированием кальция и фосфолипидом количество субстратов. Пока не сообщалось ни о каких кинетических значениях, но авторы заявили, что предварительные результаты показали, что увеличение количества субстрата облегчает ингибирование из-за кальмодулина. Это означает, что кальмодулин взаимодействует со связывающим участком субстрата и связывает ионы кальция, требуемые киназой.

Tamura и сотрудники [98] изучили ингибирование процесса фосфорилирования рецептором инсулина на *N*- $\alpha$ -*p*-тозил-*L*-аргинин метилового эфира (ТАМЕ, Рис. 14) и *N*- $\alpha$ -бензол-*L*-аргинин этилового эфира (ВАЕЕ, Рис. 14). Они нашли, что оба эти аргининспецифические ингибиторы протеазы способны ингибировать процесс фосфорилирования. Неизвестно, ингибируют ли молекулы рецептор инсулина напрямую или ингибируют аргининспецифическую протеазу, которая, в свою очередь, активирует рецептор инсулина.

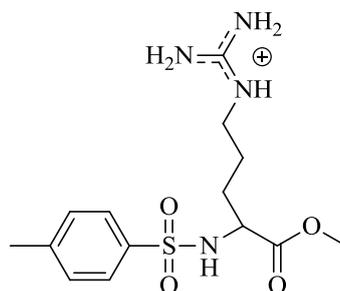
Нафталинсульфонамидное производное W-7 (Рис. 15-1) использовалось Такака и коллегами [99], чтобы изучить и  $\text{Ca}^{+2}$ /кальмодулин-зависимую и  $\text{Ca}^{+2}$ /фосфолипид-зависимую протеинкиназы. Показано, что молекула ингибирует оба фермента конкурентно по отношению к взаимодействию фермента с кальмодулином или фосфолипидом. W-7 проявлял в десять раз больше активность с  $\text{Ca}^{+2}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназой. Оказалось, что ингибитор взаимодействует с кальмодулином или фосфолипидом, предотвращая связь фермента с этими активаторами.

Kase и коллеги [100,101] выделили серию полициклических молекул K-252<sub>a,b,c, и d</sub>, общая структура которых показана на рис. 15-2. Они обнаружили, что эти молекулы были ингибиторами протеинкиназы-С. Самый сильный аналог, K252<sub>a</sub>, имел значение  $\text{IC}_{50} = 32.9$  нмоль. Характер ингибирования не сообщался.

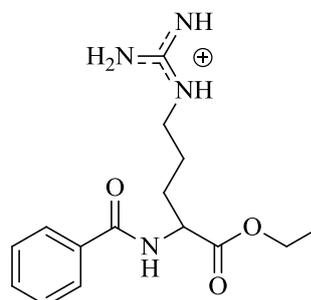
Conner и Russell [102] сообщили, что элементарная сера ( $\text{S}_8$ , Рис. 15-3) была весьма специфическим и мощным ингибитором аденилаткиназы.

Ингибирование было полностью изменено путем обработки дитиотреитолом, но, кажется, он не включает сульфгидрильную модификацию S<sub>8</sub>.

Chegwidden и Watts [103] обнаружили, что эфир салициловой кислоты ингибирует креатинкиназу. Процесс ингибирования был сложным и неконкурентным по отношению к креатину. Авторы утверждают, что салицилат связывался с определенной конформацией фермента в положении, периферическом к активному центру.



N- $\alpha$ -p-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME)



N- $\alpha$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE)

Рисунок 14 - Аргинин-специфические ингибиторы протеазы

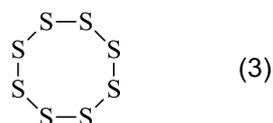
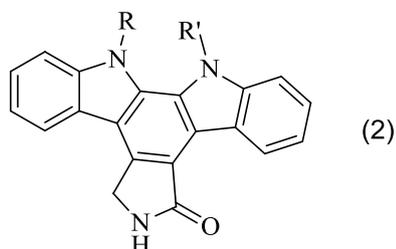
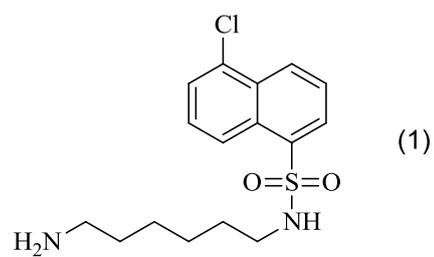


Рисунок 15 – Различные ингибиторы. [1: (6-аминогексил)-5-хлоро-нафталсульфонамид (W-7), 2: К-252<sub>a-d</sub>, 3: элементарная сера (S<sub>8</sub>)]

## 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными объектами исследования стали экспериментальные данные рентгеноструктурного анализа доступные в базе данных Protein Data Bank. Исследовались комплексы белок-лиганд для EGFR киназы содержащей единичные или множественные мутации G719S, L858R, T790M, V924R, E865A, E866A, K867A, T693S, P694T, V948R. Заявленные мутации наблюдались в белках 61 комплексов EGFR-лиганд. В таблице 1 представлены обобщенные данные по исследуемым комплексам.

Таблица 1 –Таблица мутаций

Код	Вещество	Цепи	Длина	Организм	Мутация
2ITN	Phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester	A	327	Homo sapiens	G719S
2ITO	Gefitinib	A	327	Homo sapiens	G719S
2ITP	6-{4-[(4-ethylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}-N-[(1R)-1-phenylethyl]-7H-pyrrolo[2,3-D]pyrimidin-4-amine	A	327	Homo sapiens	G719S
2ITQ	1,2,3,4-Tetrahydrogen Staurosporine	A	327	Homo sapiens	G719S
2ITT	6-{4-[(4-ethylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}-N-[(1R)-1-phenylethyl]-7H-pyrrolo[2,3-D]pyrimidin-4-amine	A	327	Homo sapiens	L858R
2ITU	1,2,3,4-Tetrahydrogen Staurosporine	A	327	Homo sapiens	L858R
2ITV	Phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester	A	327	Homo sapiens	L858R
2ITZ	Gefitinib	A	327	Homo sapiens	L858R
2JIU	6-{4-[(4-ethylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}-N-[(1R)-1-phenylethyl]-7H-pyrrolo[2,3-D]pyrimidin-4-amine	A, B	328	Homo sapiens	T790M
3LZB	N-[3-(5-{2-[(4-morpholin-4-yl)phenyl]amino}pyrimidin-4-yl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-6-yl)phenyl]-2-phenylacetamide	A, B, C, D	327	Homo sapiens	V924R
3UG2	Gefitinib	A	334	Homo sapiens	G719S, T790M
3W2O	N-{2-[4-({3-chloro-4-[3-(trifluoromethyl)phenoxy]phenyl}amino)-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-5-yl]ethyl}-3-hydroxy-3-methylbutanamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R
3W2P	N-{2-[4-({3-chloro-4-[3-(trifluoromethyl)phenoxy]phenyl}amino)-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-5-yl]ethyl}-4-(dimethylamino)butanamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R

3W2Q	N-(4-{{3-chloro-4-(pyridin-2-ylmethoxy)phenyl}amino}-3-cyano-7-ethoxyquinolin-6-yl)-4-(dimethylamino)butanamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R
3W2R	1-{{3-{{2-chloro-4-{{5-{{2-(2-hydroxyethoxy)ethyl}}-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-4-yl}}amino}phenoxy}phenyl}}-3-cyclohexylurea	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R
4G5P	N-{{4-{{(3-chloro-4-fluorophenyl)amino}}-7-{{(3S)- tetrahydrofuran-3-yloxy}quinazolin-6-yl}}-4-(dimethylamino)butanamide	A, B	330	Homo sapiens	T790M
4HJO	[[6,7-bis(2-methoxy-ethoxy)quinazoline-4-yl]-{{3-ethynylphenyl}amine	A	337	Homo sapiens	V924R
4LL0	N-{{4-{{(3-bromophenyl)amino}quinazolin-6-yl}}propanamide	A, B	331	Homo sapiens	T790M, L858R
4LQM	N-{{4-{{(3-bromo-phenylamino)-quinazolin-6-yl}}acrylamide	A	331	Homo sapiens	L858R
4RJ4	N-{{2-{{(4-methoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-4-yl}}-1-{{propan-2-yl}}-2-{{(1H-pyrazol-4-yl)-1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
4RJ5	N-{{2-{{(4-methoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-4-yl}}-2-{{(1H-pyrazol-4-yl)-1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
4RJ6	N-{{2-{{(4-methoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-4-yl}}-2-{{(1H-pyrazol-4-yl)-3H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
4RJ7	2,6-dichloro-N-{{2-{{(2-{{(2S)-1-hydroxypropan-2-yl}amino}}-6-methylpyrimidin-4-yl)amino}pyridin-4-yl}}benzamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
4RJ8	1-cyclopentyl-N-{{2-{{(4-methoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-4-yl}}-1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
4WD5	N-{{2-methyl-5-{{2-oxo-9-{{(1H-pyrazol-4-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin-1(2H)-yl}}phenyl}}propanamide	A, B	331	Homo sapiens	T790M
5C8K	1-cyclopentyl-N-{{2-{{(4-methoxypiperidin-1-yl)pyrimidin-4-yl}}-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A

