

Аннотация

Цель исследования, проведенного в данной выпускной квалификационной работе – это *in silico* дизайн и поиск новых хемотипов ингибиторов CDK8.

Объекты исследования в данной работе – это коммерческие библиотеки киназных ингибиторов, загруженные из доступных каталогов ChemDiv.

В литературном обзоре была описана биологическая роль CDK8, особенности строения ее активного сайта, основы молекулярного моделирования, а также рассмотрены подходы к синтезу ранее открытых ингибиторов CDK8.

На основе литературного обзора были сделаны выводы о перспективности разработки селективных ингибиторов CDK8 с новым хемотипом.

В разделе «Результаты и обсуждения» приведены данные нативного докинга для 5 различных комплексов, взятых из базы RCSB PDB, описаны и проанализированы результаты проведения виртуального скрининга четырех коммерческих библиотек и результат *in vitro* исследования для 28 соединений-хитов.

Анализ результатов молекулярного докинга проводился с оценочной функции Glide с использованием протокола дополнительной точности (XP). Для изучения цитотоксического эффекта исследуемых соединений в *in vitro* исследовании был проведен МТТ-тест.

Работа изложена на 96 страницах, содержит 40 рисунков, 3 таблицы, 10 схем и приложение. Список литературы включает в себя 125 источников.

Abstract

The title of the graduation work is «Molecular design of cyclin depended kinase 8».

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

The key issue of the thesis is the conducting a virtual screening of four ChemDiv commercial kinase inhibitors libraries for the search of new CDK8 inhibitor chemotypes.

The aim of the work is to implementation of *in silico* design and search for new chemotypes of CDK8 inhibitors.

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

As a result of the study, we present 28 potential CDK8 inhibitors with a proven cytotoxic effect on colorectal cancer cell lines (SW837, SW948 and HCT116).

It can be concluded that this work is relevant because 28 potential inhibitors of CDK8 were found as a result of virtual screening. Their activity has been proven in an *in vitro* study.

Содержание

Определения, обозначения и сокращения	5
Введение.....	7
1 Литературный обзор.....	8
1.1 Циклин-зависимые киназы	8
1.2 Биологическая роль CDK8	11
1.3 Роль CDK8 в патогенезе рака	16
1.4 Молекулярное моделирование	18
1.5 Удачные кейсы открытия ингибиторов CDK8	33
2 Результаты и их обсуждение	48
2.1 Аннотирование и подготовка библиотеки лигандов.....	49
2.2 Белковые мишени и нативный докинг.....	52
2.3 Виртуальный скрининг и анализ результатов	62
2.4 Идентификация соединений-хитов	75
2.5 <i>In vitro</i> исследование.....	77
3 Экспериментальная часть.....	80
3.1 Компьютерное моделирование.....	80
3.2 Биологические исследования.....	82
Заключение.....	83
Список используемой литературы.....	86
Приложение А Результат виртуального скрининга библиотеки коммерческих соединений в комплекс CDK8/Cyclin C	100
Приложение Б Результат <i>in vitro</i> исследования библиотеки коммерческих соединений	139

Определения, обозначения и сокращения

В настоящей работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

APP	белок-предшественник амилоида
BMP	костный морфогенетический белок
CADD	автоматизированный дизайн лекарств
CAK	CDK-активирующая киназа
CDK	циклинзависимые киназы
CKI	эндогенные ингибиторы циклинзависимых киназ
CTD	карбоксиконцевой домен
CRC	колоректальный рак
Cyc	циклин
DDR	репарация ДНК
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
EMT	эпителиально-мезенхимальный переход
ER	рецептор эстрогена
ETS	специфическая трансформация эритробластов
HIF	фактор, вызывающий гипоксию
HCC	гепатоцеллюлярная карцинома
IFD	inducted-fit докинг
IFN- γ	интерферон γ
JAK	Янус-киназа
LEF	лимфотропный фактор
MED	медиаторный комплекс
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
NICD	внутриклеточный домен белка NOTCH
PIC	преинициаторный комплекс
PIK3CA	фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа

PKN2	связанное с биотином поликлональное антитело к протеинкиназе N2
P-TEFb	положительный фактор элонгации транскрипции b
QM	квантовая механика
Rb	белок гена ретинобластомы, опухолевый супрессор
RNAPII	РНК-полимераза II
R-Smad	фактор транскрипции, регулируемый рецепторами
SE	суперэнхансеры
SEC	комплекс супер-элонгации
SF	скоринговые функции
STAT	преобразователь сигнала и активатор транскрипции
TCF	T-цитокин
TGF- β	трансформирующий фактор роста β
TF	фактор транскрипции
TFIIH	общий фактор транскрипции
3'-UTR	3'-нетранслируемая область матричной РНК
VS	виртуальный скрининг

Введение

На сегодняшний день, разработка низкомолекулярных ингибиторов различных киназ, принимающих участие в патогенезе рака и других заболеваний – это одна из активно-развивающихся областей медицинской химии. Среди множества открытых и описанных учеными белковых мишеней, одними из популярных и важных на протяжении как последнего десятилетия, так и в настоящее время являются различные типы циклин-зависимых киназ [1].