5C8M	2-methyl-N-{2-[4-(methylsulfonyl)piperidin-1-yl]pyrimidin-4-yl}-1-(propan-2-yl)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5C8N	N-{2-[4-(2-aminoethyl)-4-methoxypiperidin-1-yl]pyrimidin-4-yl}-2-methyl-1-(propan-2-yl)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAL	2,2-dimethyl-3-[(4-{[2-methyl-1-(propan-2-yl)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-yl]amino}pyrimidin-2-yl)amino]propanamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAN	(3R)-3-methyl-1-(4-{[2-methyl-1-(propan-2-yl)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-yl]amino}pyrimidin-2-yl)pyrrolidine-3-carboxamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAO	N~2~-2-methyl-2-(methylsulfonyl)propyl]-N~4~-2-methyl-1-(propan-2-yl)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-yl]pyrimidine-2,4-diamine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAP	2-methyl-N-[2-(2-methyl-2-methylsulfonylpropoxy)pyrimidin-4-yl]-1-propan-2-yl-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAQ	N-[2-[(3R,4S)-3-fluoranyl-4-methoxypiperidin-1-yl]pyrimidin-4-yl]-2-methyl-1-propan-2-yl-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAS	(1R)-1-{6-({2-[(3R,4S)-3-fluoro-4-methoxypiperidin-1-yl]pyrimidin-4-yl}amino)-1-[(2S)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl]-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-2-yl}ethanol	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5CAU	(1R)-1-{6-({2-[(3S,4R)-3-fluoro-4-methoxypiperidin-1-yl]pyrimidin-4-yl}amino)-1-[(2S)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl]-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-2-yl}ethanol	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5D41	Phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester	A, B	331	Homo sapiens	T693S, P694T, T790M, V948R

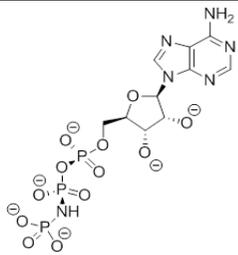
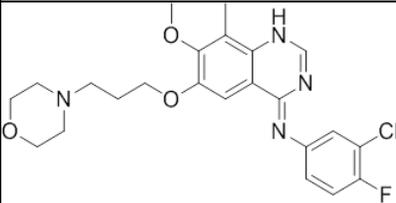
5EDQ	~{N}-(7-chloranyl-1~{H}-indazol-3-yl)-7,7-dimethyl-2-(1~{H}-pyrazol-4-yl)-5~{H}-furo[3,4-d]pyrimidin-4-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5EDR	~{N}-(1~{H}-indazol-3-yl)-7,7-dimethyl-2-(2-methylpyrazol-3-yl)-5~{H}-furo[3,4-d]pyrimidin-4-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5EM5	4-[2-(4-chlorophenyl)ethylamino]~{N}-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]-2-oxidanylidene-1~{H}-pyridine-3-carboxamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5EM6	4-[(2-azanylpyrimidin-4-yl)amino]~{N}-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]-2-oxidanylidene-1~{H}-pyridine-3-carboxamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5EM7	4-[(2-methoxyphenyl)amino]~{N}-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]-2-oxidanylidene-1~{H}-pyridine-3-carboxamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5FEE	~{N}-[7-methyl-1-[(3~{R})-1-propanoylazepan-3-yl]benzimidazol-2-yl]-3-(trifluoromethyl)benzamide	A	328	Homo sapiens	T790M
5FEQ	~{N}-[1-[(3~{R})-1-[4-(dimethylamino)but-2-enoyl]azepan-3-yl]-7-methyl-benzimidazol-2-yl]-2-methyl-pyridine-4-carboxamide	A	328	Homo sapiens	T790M
5GNK	1-[(3R)-3-[4-azanyl-3-[3-chloranyl-4-[(1-methylimidazol-2-yl)methoxy]phenyl]pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]piperidin-1-yl]prop-2-en-1-one	A	297	Homo sapiens	T790M
5HCX	~{N}-[2-(1-cyclopropylsulfonylpyrazol-4-yl)pyrimidin-4-yl]-2-methyl-1-propan-2-yl-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5HCY	6-[[2-(1-cyclopropylsulfonylpyrazol-4-yl)pyrimidin-4-yl]amino]~{N}-(oxan-4-yl)-1-propan-2-yl-pyrrolo[3,2-c]pyridine-3-carboxamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5HCZ	2-[1-[1-[(2~{S})-butan-2-yl]-6-[[2-(1-cyclopropylsulfonylpyrazol-4-yl)pyrimidin-4-yl]amino]pyrazolo[4,3-c]pyridin-3-yl]azetidindiol-3-yl]propan-2-ol	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A

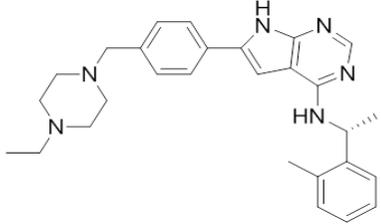
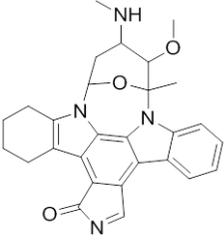
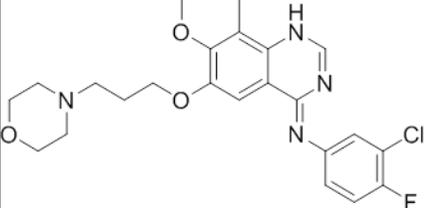
5HG5	N-{3-[(2-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxy]phenyl}prop-2-enamide	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5HG7	1-[(3R,4R)-3-[(5-chloro-2-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxy)methyl]-4-methoxy pyrrolidin-1-yl]propan-1-one	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5HG8	N-[3-[(2-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxy)phenyl]prop-2-enamide	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5HG9	1-[(3R,4R)-3-[(2-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl]oxy)methyl]-4-(trifluoromethyl)pyrrolidin-1-yl]propan-1-one	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5HIB	N-tert-butyl-5-[(1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)sulfonyl]amino}pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5HIC	N-{2-[1-(cyclopropylsulfonyl)-1H-pyrazol-4-yl]pyrimidin-4-yl}-1-(propan-2-yl)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-6-amine	A	331	Homo sapiens	T790M, L858R, E865A, E866A, K867A
5J9Y	(R)-1-(3-(4-amino-3-(naphthalen-1-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one	A	323	Homo sapiens	T790M
5J9Z	(R)-1-(3-(4-amino-3-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl)piperidin-1-yl)prop-2-en-1-one	A	325	Homo sapiens	T790M
5JEB	3-(furan-2-yl)-N-[5-(furan-2-yl)-2-methoxyphenyl]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine	A	337	Homo sapiens	V924R
5U8L	4-[(4-{4-[(3-cyclopropyl-1H-pyrazol-5-yl)amino]-6-[(prop-2-yn-1-yl)carbonyl]pyrimidin-2-yl}piperazin-1-yl)methyl]benzene-1-sulfonyl fluoride	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5UG8	N-[(3R,4R)-4-fluoro-1-{6-[(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-9-(propan-2-yl)-9H-purin-2-yl}pyrrolidin-3-yl]propanamide	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5UG9	N-[(3R,4R)-4-fluoro-1-{6-[(3-methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-9-(propan-2-yl)-9H-purin-2-yl}pyrrolidin-3-yl]propanamide	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5UGA	4-(4-{[2-[(3S)-1-acetylpyrrolidin-3-yl]amino]-9-(propan-2-yl)-9H-purin-6-yl]amino}phenyl)-1-methylpiperazin-1-ium	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R
5UGC	N-[(3R,4R)-4-fluoro-1-{6-[(3-methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino]-9-methyl-9H-purin-2-yl}pyrrolidin-3-yl]propanamide	A	329	Homo sapiens	T790M, L858R, V948R

## Комплекс EGFR(G719S) – лиганд

Среди исследуемых комплексов описано 4 комплекса белка содержащего единичную мутацию (2ITN, 2ITO, 2ITP, 2ITQ) и 1 комплекс белка содержащего множественную мутацию (3UG2). Основные межмолекулярные взаимодействия представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Анализ взаимодействий

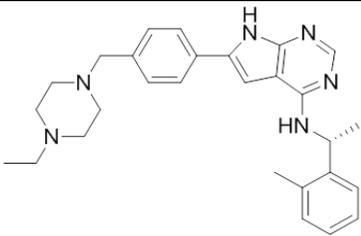
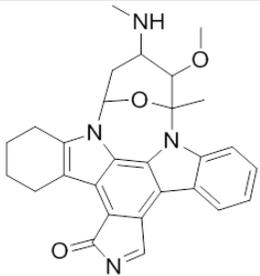
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Attractive Charge	Salt Bridge
2ITN		GLN A:791 THR A:790 MET A:793	SER A:719	VAL A:726	ALA A:743 LEU A:844	MG A:2020 LYS A:745	MG A:2020 LYS A:745
2ITO		MET A:793	SER A:719 GLY A:796 PRO A:794 GLN A:791	LEU A:844	LEU A:788 ALA A:743 LEU A:718	LEU A:788 ALA A:743 LEU A:718	GLU A:762 LYS A:745

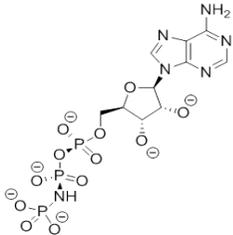
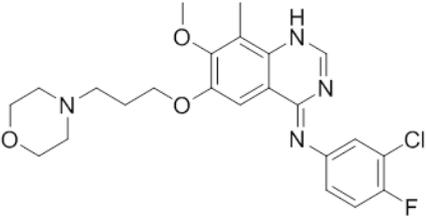
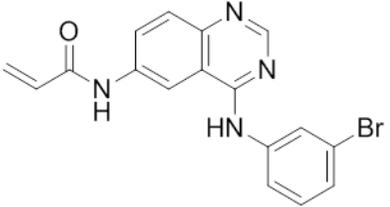
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Cation
2ITP		MET A:793	GLN A:791	THR A:790	LEU A:718 LEU A:844 ALA A:743	LYS A:745
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl
2ITQ		ARG A:841 MET A:793 GLN A:791	ASN A:842 THR A:790	THR A:854 LEU A:844	PHE A:723 LYS A:745 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:718	PHE A:723 LYS A:745 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:718
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Alkyl	Halogen (Cl,Br,I)	
3UG2		MET A:793	SER A:719 PRO A:794 GLN A:791	VAL A:726 LYS A:745 MET A:790 LEU A:844 LEU A:718	LEU A:788 ALA A:743	

### Комплекс EGFR(L858R) – лиганд

Среди исследуемых комплексов описано 5 комплексов белка содержащего единичную мутацию (2ITT, 2ITU, 2ITV, 2ITZ, 4LQM). Основные межмолекулярные взаимодействия представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Анализ взаимодействий

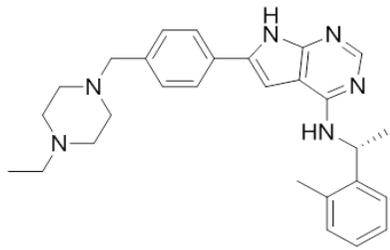
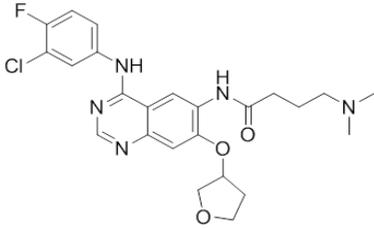
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl
2ITT		MET A:793	GLN A:791	LEU A:844 THR A:790	ALA A:743 LYS A:745 LEU A:718
2ITU		MET A:793	GLY A:719	LEU A:718 LEU A:844 VAL A:726 LYS A:745	LEU A:718 LEU A:844 VAL A:726 LYS A:745

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Alkyl	Attractive Charge			
2ITV		THR A:790 GLN A:791 MET A:793	VAL A:726 ALA A:743 LEU A:844	LYS A:745			
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Fluorine)
2ITZ		MET A:793	LYS A:745 GLN A:791 GLY A:796 PRO A:794 ASP A:800	LEU A:844	VAL A:726 LEU A:788 ALA A:743 LEU A:718	VAL A:726 LEU A:788 ALA A:743 LEU A:718	GLU A:762
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	
4LQM		MET A:793	GLN A:791	LEU A:844	LEU A:718 ALA A:743 LEU A:788 LYS A:745	LEU A:718 ALA A:743 LEU A:788 LYS A:745	

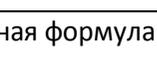
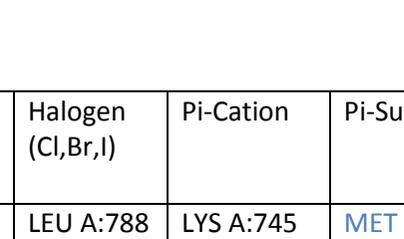
### Комплекс EGFR(T790M) – лиганд

Среди исследуемых комплексов описано 8 комплексов белка содержащего единичную мутацию (2JIU, 4G5P, 4WD5, 5FEE, 5FEQ, 5GNK, 5J9Y, 5J9Z). Основные межмолекулярные взаимодействия представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Анализ взаимодействий

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur		
2JIU		MET A:793	LEU A:844 LEU A:718	ALA A:743 MET A:790 LYS A:745	MET A:766		
4G5P		MET A:793	GLN A:791 LEU A:792 GLY A:796	LEU A:844	LYS A:745 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:718 LEU A:788 MET A:790	LYS A:745 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:718 LEU A:788 MET A:790	GLU A:762

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	van der Waals	Amide-Pi Stacked
4WD5		MET A:793	LEU A:718	LEU A:792 ALA A:743 LEU A:844 VAL A:726	LEU A:792 ALA A:743 LEU A:844 VAL A:726	GLY A:796	PHE A:795
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Covalent Bond	
5FEE		MET A:793 THR A:854 CYS A:797	LEU A:718	ALA A:743 LEU A:844 MET A:790 CYS A:775 ARG A:841 LYS A:745 VAL A:726	ALA A:743 LEU A:844 MET A:790 CYS A:775 ARG A:841 LYS A:745 VAL A:726	CYS A:797	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	
5FEQ		MET A:793	ASP A:800	LEU A:718	MET A:790 LEU A:844 ALA A:743 CYS A:775 VAL A:726	MET A:790 LEU A:844 ALA A:743 CYS A:775 VAL A:726	

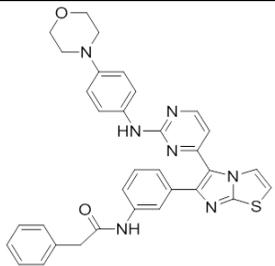
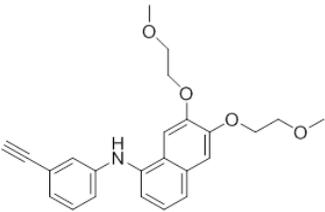
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Cl,Br,I)	Pi-Cation	Pi-Sulfur
5GNK		EDO A:1027 ASP A:855	MET A:793	VAL A:726 LEU A:844 MET A:766	ARG A:841 ALA A:743 CYS A:775	ARG A:841 ALA A:743 CYS A:775	LEU A:788	LYS A:745	MET A:790
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Cation	Pi-Sulfur			
5J9Y		GLN A:791 MET A:793	VAL A:726 ALA A:743 LEU A:844	VAL A:726 ALA A:743 LEU A:844	LYS A:745	MET A:790 MET A:766			
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur			
5J9Z		GLN A:791 MET A:793	ASP A:855 GLU A:762 THR A:854	LEU A:718 ALA A:743 LEU A:844 LYS A:745 VAL A:726 ARG A:841	LEU A:718 ALA A:743 LEU A:844 LYS A:745 VAL A:726 ARG A:841	MET A:790 MET A:766			

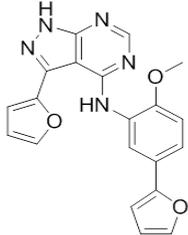
## Комплекс EGFR(V924R) – лиганд

Среди исследуемых комплексов описано 3 комплекса белка содержащего единичную мутацию (3LZB, 4HJO, 5JEB).

Основные межмолекулярные взаимодействия представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Анализ взаимодействий

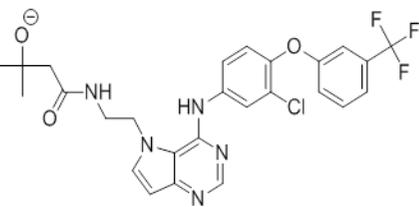
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl
3LZB		GLN B:767				
4HJO		MET A:769	THR A:830 LEU A:764 GLN A:767	THR A:830 LEU A:764 GLN A:767	LEU A:820 LEU A:694	VAL A:702 LYS A:721 ALA A:719

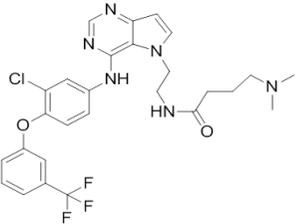
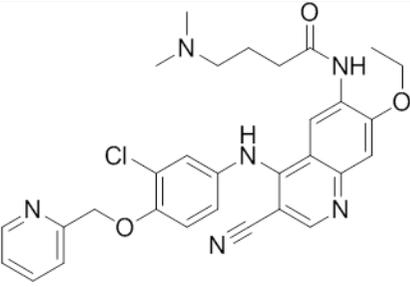
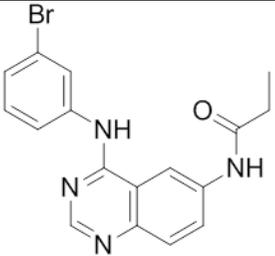
Код	Структурная формула	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Unfavorable Donor-Donor
5JEB		GLN A:767 THR A:830 GLY A:772	GLN A:767 THR A:830 GLY A:772	LEU A:820	ALA A:719 LEU A:768 LEU A:694 CYS A:773 LYS A:721 LEU A:764 MET A:742 VAL A:702	ALA A:719 LEU A:768 LEU A:694 CYS A:773 LYS A:721 LEU A:764 MET A:742 VAL A:702	MET A:769