В данной выпускной квалификационной работе особое внимание уделено CDK8 в качестве белковой мишени, так как данная киназа, функционируя вместе с CusC, является одним из важнейших регуляторов транскрипции, обуславливающих образование многих онкогенов в клетке, и, следовательно, приводящих к появлению и дальнейшему развитию различных видов онкологических заболеваний.

Показано, что CDK8 имеет достаточно разнообразную биологическую роль, а именно, она участвует во множестве сигнальных путей, гиперактивация которых опосредует развитие широкого круга раковых заболеваний.

Цель работы: поиск новых хемотипов ингибиторов CDK8.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) выбор, аннотирование и подготовка различных виртуальных библиотек коммерчески-доступных соединений;
- 2) выбор и подготовка белковых структур CDK8, анализ режимов связывания известных ингибиторов;
- 3) проведение виртуального скрининга библиотек; анализ его результатов и идентификация хитов;
- 4) осуществление *in vitro* исследования на линиях колоректального рака с целью выявления активных соединений.

1 Литературный обзор

1.1 Циклин-зависимые киназы

CDKs были идентифицированы в 1970-х и 1980-х годах, они относятся к семейству серин-треониновых киназ, следовательно, они осуществляют фосфорилирование гидроксильной группы в остатках серина и треонина.

Известно, что ключевая роль CDK заключается в контроле клеточного цикла. Но осуществление данной биологической роли происходит при формировании комплекса с циклинами (Cyc), которые необходимы для активации. Помимо этого известно, что существуют эндогенные лиганды, способные ингибировать как целый комплекс CDK/Cyc, так и отдельно CDKs. Такой контроль необходим для упорядоченного прохождения клеткой всех этапов клеточного цикла, что делает этот процесс строго регулируемым [1].

CDK млекопитающих помимо участия в клеточном цикле также регулируют транскрипцию, эпигенетическую регуляцию, репарацию ДНК, ангиогенез и метаболизм в целом [2-4].

1.1.1 Структура CDK

Известно, что различные CDKs имеют множество сходств в аминокислотной последовательности и в структуре в общем. Этот фактор определяет сложность в разработке селективных ингибиторов [5].

Домены CDK, как и у большинства протеинкиназ, имеют относительно небольшие размеры N-концевого участка и более длинный C-концевого (рисунок 1) [6].

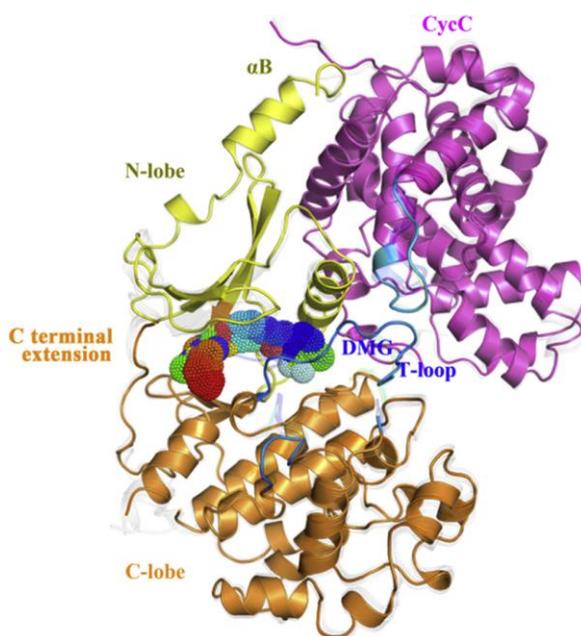


Рисунок 1 – Расположение доменов структуры CDK (на примере CDK8)

N-концевой участок обычно состоит из 5 антитипараллельных β -листов и одной α -спирали. Данная α -спираль содержит последовательность PSTAIRE и необходима для связывания с циклинами (рисунок 2). Более длинный C-конец содержит большое количество α -спиралей, и именно в этой части структуры находится активный центр, ответственный за фосфорилирование. Активационный центр, также известный как T-петля (остатки Asp145 – Glu172), является платформой для связывания Ser/Thr (фосфорно-акцепторной области) субстратов фосфорилирования.

N-концевой и C-концевой участки соединены гибкой шарнирной областью (остатки Glu81 – His84), которая образует сайт связывания АТФ [7].

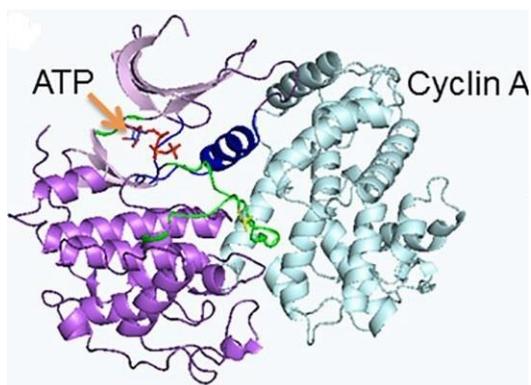


Рисунок 2 – Расположение активного центра в структуре комплекса CDK2/СусА

В результате проведения различных биохимических и структурных анализов был установлен регуляторный механизм, определяющий киназную активность CDK. Известно, что при отсутствии действия митогенных факторов киназа находится в неактивном состоянии. Например, если рассматривать CDK2, то ее активность повышается во время поздней G1 фазы, когда в результате опосредованной транскрипции белковый продукт связывается и активирует CDK2. Известно, что ряд известных ингибиторов комплекса CDK2/Сус А (p21Cip1, p27Cip1 и p57Cip2) связываются в шарнирной области, ответственной за связывание с АТФ, то есть являются конкурентными ингибиторами (рисунок 3) [8].