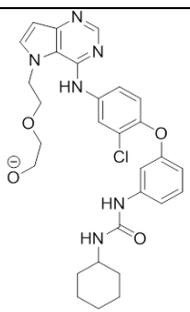
### Комплекс EGFR(T790M, L858R) – лиганд

Среди исследуемых комплексов описано 5 комплексов белка содержащего множественную мутацию (3W2O, 3W2P, 3W2Q, 3W2R, 4LL0). Основные межмолекулярные взаимодействия представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Анализ взаимодействий

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Cl,Br,I)	Halogen (Fluorine)	Pi-Sulfur
3W2O		MET A:793 LYS A:745	GLN A:791	LEU A:718	ALA A:743 LEU A:844 VAL A:726 ILE A:759	ALA A:743 LEU A:844 VAL A:726 ILE A:759	LEU A:788 GLU A:762	LEU A:788 GLU A:762	MET A:790 MET A:766

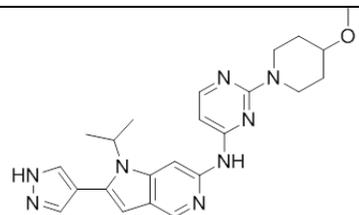
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Halogen (Cl,Br,I)	Pi-Sulfur	
3W2P		MET A:793	GLN A:791 GLY A:796 ARG A:841	LEU A:718	ILE A:759 ALA A:743 LEU A:844 LYS A:745 VAL A:726	LEU A:788	MET A:790 MET A:766	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur	Pi-Anion
3W2Q		MET A:793	ASP A:800 GLY A:796 GLN A:791	LEU A:844	ALA A:763 MET A:766 LEU A:788 LYS A:745 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:718	ALA A:763 MET A:766 LEU A:788 LYS A:745 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:718	MET A:790	GLU A:762
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl			
4LLO		MET A:793	LEU A:844 VAL A:726	LEU A:792 LEU A:718 LEU A:788 ALA A:743 MET A:790 LYS A:745	LEU A:792 LEU A:718 LEU A:788 ALA A:743 MET A:790 LYS A:745			

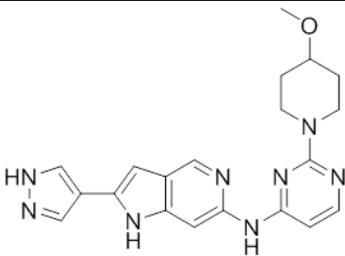
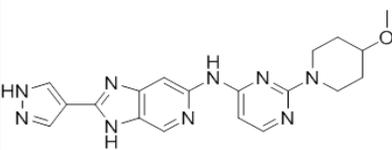
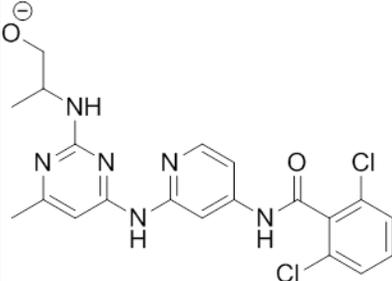
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Pi T-shaped	Pi-Pi Stacked	Pi-Sulfur	Pi-Anion
3W2R		MET A:793 LYS A:745	GLN A:791 ARG A:841 THR A:854 ASN A:842	GLN A:791 ARG A:841 THR A:854 ASN A:842	LEU A:844 MET A:790 VAL A:726	LEU A:747 ILE A:759 ARG A:858 PHE A:723 ALA A:743 LEU A:718	LEU A:747 ILE A:759 ARG A:858 PHE A:723 ALA A:743 LEU A:718	PHE A:997 PHE A:856	PHE A:997 PHE A:856	CYS A:775 MET A:766	ASP A:855

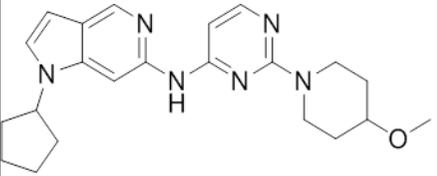
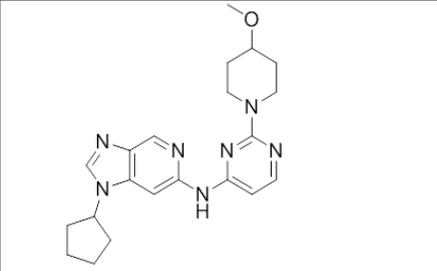
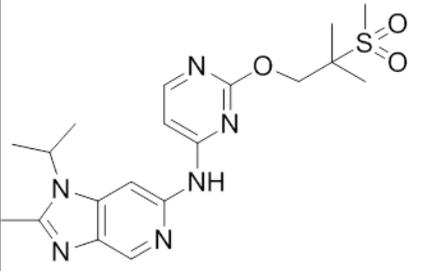
### Прочие комплексы EGFR – лиганд

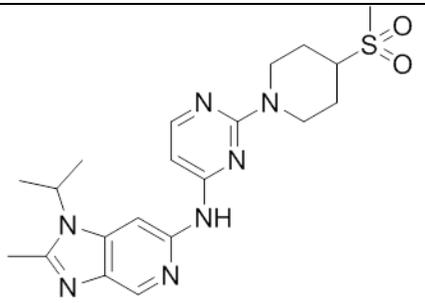
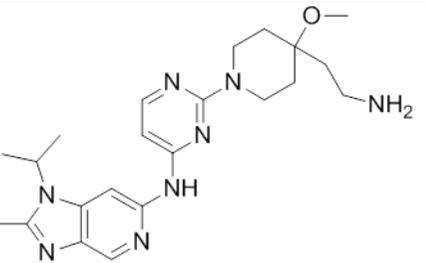
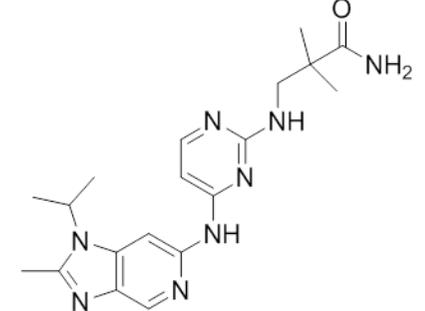
В таблице 7 представлены данные по основным межмолекулярным взаимодействиям с EGFR-киназами содержащими множественные мутации (три и более).

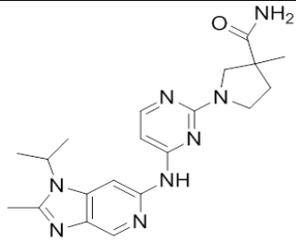
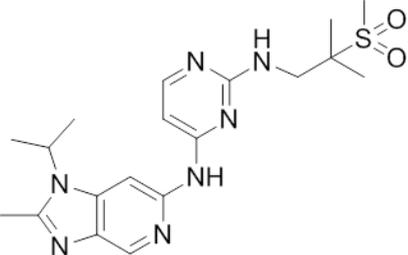
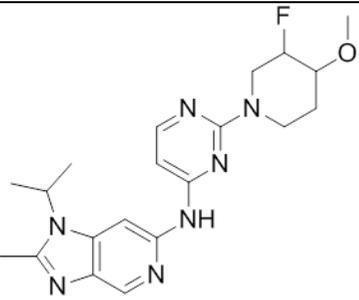
Таблица 7 – Анализ взаимодействий

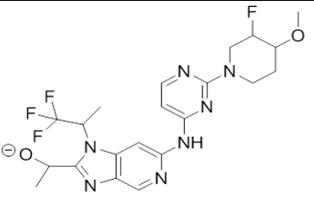
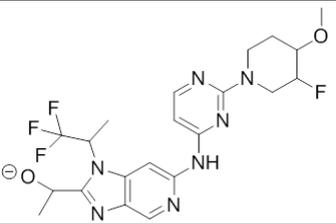
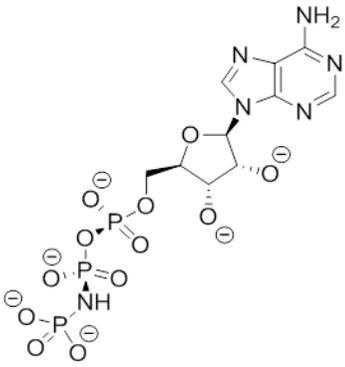
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl
4RJ4		MET A:793 GLN A:791 THR A:854	LEU A:844 MET A:790	LEU A:718 ALA A:743 VAL A:726 CYS A:775 LYS A:745	LEU A:718 ALA A:743 VAL A:726 CYS A:775 LYS A:745