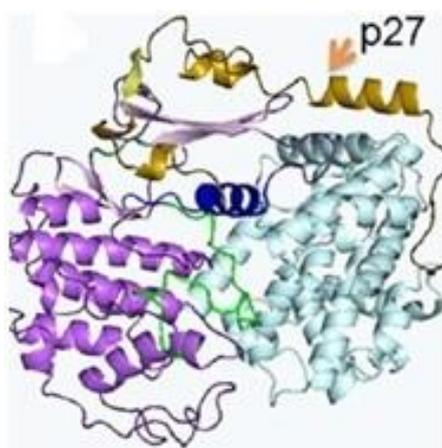


Рисунок 3 – Область взаимодействия ингибиторов комплекса CDK2/Сус А (на примере ингибитора p-27) со структурой комплекса

1.1.2 Классификация CDK

Семейство CDK человека включает 20 типов киназ, при этом лишь часть из них участвует в регуляции клеточного цикла (CDK 1, 2, 4, 6), а другие типы CDK регулируют в различные процессы, не связанные с регуляцией клеточного цикла, такие как регуляция транскрипции (CDK 7, 8, 9, 11, 12), альтернативный сплайсинг (CDK12), репарация ДНК (CDK 2, 9, 12), миграция и ангиогенез (CDK5) или сперматогенез (CDK16). Но биологическая роль некоторых CDK и циклинов остается не до конца изученной [9].

1.2 Биологическая роль CDK8

CDK8 – это прежде всего транскрипционный член семейства CDK, в настоящее время является одной из перспективных мишеней благодаря своей центральной роли в транскрипции и онкогенезе. Также CDK8 можно считать одним из наиболее противоречивых членов семейства CDK, так как он оказывает как положительное, так и отрицательное влияние на транскрипцию и при этом еще играет важную роль в онкогенных путях и клеточном цикле [10].

1.2.1 Регуляция транскрипции

Среди разнообразных клеточных функций CDK8 известно ее участие в транскрипции. Центральную роль в регуляции транскрипции у эукариот играет Mediator - крупный мультисубъединичный белковый комплекс, а CDK8 является частью данного комплекса.

Медиаторный комплекс – это коактиватор транскрипции, действующий в роли молекулярного моста для передачи регуляторных сигналов от связанных с ДНК TF сразу на PIC RNAPII [11]. CDK8 обратимо связывается с комплексом Mediator и является частью четырехсубъединичного киназного модуля, который еще также включает MED12, MED13 и CusC. Известно, что MED12 и CusC необходимы для проявления киназной активности CDK8, а

MED13 участвует в привлечении предварительно собранного киназного модуля к медиаторному комплексу [12].

Позже проведенные исследования указывали на то, что человеческий комплекс CDK8-Mediator способен подавлять повторную инициацию транскрипции. Киназный модуль может связываться с основным медиаторным комплексом после инициации транскрипции, это вызывает изменение конформации медиаторного комплекса, и как следствие, невозможность связывания с RNAPII [11]. Более того, было показано, что связывание киназного модуля CDK8 и RNAPII с основным медиаторным комплексом является взаимоисключающим, и, следовательно, приводит к прекращению повторной инициации транскрипции [13]. На рисунке 4 показана схема регуляции транскрипции с помощью CDK8 [14].