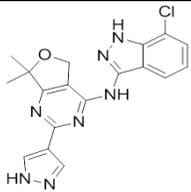
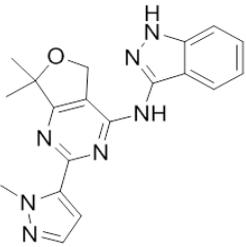
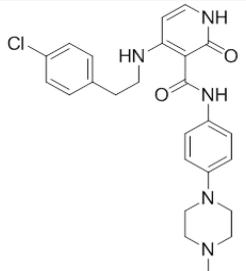
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Unfavorable Donor-Donor	
4RJ5		MET A:793	GLN A:791 THR A:854	LEU A:844 MET A:790	ALA A:743 LEU A:718	LYS A:745	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Anion
4RJ6		MET A:793 GLU A:762 LYS A:745	THR A:854 LEU A:718 SER A:720	LEU A:844	ALA A:743 MET A:790 VAL A:726	ALA A:743 MET A:790 VAL A:726	ASP A:855
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	
4RJ7		MET A:793	GLN A:791	LEU A:844 LEU A:718	LYS A:745 VAL A:726 PHE A:723 ALA A:743	LYS A:745 VAL A:726 PHE A:723 ALA A:743	

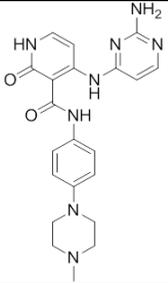
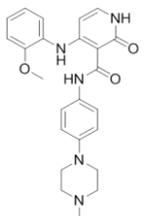
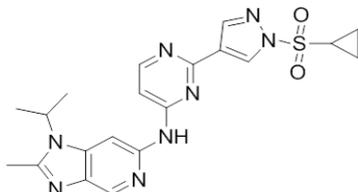
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl
4RJ8		THR A:854 GLN A:791 MET A:793	ASP A:855	MET A:790 LEU A:844	LYS A:745 CYS A:775 ALA A:743 LEU A:718 VAL A:726	LYS A:745 CYS A:775 ALA A:743 LEU A:718 VAL A:726
5C8K		THR A:854 GLN A:791 MET A:793	ASP A:855	MET A:790	LYS A:745 CYS A:775 ALA A:743 LEU A:718 VAL A:726 LEU A:844	LYS A:745 CYS A:775 ALA A:743 LEU A:718 VAL A:726 LEU A:844
5CAP		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 LYS A:745	PHE A:723 VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775	PHE A:723 VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775	MET A:790	

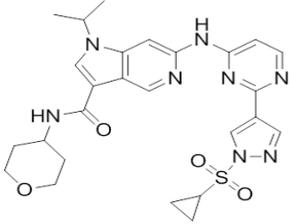
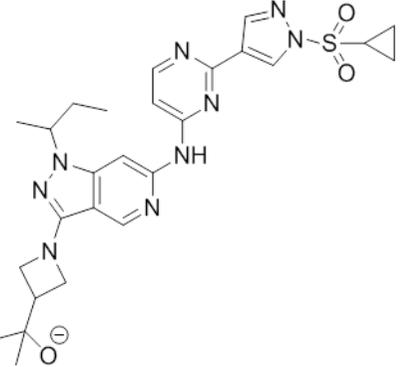
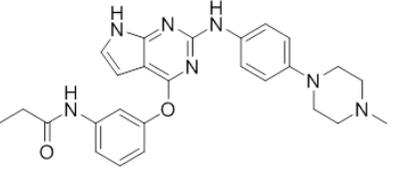
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl
5C8M		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 LYS A:745	MET A:790 PHE A:723	LEU A:718 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775	LEU A:718 VAL A:726 ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775
5C8N		MET A:793 GLN A:791 THR A:854 ASP A:855 LYS A:745	PHE A:723 MET A:790 LEU A:844	VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775	VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775
5CAL		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 ASN A:842	PHE A:723 MET A:790 LEU A:844 LEU A:718	VAL A:726 LYS A:745 ALA A:743 CYS A:775	VAL A:726 LYS A:745 ALA A:743 CYS A:775

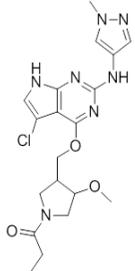
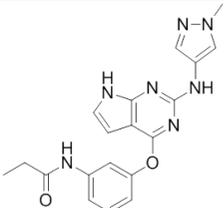
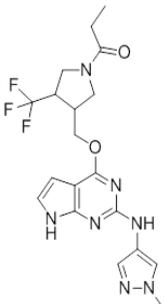
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl			
5CAN		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 ASP A:855	MET A:790 LEU A:844	LEU A:718 VAL A:726 LYS A:745 ALA A:743 CYS A:775	LEU A:718 VAL A:726 LYS A:745 ALA A:743 CYS A:775			
5CAO		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 LYS A:745	MET A:790 PHE A:723	LEU A:718 VAL A:726 LEU A:844 ALA A:743 CYS A:775	LEU A:718 VAL A:726 LEU A:844 ALA A:743 CYS A:775			
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Fluorine)	Pi-Sulfur
5CAQ		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 LYS A:745	ASP A:855	LEU A:844	VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775	VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775	GLU A:762	MET A:790

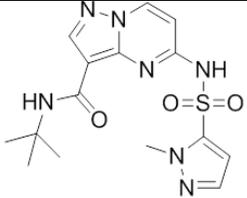
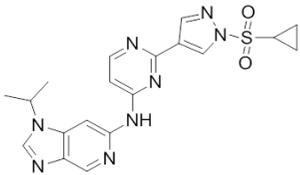
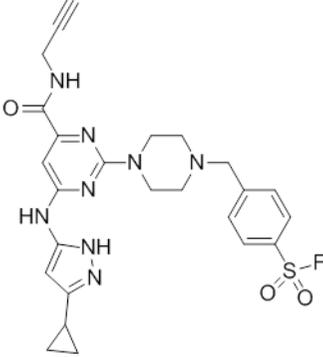
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Fluorine)	
5CAS		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 LYS A:745	MET A:790 LEU A:844	ALA A:743 CYS A:775	ALA A:743 CYS A:775	GLU A:762 LEU A:718	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Fluorine)
5CAU		THR A:854 GLN A:791 MET A:793 LYS A:745	ASP A:855	MET A:790 LEU A:844	ALA A:743 CYS A:775	ALA A:743 CYS A:775	LEU A:718
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	Attractive Charge	Pi-Sulfur	Unfavorable Acceptor-Acceptor
5D41		CYS A:797 ALA A:722 MET A:793 GLN A:791	VAL A:726	LEU A:844 LEU A:718 ALA A:743	ARG A:841 MG A:1101 LYS A:745	MET A:790	ASP A:837

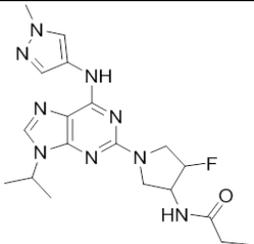
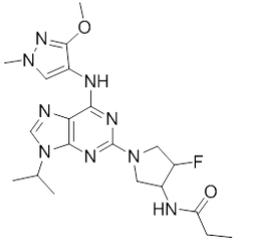
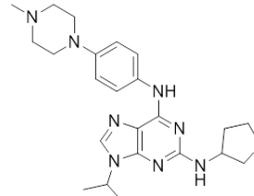
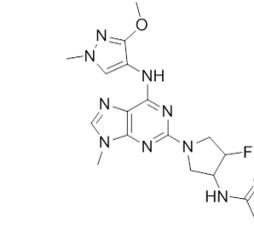
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Cl,Br,I)	Pi-Cation	Pi-Sulfur
5EDQ		MET A:793 GLN A:791 GLU A:762	VAL A:726	LEU A:718 LEU A:844 LEU A:777 LEU A:788 ALA A:743	LEU A:718 LEU A:844 LEU A:777 LEU A:788 ALA A:743	MET A:766	LYS A:745	MET A:790
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Cation	
5EDR		MET A:793 GLU A:762	GLN A:791	MET A:790 VAL A:726 LEU A:844	ALA A:743 LEU A:718	ALA A:743 LEU A:718	LYS A:745	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Cl,Br,I)	Pi-Sulfur
5EM5		MET A:793 GLN A:791	GLU A:804 PHE A:795	LEU A:718 LEU A:844	VAL A:726 LYS A:745 ALA A:743	VAL A:726 LYS A:745 ALA A:743	LEU A:788	MET A:790

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl
5EM6		MET A:793 GLN A:791 MET A:790 GLU A:762 LYS A:745	LEU A:718 THR A:854	LEU A:718 THR A:854	LEU A:844	CYS A:775 ALA A:743
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Pi-Alkyl	van der Waals
5EM7		GLN A:791 MET A:793	THR A:854 GLU A:804	LEU A:844	LEU A:718 MET A:790 ALA A:743 VAL A:726	ARG A:841
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl
5HCX		MET A:793 GLN A:791 THR A:854 LYS A:745	GLY A:796	LEU A:718 MET A:790	ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775 PHE A:723 VAL A:726 CYS A:797	ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775 PHE A:723 VAL A:726 CYS A:797

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur
5HCY		MET A:793 GLN A:791 THR A:854 LYS A:745	MET A:790	PHE A:723 VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775	PHE A:723 VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743 LEU A:844 CYS A:775	
5HCZ		MET A:793 GLN A:791 THR A:854 LYS A:745	MET A:790 LEU A:844 LEU A:718	VAL A:726 CYS A:797 ALA A:743 CYS A:775	VAL A:726 CYS A:797 ALA A:743 CYS A:775	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur
5HG5		MET A:793	LEU A:844	VAL A:726 ALA A:743 CYS A:775 LEU A:718 LEU A:799 ARG A:841	VAL A:726 ALA A:743 CYS A:775 LEU A:718 LEU A:799 ARG A:841	MET A:790

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur	
5HG7		MET A:793	PRO A:794	LEU A:844	LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 VAL A:726 PHE A:856 ARG A:841 LEU A:799	LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 VAL A:726 PHE A:856 ARG A:841 LEU A:799	MET A:790	
5HG8		MET A:793	PRO A:794	LEU A:844	LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 VAL A:726 LEU A:799 ARG A:841	LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 VAL A:726 LEU A:799 ARG A:841	MET A:790	
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Fluorine)	Pi-Sulfur
5HG9		MET A:793 SER A:720	PRO A:794 LEU A:718	LEU A:844	CYS A:775 VAL A:726 ALA A:743 PHE A:723 PHE A:856 ARG A:841 LEU A:799	CYS A:775 VAL A:726 ALA A:743 PHE A:723 PHE A:856 ARG A:841 LEU A:799	GLY A:719	MET A:790

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Alkyl	Pi-Sulfur	Pi-Anion	Unfavorable Donor-Donor			
5H1B		MET A:790 LYS A:745	GLN A:791 ARG A:841	ALA A:743 VAL A:726 LEU A:844	CYS A:775	ASP A:855	MET A:793			
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl					
5H1C		MET A:793 GLN A:791 THR A:854 LYS A:745	LEU A:718 LEU A:844 MET A:790	ALA A:743 CYS A:775 PHE A:723 VAL A:726	ALA A:743 CYS A:775 PHE A:723 VAL A:726					
Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Pi-Pi Stacked	van der Waals	Amide-Pi Stacked	Unfavorable Acceptor-Acceptor
5U8L		MET A:793 GLY A:724 PHE A:723	LEU A:718	LEU A:844	CYS A:775 LEU A:792 MET A:790 ALA A:743 VAL A:726	CYS A:775 LEU A:792 MET A:790 ALA A:743 VAL A:726	PHE A:856 SER A:720	GLY A:721	PHE A:856 SER A:720	GLN A:791

Код	Структурная формула	Conventional Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	Pi-Sigma	Alkyl	Pi-Alkyl	Halogen (Fluorine)
5UG8		MET A:793	GLN A:791 PRO A:794	LEU A:718 LEU A:844	ARG A:841 LEU A:799 LYS A:745 VAL A:726 MET A:790 CYS A:775 ALA A:743	ARG A:841 LEU A:799 LYS A:745 VAL A:726 MET A:790 CYS A:775 ALA A:743	GLY A:719
5UG9		MET A:793	GLN A:791	LEU A:844	LEU A:799 ARG A:841 LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 MET A:790 VAL A:726	LEU A:799 ARG A:841 LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 MET A:790 VAL A:726	GLY A:719
5UGA		MET A:793	GLN A:791	LEU A:844	LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 MET A:790 VAL A:726	LEU A:718 ALA A:743 CYS A:775 MET A:790 VAL A:726	
5UGC		MET A:793	GLN A:791	LEU A:844	ARG A:841 LEU A:799 VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743	ARG A:841 LEU A:799 VAL A:726 LEU A:718 ALA A:743	GLY A:719

### **3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

#### **Данные рентгеноструктурного анализа комплексов белок лиганд**

Рентгеноструктурные данные были получены из базы данных PDB (Protein Data Bank) для EGFR киназы, содержащие следующие единичные или множественные мутации: G719S, L858R, T790M, V924R, E865A, E866A, K867A, T693S, P694T, V948R. Коды исследуемых соединений: 2ITN, 2ITO, 2ITP, 2ITQ, 2ITT, 2ITU, 2ITV, 2ITZ, 2JIU, 3LZB, 3UG2, 3W2O, 3W2P, 3W2Q, 3W2R, 4G5P, 4HJO, 4LL0, 4LQM, 4RJ4, 4RJ5, 4RJ6, 4RJ7, 4RJ8, 4WD5, 5C8K, 5C8M, 5C8N, 5CAL, 5CAN, 5CAO, 5CAP, 5CAQ, 5CAS, 5CAU, 5D41, 5EDQ, 5EDR, 5EM5, 5EM6, 5EM7, 5FEE, 5FEQ, 5GNK, 5HCX, 5HCY, 5HCZ, 5HG5, 5HG7, 5HG8, 5HG9, 5HIB, 5HIC, 5J9Y, 5J9Z, 5JEB, 5U8L, 5UG8, 5UG9, 5UGA, 5UGC.

#### **Анализ межмолекулярных взаимодействий**

Анализ и визуализацию межмолекулярных взаимодействий лиганд – белок производили в программном пакете DiscoveryStudio с применением стандартных инструментов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

1. Проведен детальный анализ экспериментальных данных рентгеноструктурного анализа комплексов белок – лиганд, где в качестве белка выступали различные мутантные формы киназы семейства рецепторов эпидермального фактора роста (содержащие следующие единичные или множественные мутации: G719S, L858R, T790M, V924R, E865A, E866A, K867A, T693S, P694T, V948R).

2. Для исследованных комплексов установлены основные особенности межмолекулярного взаимодействия лиганда с белком, определены ключевые аминокислотные остатки участвующие в связывании лиганда в активном сайте киназного домена рецептора эпидермального фактора роста.

3. Полученные данные имеют большое значение для дальнейшего конструирования высокоаффинных ингибиторов мутантных форм киназ семейства рецепторов эпидермального фактора роста.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schulz G. Amino acids / G. Schulz, R. Schirmer // Principles of Protein Structure – 1 (1979). – P. 1-16.
2. Lehninger A. Biochemistry and molecular biology education / A. Lehninger // Principles of Biochemistry – 11 (1983). – P. 41-42.
3. Miller R. Second messengers, phosphorylation and neurotransmitter release / R. Miller // Trends in Neurosciences – 8 (1985). – P. 463-465
4. Levitan. E. Phosphorylation of ion channels / E. Levitan // Journal of Membrane Biology – 87 (1985). – P. 177-190.
5. Cohen P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity / P. Cohen // Nature – 296 (1982). – P. 613-620.
6. Kaczmarek L. Phorbol esters, protein phosphorylation and the regulation of neuronal ion channels / L. Kaczmarek // Experimental Biology – 124 (1986). – P. 375-392
7. Schlichter D. On the Role of Protein Kinase Subunits in the Control of Eukaryotic Gene Expression / D. Schlichter, H. Miller, W. Wicks // Journal of cyclic nucleotide and protein phosphorylation research – 11 (1986). – P. 149-154
8. The role of protein phosphorylation at tyrosine in transformation and mitogenesis / G. Martin [и др.] // Journal of Cellular Physiology – 121 (1984). – P. 139-149
9. Hunter T. Protein-Tyrosine Kinases / T. Hunter, J. Cooper // Annual Review Biochemistry – 54 (1985). – P. 897-930
10. Schacter E. Regulation through phosphorylation/dephosphorylation cascade systems / E. Schacter, P. Chock, E. Stadtman // Journal of Biological Chemistry – 259 (1984). – P. 12252-12259
11. Schacter E. Energy consumption in a cyclic phosphorylation/dephosphorylation cascade / E. Schacter, P. Chock, E. Stadtman // Journal of Biological Chemistry – 259 (1984). – P. 12260-12264

12. New Histone Kinases in Nuclei of Rat Tissues / D. Smith [и др.] // Nature – 246 (1973). – P. 103-104
13. Characterization of protein kinases forming acid-labile histone phosphates in Walker-256 carcinosarcoma cell nuclei / D. Smith [и др.] // Biochemistry – 13 (1974). – P. 3780-3784
14. Occurrence and distribution of acid-labile histone phosphates in regenerating rat liver / C. Chen [и др.] // Biochemistry – 13 (1974). – P. 3785-3789
15. Krebs E. Historical Perspectives on Protein Phosphorylation and a Classification System for Protein Kinases / E. Krebs // Philosophical Transactions of the Royal Society of London – 302 (1983). – P. 3-11
16. Knowles J. Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions / J. Knowles // Annual Review Biochemistry – 49 (1980). – P. 877-919
17. Friedman J. The quest for free metaphosphate in solution: racemization at phosphorus in the transfer of the phospho group from phenyl phosphate to tert-butyl alcohol in acetonitrile / J. Friedman J. Knowles // Journal of the American Chemical Society – 107 (1985). – P. 6126-6127
18. Structures of manganese(II) complexes with ATP, ADP, and phosphocreatine in the reactive central complexes with creatine kinase: electron paramagnetic resonance studies with oxygen-17-labeled ligands / T. Leyh [и др.] // Biochemistry – 24 (1985). – P. 308-316
19. Reed G. Creatine Kinase: Structure-Activity Relationships / G. Reed, G. Kenyon // Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology – 54 (1983). – P. 367-426
20. The stereochemical configuration of Mn(II) . ADP at the active site of creatine kinase elucidated by electron paramagnetic resonance with R<sub>p</sub> [alpha-170]ADP and S<sub>p</sub> [alpha-170]ADP / T. Leyh [и др.] // Journal of Biological Chemistry – 257 (1982). – P. 15047-15053
21. Hansen D. The stereochemical course of the reaction catalyzed by creatine kinase / D. Hansen, J. Knowles // Journal of Biological Chemistry – 256 (1981). – P. 5967-5969