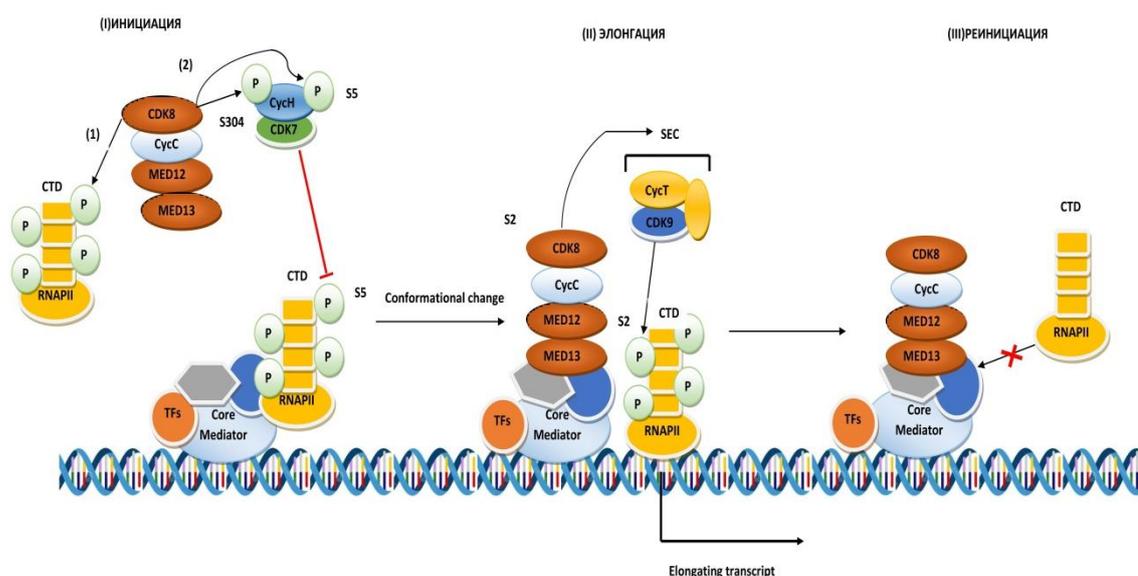


Рисунок 4 – Схема регуляции транскрипции с помощью CDK8

В более позднем исследовании было высказано предположение, что CDK8 потенцирует ER при раке молочной железы, способствуя эстроген-индуцированному фосфорилированию RNAPII CTD в Ser2, способствуя более эффективному завершению транскрипции [15].

Последующие исследования показали, что CDK8 потенцирует экспрессию генов, за счет регуляции элонгации транскрипции. Нокдаун CDK8 в клетках HCT116 (клеточная линия колоректального рака) показал явное снижение фосфорилирования RNAPII CTD в Ser2 и Ser5 с сопутствующим нарушением элонгации транскрипции. Этот нокдаун не повлиял на рекрутирование RNAPII, но вместо этого предотвратил рекрутирование SEC в генные локусы *IEGs* [16].

В литературе есть сведения о роли CDK8 как активатора транскрипции, который включает позитивную регуляцию экспрессии генов в условиях гипоксии. Трансактивация HIF1A-зависимых генов требует, чтобы комплекс CDK8/Mediator активировал экспрессию гена-мишени *HIF1A* путем рекрутирования SEC и P-TEFb [17, 18]. В солидных опухолях клетки активируют гликолитические ферменты, индуцированные HIF1A, это необходимо для восполнения энергетических потребностей и адаптации к гипоксии [19].

1.2.2 Участие в сигнальных путях

В настоящее время роль CDK8 как активатора транскрипции в сигнальном пути Wnt/ β -катенин считается одной из наиболее важных [20].

Изучение сигнального пути Wnt/ β -катенин началось после открытия в 1982 г. протоонкогена *Int1* у мышей, известного сейчас как *Wnt1* [21]. Было обнаружено, что CDK8 действует как активатор β -катенин-зависимой транскрипции, что ведет к пролиферации клеток [22]. Механизм регуляции транскрипции таким образом определен не совсем четко, так как киназные субстраты CDK8, которые опосредуют эту активность, еще предстоит идентифицировать. Но сходящиеся генетические исследования продемонстрировали, что способность CDK8 управлять β -катенин-регулируемой экспрессией генов, вероятно, зависит от медиаторного комплекса. Помимо CDK8, MED12 и MED13 участвуют в привлечении медиатора к Wnt-направленной мишени и генам, регулирующим транскрипцию β -катенина [23].

Также было высказано предположение, что CDK8 может оказывать влияние на сигнальный путь Wnt/ β -катенин косвенно, когда Rb и CDK8 может противодействовать ингибированию фактора транскрипции E2F1. E2F1 может посттрансляционно разлагать β -катенин, а может активировать ICAT, который разрушает комплекс β -катенин-TCF/LEF, необходимый для избирательного связывания с ДНК [24]. Последующие исследования доказали, что CDK8 фосфорилирует Ser375 на E2F1 в клетках рака толстой кишки, что ослабляет репрессивные эффекты E2F1 на транскрипцию, ассоциированную с β -катенином [25].

Также известна роль CDK8 в сигнальном пути BMP/TGF- β . Белки семейства Smad, входящие в данный сигнальный путь, являются активаторами транскрипции и играют ключевую роль в передаче сигналов от рецепторов клеточной поверхности к ядру [26].

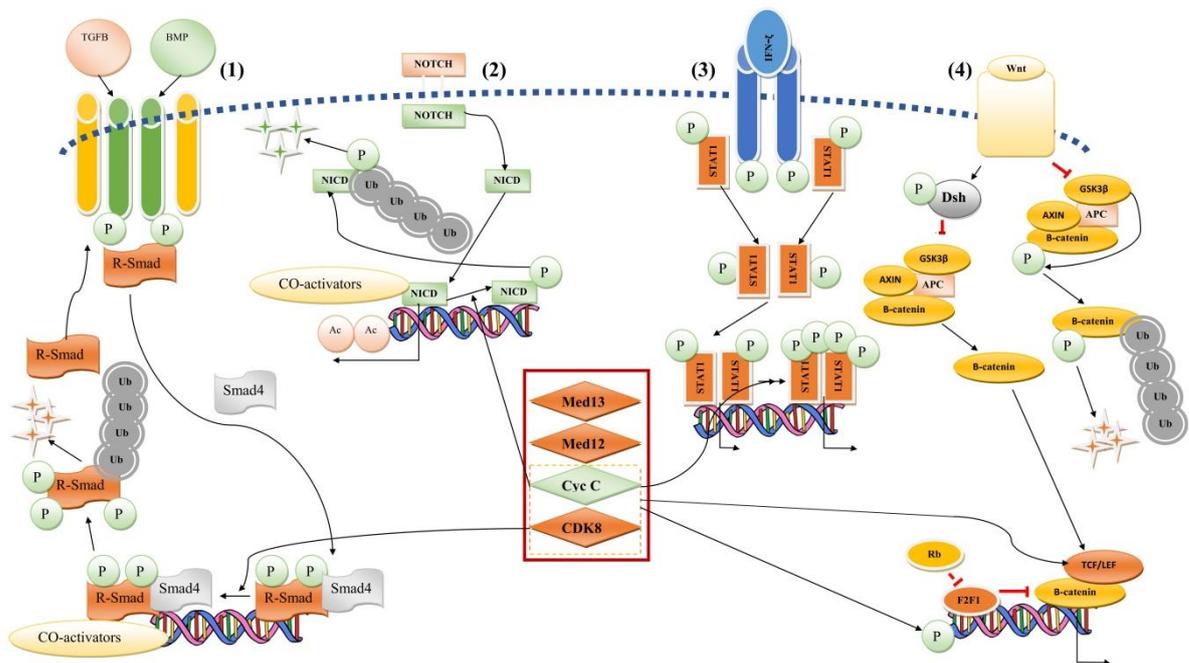
Комплекс CDK8/CycC в ядре фосфорилирует R-Smads (фактор транскрипции), способствуя связыванию R-Smads с коактиваторами, необходимыми для эффективной транскрипции генов-мишеней, и регулирует транскрипцию генов-мишеней, тем самым контролируя пролиферацию [27]. Помимо этого, фосфорилирование CDK8/CycC может вызвать убиквитинирование R-Smads [28].

Известно, что CDK8 также принимает участие в сигнальном пути NOTCH. Лиганд, связывающийся с внеклеточным доменом NOTCH рецептора запускает сигнальный путь, высвобождая внутриклеточный домен NICD, который проникает в ядро и связывает целевой ген *NOTCH* с коактиватором, необходимым для начала транскрипции. Этот процесс регулирует комплекс CDK8/CycC путем фосфорилирования NICD [29].

CDK8 также участвует в сигнальном пути STAT, который связан с важными медиаторами цитокинового ответа. INF- γ может связываться с рецепторами на мембране клеток, тем самым заставляя JAK фосфорилировать STAT1 по Tyr701, это приводит к образованию димера, который транспортируется в ядро клетки для связывания с геном-мишенью

для стимуляции транскрипции. Но для начала экспрессии этого недостаточно, и требуется повторное фосфорилирование димера STAT1, оно идет по остаткам Ser727 и опосредуется комплексом CDK8/СусС. Помимо STAT1, CDK8 фосфорилирует также STAT3 и STAT5 [30].

На рисунке 5 приведена схема участия CDK8 в различных сигнальных путях.



1 - Smad-трансактивація; 2 – сигнальний шлях NOTCH; 3 – сигнальний шлях STAT; 4 - сигнальний шлях Wnt/β-катенин.

Рисунок 5 – Участвие CDK8 в различных сигнальных путях

1.2.3 Регуляция клеточного цикла

CDK8 участвует в регуляции клеточного цикла через Wnt/β-катенин сигнальный путь, который способствует переходу из G1 в S фазы посредством регуляции экспрессии генов. p21 является CDK1/2-отрицательным регулятором и контролирует течение фазы G1 в клетках млекопитающих, а избыточная экспрессия CDK8 стимулирует транскрипцию p21 [31].

Фосфорилирование CDK7/CycH – механизм, с помощью которого CDK8 также косвенно контролирует клеточный цикл, потому что CDK7 фосфорилирует CDK1/2/4/6, которые осуществляют регуляцию клеточного цикла [32].

Также в литературе есть сведения о том, что клетки, находящиеся в фазе G1/S клеточного цикла реагируют на действие ингибитора CDK8/19 посредством модулирования экспрессии мРНК регуляторов перехода в следующую фазу клеточного цикла [33]. Схематическое изображение влияния CDK8 на клеточный цикл представлено на рисунке 6 [34].