22. Nuclear magnetic resonance studies of the role of histidine residues at the active site of rabbit muscle creatine kinase / P. Rosevear [и др.] // *Biochemistry* – 20 (1981). – P. 6155-6164
23. Borders Jr C. Essential arginyl residue at the nucleotide binding site of creatine kinase / C. Borders Jr., J. Riordan // *Biochemistry* – 14 (1975). – P. 4699-4704
24. James T. The Role of the Lysyl Residue at the Active Site of Creatine Kinase / T. James, M. Cohn // *Journal of Biological Chemistry* – 249 (1974). – P. 2599-2604
25. Creatine kinase. Nuclear magnetic resonance and fluorescence evidence for interaction of adenosine 5'-diphosphate with aromatic residue(s) / M. Vasek [и др.] // *Biochemistry* – 18 (1979). – P. 5050-5055
26. Cook P. Use of pH studies to elucidate the catalytic mechanism of rabbit muscle creatine kinase / P. Cook, G. Kenyon, W. Cleland // *Biochemistry* – 20 (1981). – P. 1204-1210
27. Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit / P. Cook [и др.] // *Biochemistry* – 21 (1982). – P. 5794-5799
28. Whitehouse S. Mg X ATP2-dependent interaction of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase with the catalytic subunit / S. Whitehouse, D. Walsh // *Journal of Biological Chemistry* – 258 (1983). – P. 3682-3692
29. Studies on the kinetic mechanism of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase / S. Whitehouse [и др.] // *Journal of Biological Chemistry* – 258 (1983). – P. 3693-3701
30. Wong T. Kinetics and mechanism of angiotensin phosphorylation by the transforming gene product of Rous sarcoma virus / T. Wong, A. Goldberg // *Journal of Biological Chemistry* – 259 (1984). – P. 3127-3131
31. Santi D. Approaches to the Rational Design of Enzyme Inhibitors / D. Santi, G. Kenyon // *Burger's Medicinal Chemistry* – 1 (1980). – P. 349-352
32. Stark G. Design and use of potent, specific enzyme inhibitors / G. Stark, P. Bartlett // *Pharmacology and Therapeutics* – 23 (1983). – P. 45-78

33. Wolfenden R. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions / R. Wolfenden // *Accounts of Chemical Research* – 5 (1972). – P. 10-18
34. Lienhard G. P<sup>1</sup>, P<sup>5</sup>-Di(adenosine-5')pentaphosphate, a Potent Multisubstrate Inhibitor of Adenylate Kinase / G. Lienhard, I. Secemski // *Journal of Biological Chemistry* – 248 (1973). – P. 1121-1123
35. Collins K. Aspartate Transcarbamylase / K. Collins, G. Stark // *Journal of Biological Chemistry* – 246 (1971). – P. 6599-6605
36. Marletta M. Affinity labeling of creatine kinase by *N*-(2,3-epoxypropyl)-*N*-amidinoglycine / M. Marletta, G. Kenyon // *Journal of Biological Chemistry* – 254 (1979). – P. 1879-1886
37. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy / F. Kahan [и др.] // *American Chemical Society* – (1975). – P. 100-103
38. Kemp B. Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase / B. Kemp, E. Benjamini, E. Krebs // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* – 73 (1976). – P. 1038-1042
39. Wong T. Synthetic peptide fragment of src gene product inhibits the src protein kinase and crossreacts immunologically with avian onc kinases and cellular phosphoproteins / T. Wong, A. Goldberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* – 78 (1981). – P. 7412-7416
40. A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase / H. Cheng [и др.] // *Journal of Biological Chemistry* – 261 (1986). – P. 989-992
41. Differential and common recognition of the catalytic sites of the cGMP-dependent and cAMP-dependent protein kinases by inhibitory peptides derived from the heat-stable inhibitor protein / D. Glass [и др.] // *Journal of Biological Chemistry* – 261 (1986). – P. 12166-12171
42. Polyglutamyl peptides: a new class of inhibitors of type-2 casein kinases / F. Meggio [др.] // *FEBS* – 162 (1983). – P. 235-238

43. Braun S. Synthetic tyrosine polymers as substrates and inhibitors of tyrosine-specific protein kinases / S. Braun, W. Raymond, E. Racker // *Journal of Biological Chemistry* – 259 (1984). – P. 2051-2954
44. Cobra polypeptide cytotoxin I and marine worm polypeptide cytotoxin A-IV are potent and selective inhibitors of phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase / J. Kuo [и др.] // *FEBS Letters* – 153 (1983). – P. 183-186
45. Bishop W. Attenuation of sn-1,2-diacylglycerol second messengers by diacylglycerol kinase. Inhibition by diacylglycerol analogs in vitro and in human platelets / W. Bishop, B. Ganong, R. Bell // *Journal of Biological Chemistry* – 261 (1986). – P. 6993-7000
46. 1-thioglycerol: Inhibitor of glycerol kinase activity in vitro and in situ / W. Seltzer [и др.] // *Life Science* – 39 (1986). – P. 1417-1424
47. Lee M. Guanosine thiophosphate derivatives as substrate analogs for phosphoenolpyruvate carboxykinase / M. Lee, R. Goody, T. Nowak // *Biochemistry* – 24 (1985). – P. 7594-7602
48. Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine triphosphate. Effects on primer-template function / D. Derse [и др.] // *Journal of Biological Chemistry* – 256 (1981). – P. 11447-11451
49. Metabolism of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, a new anti-herpes virus compound, in herpes simplex virus-infected cells / Y. Cheng [и др.] // *Journal of Biological Chemistry* – 258 (1983). – P. 12460-12464
50. Boehme R. Phosphorylation of the antiviral precursor 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine monophosphate by guanylate kinase isozymes / R. Boehme // *Journal of Biological Chemistry* – 259 (1984). – P. 12346-12349
51. Hurley M. Regulation of deoxyadenosine and nucleoside analog phosphorylation by human placental adenosine kinase / M. Hurley, B. Lin, H. Fox // *Journal of Biological Chemistry* – 260 (1985). – P. 15675-15681

52. Kerry J. Purification and Characterization of Pyridoxal Kinase From Human Erythrocytes / J. Kerry, F. Kwok // Preparative Biochemistry – 16 (1986). – P. 199-216
53. Hampton A. Species- or isozyme-specific enzyme inhibitors. Design of a two-site inhibitor of adenylate kinase with isozyme selectivity / A. Hampton, F. Kappler, D. Picker // Journal of Medicinal Chemistry – 25 (1982). – P. 638-644
54. Species- and isozyme-specific enzyme inhibitors. Synthesis and evaluation of two-substrate condensation products as inhibitors of hexokinases and thymidine kinases / A. Hampton [и др.] // Journal of Medicinal Chemistry – 25 (1982). – P. 801-805
55. Homogeneous uridine kinase from Ehrlich ascites tumor: substrate specificity and inhibition by bisubstrate analogs / N. Cheng [и др.] // Molecular Pharmacology – 30 (1986). – P. 159-163
56. Bone R. Inhibition of adenosine and thymidylate kinases by bisubstrate analogs / R. Bone, Y. Cheng, R. Wolfenden // Journal of Biological Chemistry – 261 (1986). – P. 16410-16413
57. Maness P.  $P^1, P^4$ -di(adenosine-5')tetraphosphate inhibits phosphorylation of immunoglobulin G by Rous sarcoma virus pp60<sup>src</sup> / P. Maness, M. Perry, B. Levy // Journal of Biological Chemistry – 258 (1983). – P. 4055-4058
58. Differential inhibition of cellular and viral pp60<sup>src</sup> kinase by  $P^1, P^4$ -di(adenosine-5')tetraphosphate / B. Levy [и др.] // Molecular and Cellular Biology – 3 (1983). – P. 1718-1723
59. Inhibition of the transformation-specific kinase in ASV-transformed cells by *N*- $\alpha$ -tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone / N. Richert [и др.] // Cellular – 18 (1979). – P. 369-374
60. Shaw E. Evidence for an Active-Center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent, 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the Chloromethyl Ketone Derived from  $N^{\alpha}$ -Tosyl-L-lysine\* / E. Shaw, M. Mares-Guia, W. Cohen // Biochemistry – 4 (1965). – P. 2219-2224