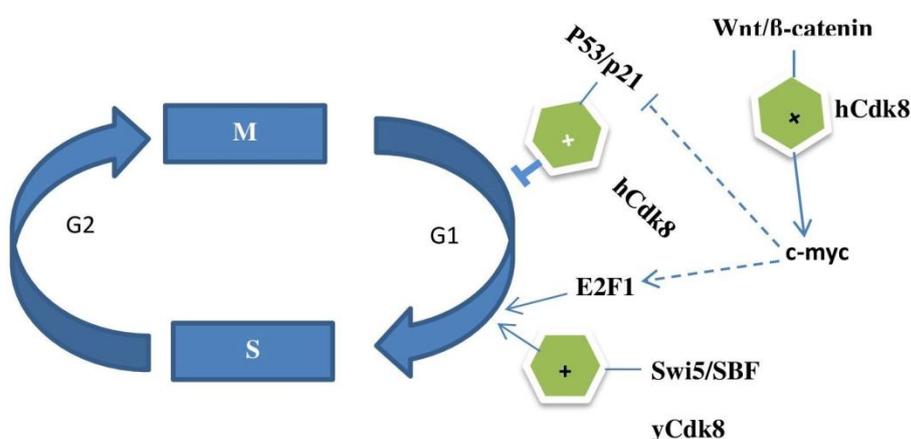


Рисунок 6 – Схема влияния CDK8 на клеточный цикл

1.3 Роль CDK8 в патогенезе рака

Существует множество доказательств указывающих, что CDK8 является протоонкогеном, вызывающим различные типы онкологии, но чаще всего он вызывает избыточную пролиферацию клеток CRC [35, 36].

CRC характеризуется высокой активацией β-катенина. Цитоплазматический β-катенин стабилизируется и переносится в ядро, образуя комплекс с TCF и LEF, рекрутирует коактиваторы и индуцирует транскрипцию нескольких онкогенов, таких как *MYC*, *AXIN2* и *LEF1*. В

исследовании 123 случаев CRC ген CDK8 был амплифицирован у 47% пациентов [22].

По полученным в ходе исследования данным избыточная экспрессия CDK8 была обнаружена примерно в 60% CRC. Роль CRC в основном связано с прямым или косвенным участием CDK8 в WNT/ β -катениновом сигнальном пути. Нокаут CDK8 или ингибирование с помощью низкомолекулярных соединений уменьшает пролиферацию клеток. Стало известно, что индуцированные делеции в гене CDK8 приводят к достаточно быстрому увеличению объема опухоли. Очевидные различия в функциях CDK8 могут отражать разные роли CDK8 в зависимости от среды и подчеркивать множественные функции CDK8 в регуляции транскрипции [37].

Известно, что при раке молочной железы наблюдается активация CDK8 [38, 39]. CDK8 может способствовать развитию опухоли через ось Skp2-mH2A1-CDK8, которая является ключевой для контроля перехода клеток из G2 в M фазу. Данный механизм регулируют клеточный рост, миграцию, полиплоидию и онкогенез, а его нарушение связано с прогрессированием рака молочной железы. Сверхэкспрессия CDK8 и Skp2, и при этом низкий уровень mH2A1 чаще приводят к неблагоприятным последствиям у больных раком молочной железы [40].

По данным недавних исследований стало известно, что ингибирование CDK8 оказывает положительное влияние на эстроген - зависимый рак молочной железы. CDK8 является нижестоящим белком ER и продемонстрировал роль в эстроген-индуцированной транскрипции. Ингибирование CDK8 может снижать индуцированное эстрогеном фосфорилирование RNAPII, тем самым ингибируя удлинение транскрипции ER-индуцированных генов и роль эстрогена в регуляции роста рака [15].

Инвазия и метастазирование опухолевых клеток также связано с повышенной экспрессией CDK8. Такая ситуация при раке поджелудочной железы способствует ангиогенезу путем активации CDK8- β -катенин-KLF2 сигнального пути [41]. Также по данные некоторых исследований дают

информацию, что активация CDK8 мутантным *KRAS* запускает EMT через путь WNT/ β -катенин [42]. EMT - ключевой фактор, оказывающий большое влияние на прогрессирование и метастазирование клеток НСС - гепатоцеллюлярной карциномы. Проведенные исследования доказали, что CDK8 вызывает канцерогенный эффект гена *DLGAP1-AS1* в клетках НСС, путем активации WNT/ β -катенинового пути. *DLGAP1-AS1* активируется в клеточных линиях НСС и, тем самым способствует прогрессированию НСС и высокому уровню активации EMT [43].

Важной характеристикой метаболизма раковых клеток является нарушение обмена липидов и углеводов, такие клетки нуждаются в высокой потребности в АТФ, что приводит к повышению потребления глюкозы и скорости гликолиза. HIF1A – основной регулятор транскрипции гликолитических ферментов, он совместно с CDK8 влияет на экспрессию генов. Последующие исследования показали ключевую роль CDK8 в экспрессии гликолитического гена. Ингибирование CDK8 снижает пролиферацию клеток CRC, за счет влияния на переносчики глюкозы, поглощение глюкозы и гликолитическую способность. Таким образом, комбинация ингибиторов CDK8 с ингибиторами гликолиза может представлять собой многообещающий подход к лечению опухолей [44,45].

1.4 Молекулярное моделирование

Дизайн *in silico* получил большую популярность в последние десятилетия, так как этот метод исследования позволяет проводить виртуальный скрининг множества соединений за небольшой период времени, тем самым значительно снижая первоначальные затраты на идентификацию попаданий и повышая шансы на удачный поиск желаемых хит-соединений.

В зависимости от наличия информации о структуре белка-мишени, CADD принято делить на два типа:

- основанный на структуре белка мишени CADD;

- основанный на структуре лиганда CADD.

CADD позволяет идентификация нескольких хит-соединений, после чего они оптимизируются и проходят дальнейшую оценку биологической активности [46].

На рисунке 7 представлены указанные выше типы подходов молекулярного моделирования.

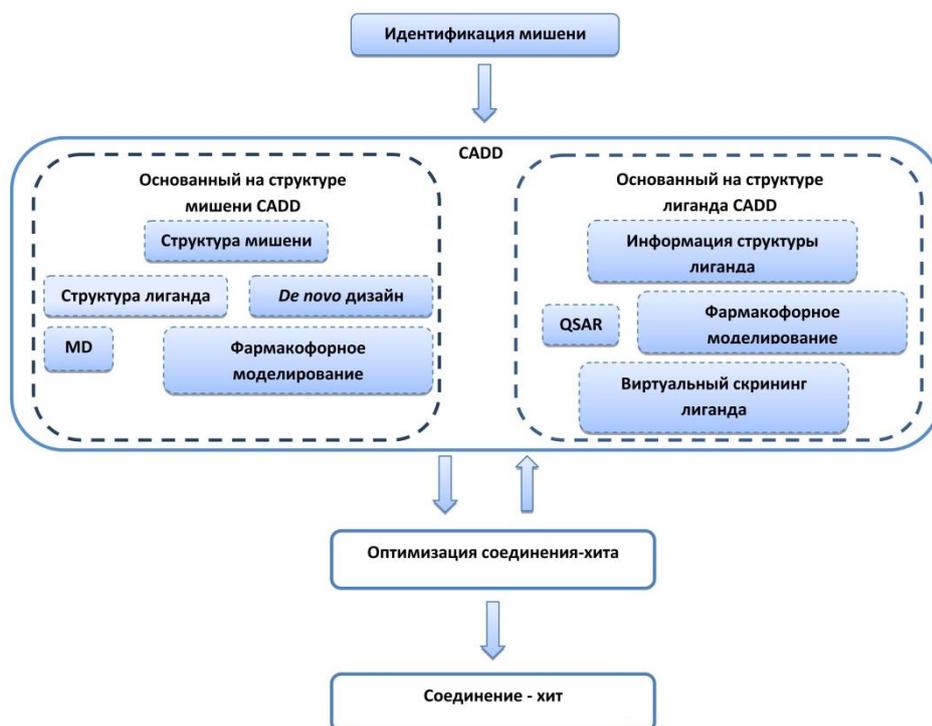


Рисунок 7 – Различные подходы молекулярного моделирования

1.4.1 Виды и этапы осуществления докинга

Молекулярный докинг является структурно-ориентированным методом дизайна лекарственных препаратов. Данный метод моделирует молекулярное взаимодействие и предсказывает позу, режим связывания и сродство между белком-мишенью и лигандами. Использование базы данных различных соединений для скрининга потенциальных фармакофоров значительно повышает эффективность исследования и при этом снижает затраты.

Известно, что молекулярный докинг позволяет получить информацию об аффинности связывания и режиме взаимодействия между лигандом и белком-мишенью или белком-белком-мишенью [47].

Существуют модели связывания относительно подвижности лиганда: «rigid» (жесткий докинг) и «flexible» (гибкий докинг), а также относительно подвижности рецептора: жесткий и induced-fit докинг.

Изначально была предложена модель «замка и ключа», представленная на рисунке 8, которая относится к жесткой стыковке белка-интереса и лиганда, при этом необходимо найти правильную ориентацию «ключа», чтобы открыть «замок». Эта модель указывает на важность геометрической комплиментарности [48].



Рисунок 8 – Модель жесткой стыковки рецептора и лиганда

Однако реальный процесс стыковки в клетках достаточно гибкий, белкам-мишеням и лигандам необходимо менять свою конформацию. Такую модель можно назвать гибким докингом или «моделью индуцированной подгонки», которая представлена на рисунке 9 [49].

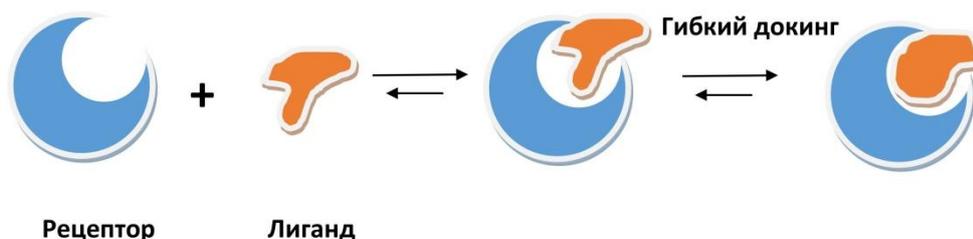


Рисунок 9 – Модель гибкой стыковки рецептора и лиганда

Геометрическая, энергетическая комплементарность и преорганизация гарантируют получение наиболее стабильной структуры, необходимой для снижения свободной энергии [50].