61. Navarro J. Inhibition of tyrosine protein kinases by halomethyl ketones / J. Navarro, M. Abdel Ghany, E. Racker // *Biochemistry* – 21 (1982). – P. 6138-6144
62. Modification of the catalytic subunit of bovine heart cAMP-dependent protein kinase with affinity labels related to peptide substrates / H. Bramson [и др.] // *Journal of Biological Chemistry* – 257 (1982). – P. 10575-10581
63. DeCamp D. Identification of tyrosine and lysine peptides labeled by 5'-*p*-fluorosulfonylbenzoyl adenosine in the active site of pyruvate kinase / D. DeCamp, R. Colman // *Journal of Biological Chemistry* – 261 (1986). – P. 4499-4503
64. Corbin J. Studies of two different intrachain cGMP-binding sites of cGMP-dependent protein kinase / J. Corbin, S. Doskeland // *Journal of Biological Chemistry* – 258 (1983). – P. 11391-11397
65. Tamura J. Affinity labeling of nucleotide-binding sites on kinases and dehydrogenases by pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine / J. Tamura, R. Rakov, R. Cross // *Journal of Biological Chemistry* – 261 (1986). – P. 4126-4133
66. 6-[(4-Bromo-2,3-dioxobutyl)thio]-6-deaminoadenosine 5'-monophosphate and 5'-diphosphate: new affinity labels for purine nucleotide sites in proteins / R. Colman [и др.] // *Biochemistry* – 23 (1984). – P. 3281-3286
67. Kapetanovic E. 2-[(4-Bromo-2,3-dioxobutyl)thio]adenosine 5'-monophosphate, a new nucleotide analog that acts as an affinity label of pyruvate kinase / E. Kapetanovic, J. Bailey, R. Colman // *Biochemistry* – 24 (1985). – P. 7586-7593
68. Suolinna E. The Effect of Flavonoids on Aerobic Glycolysis and Growth of Tumor Cells / E. Suolinna, R. Buchsbaum, E. Racker // *Cancer Research* – 35 (1975). – P. 1865-1872
69. Graziani Y. The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo / Y. Graziani, E. Erikson, R. Erikson // *European Journal of Biochemistry* – 135 (1983). – P. 583-589

70. Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: Inhibition by quercetin / J. Levy [и др.] // Biochemical and Biophysical Research Communications – 123 (1984). – P. 1227-1233
71. Selective inhibition of a cyclic nucleotide independent protein kinase (G type casein kinase) by quercetin and related polyphenols / C. Cochet [и др.] // Biochemical Pharmacology – 31 (1982). – P. 1357-1361
72. A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from pseudomonas / H. Ogawara [и др.] // Journal of Antibiotics – 39 (1986). – P. 606-608
73. Inhibition of mouse mastocytoma protein kinases by amiloride / R. Ralph [и др.] // Biochemical and Biophysical Research Communications – 104 (1982). – P. 1054-1059
74. Holland R. Evidence that amiloride antagonises insulin-stimulated protein phosphorylation by inhibiting protein kinase activity / R. Holland, J. Woodgett, D. Hardie // FEBS Letters – 154 (1983). – P. 269-273
75. Davis R. Amiloride directly inhibits growth factor receptor tyrosine kinase activity / R. Davis, M. Czech // Journal of Biological Chemistry – 260 (1985). – P. 2543-2551
76. Kantor H. Indomethacin in submicromolar concentrations inhibits cyclic AMP-dependent protein kinase / H. Kantor, M. Hampton // Nature – 276 (1978). – P. 841-842
77. Goueli S. Indomethacin and inhibition of protein kinase reactions / S. Goueli, K. Ahmed // Nature – 287 (1980). – P. 171-172
78. Inhibition of insulin receptor phosphorylation by indomethacin / C. Malchoff [и др.] // Molecular and Cellular Biochemistry – 69 (1985). – P. 83-90
79. Fersht A. Active-Site-Directed and Enzyme-Activated irreversible inhibitors "Affinity Labels" and "Suicide Inhibitors" / A. Fersht // Enzyme Structure and Mechanism – 2 (1985). – P. 273-286
80. Shia M. The insulin receptor protein kinase. Physicochemical requirements for activity / M. Shia, J. Rubin, P. Pilch // Journal of Biological Chemistry – 258 (1983). – P. 14450-14455

81. Bolen J. Inhibition of polyoma virus middle T antigen-associated tyrosyl kinase activity by *N*-ethylmaleimide / J. Bolen, M. Israel // Journal of Biological Chemistry – 258 (1983). – P. 15135-15140
82. Nelson N. Selective protection of sulfhydryl groups in cAMP-dependent protein kinase II / N. Nelson, S. Taylor // Journal of Biological Chemistry – 258 (1983). – P. 10981-10987
83. Edinger F. Tumor Promoter-Stimulated Protein Phosphorylation in Mouse Epidermis Is Inhibited by Bromophenacyl Bromide / F. Edinger, A. Penn // Journal of Investigative Dermatology – 84 (1985). – P. 413-416
84. Riordan J. Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione / J. Riordan // Biochemistry – 12 (1973). – P. 3915-3923
85. Riordan J. Arginyl residues: anion recognition sites in enzymes / J. Riordan, K. McElvany, C. Borders // Science – 195 (1977). – P. 884-886
86. Severin S. Essential Arginine Residues of Creatine Kinase From Beef Heart Mitochondria / S. Severin, L. Belousova, E. Moskvitina // Biochemistry international – 6 (1983). – P. 149-156
87. Inactivation of guanosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from bovine lung by *o*-phthalaldehyde / R. Puri [и др.] // Biochemistry – 24 (1985). – P. 6508-6514
88. Madelian V. Modification of sulfhydryl groups of creatine kinase by urate / V. Madelian, W. Warren // Clinical Biochemistry – 17 (1984). – P. 173-174
89. Charlton J. Chemical cross-linking of cyclic AMP-dependent protein kinase and its dissimilar subunits / J. Charlton, C. Huang, L. Huang // Biochemical Journal – 209 (1983). – P. 581-586
90. Latent insulin receptors and possible receptor precursors in 3T3-L1 adipocytes / P. Deutsch [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA – 80 (1983). – P. 133-136
91. Aiyer R. Structural characterization of insulin receptors. Subunit composition of receptors from turkey erythrocytes / R. Aiyer // Journal of Biological Chemistry – 258 (1983). – P. 15000-15003

92. Grob P. Affinity labeling and partial purification of nerve growth factor receptors from rat pheochromocytoma and human melanoma cells / P. Grob, C. Berlot, M. Bothwell // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA – 80 (1983). – P. 6819-6823
93. Purification of the receptor for nerve growth factor from A875 melanoma cells by affinity chromatography / P. Puma [др.] // Journal of Biological Chemistry – 258 (1983). – P. 3370-3375
94. Phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent Protein Kinase from Heart. Substrate specificity and inhibition by various agents / B. Wise [и др.] // Journal of Biological Chemistry – 257 (1982). – P. 8489-8495
95. Mazzei G. Polymyxin B is a more selective inhibitor for phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase than for calmodulin-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase / G. Mazzei, N. Katoh, J. Kuo // Biochemical and Biophysical Research Communications – 109 (1982). – P. 1129-1133
96. Stutchfield J. The effects of polymyxin B, a protein kinase C inhibitor, on insulin secretion from intact and permeabilised islets of Langerhans / J. Stutchfield, P. Jones, S. Howell // Biochemical and Biophysical Research Communications – 136 (1986). – P. 1001-1006
97. Inhibition by calmodulin of calcium/phospholipid-dependent protein phosphorylation / K. Albert [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA – 81 (1984). – P. 3622-3625
98. Selective inhibition of the insulin-stimulated phosphorylation of the 95,000 dalton subunit of the insulin receptor by TAME or BAEE / S. Tamura [и др.] // Biochemical and Biophysical Research Communications – 119 (1984). – P. 465-472
99. Two types of calcium-dependent protein phosphorylations modulated by calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives / T. Tanaka [и др.] // Molecular Pharmacology – 22 (1982). – P. 408-412

100. Kase H. K-252a, A Potent Inhibitors of protein kinase c from microbial origin / H. Kase, K. Iwahashi, Y. Matsuda // Journal of Antibiotics – 39 (1986). – P. 1059-1065
101. K-252b, c AND d, Potent Inhibitors of protein kinase c from microbial origin / S. Nakanishi [и др.] // Journal of Antibiotics – 39 (1986). – P. 1066-1071
102. Conner J. Elemental sulfur: A novel inhibitor of adenylate kinase / J. Conner, P. Russell // Biochemical and Biophysical Research Communications – 113 (1983). – P. 348-352
103. Chegwiddden W. Salicylate inhibition of monkey muscle creatine kinase / W. Chegwiddden, D. Watts // Biochemical Pharmacology – 29 (1980). – P. 2113-2116