Для осуществления молекулярного докинга за последние десятилетия было разработано несколько программ, таких как AutoDock [51], AutoDock Vina [52], DockThor [53, 54], GOLD [55, 56], FlexX [57], Molegro Virtual Docker [58] и новую методологию стыковки, реализованную в программном пакете FirstDiscovery Glide [59].

Первым этапом в осуществлении докинга является получение целевой структуры, которая обычно состоит из крупной биологической молекулы (белка, ДНК или РНК). Структуры этих макромолекул можно найти в банке данных о белках (PDB – protein data bank), который обеспечивает доступ к трехмерным координатам атомов, полученным экспериментальными методами [60].

Бывает, что информация об области связывания отсутствует, в таком случае используются два варианта: либо наиболее вероятные сайты связывания предсказываются алгоритмически, либо выполняется моделирование «слепой стыковки». Второй метод требует больших вычислительных затрат, так как поиск охватывает всю целевую структуру [61].

Для точного определения сайтов связывания можно использовать несколько доступных программ, например, MolDock, DoGSiteScorer, Fragment Hotspot Maps. MolDock использует алгоритм обнаружения полостей для определения потенциальных сайтов связывания [58]. DoGSiteScorer — это алгоритм, который определяет возможные карманы и их показатели, которые описывают потенциал сайта связывания для взаимодействия с лигандом [62]. Fragment Hotspot Maps использует небольшие молекулярные зонды для выявления областей поверхности белка-мишени, которые склонны взаимодействовать с небольшими молекулами, и эти предполагаемые места

взаимодействия могут быть предоставлены в качестве центра пространства выборки [63].

Во время расчетов стыковки общей стратегией является использование представления сетки, которое включает предварительно рассчитанные потенциальные энергии для взаимодействия в целевом сайте связывания. Затем в каждой точке сетки рассчитываются взаимодействия, связанные с леннард-джонсовскими и электростатическими потенциалами [64].

Структуру лиганда найти в базах данных малых молекул, таких как ZINC [65] и PubChem [66]. Трехмерные координаты атомов этих соединений, если они недоступны изначально, могут быть получены из двумерных структур. Важно, что для низкомолекулярных лигандов определяется стереохимически правильная геометрия с верным определением протонирования. Заряды обычно присваиваются с помощью алгоритмов, которые распределяют суммарный заряд молекулы среди составляющих ее атомов в виде частичных зарядов, центрированных по атомам. Большинство методов докинга подразумевают, что конкретное состояние протонирования и распределение заряда в молекулах не меняются между их связанным и несвязанным состояниями [51]. Но необходимо понимать, что для осуществления успешного докинга крайне важно оценить свободные кручения, состояния протонирования и распределение зарядов. Например, протонированные состояния аминокислотных остатков мишени могут иметь решающее значение для взаимодействия с лигандом и, следовательно, для предсказания правильной аффинности связывания. Существует несколько доступных программ для оценки рКа аминокислотных остатков, таких как PropKa [67] и H++ [68].

Решающее значение для определения стыковки имеют два аспекта – это алгоритмы поиска и функции оценки. Алгоритм поиска анализирует и определяет положение лиганда в сайте связывания с учетом ротационных и внутренних степеней свободы лиганда [69].

Все этапы осуществления молекулярного докинга представлены на рисунке 10.



Рисунок 10 – Этапы осуществления молекулярного докинга

1.4.2 Скоринговые функции

При осуществлении молекулярного докинга на основе белковых структур генерируется большое количество возможных типов расположения лиганда, они оцениваются по скоринговым (оценочным) функциям (SF).

Скоринговые функции являются важнейшим компонентом в молекулярном моделировании. Они необходимы для определения способа связывания и сайта связывания лиганда с белком-мишенью [70], предсказания абсолютной аффинности связывания при оптимизации хит-соединения [71] и виртуального скрининга, который нужен для определения

потенциальных лекарственных препаратов путем поиска лигандов в базе данных [72].

Оценочные функции для взаимодействий белок-лиганд классифицируют на эмпирические, основанные на физике, на знаниях. Классические скоринговые функции используют метод линейной регрессии [73].

1.4.2.1 Скоринговые функции, основанные на физике

Оценочные функции, основанные на физике, включают функции оценки силового поля [74], модели сольватации [75] и методов квантовой механики [76].

С помощью функции, основанной на силовом поле, можно вычислить энергию связи по данным ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий между парами атомов белок-лиганд (уравнение 1), учитывая вклад энтальпии в энергию [72].

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}}, \quad (1)$$

где, E_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий;

E_{elec} – энергия связи при электростатическом взаимодействии.

Так как пренебрегать энтропией и эффектом растворителя нежелательно, существует другой вариант расчета (уравнение 2) на основе силового поля с включением энтропии кручения лигандов и эффектом сольватации/десольватации [77, 78].

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{solv}}, \quad (2)$$

где, E_{vdw} – энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий;

E_{elec} – энергия связи при электростатическом взаимодействии;

ΔG_{solv} – эффект сольватации.

Таким образом, можно сказать, что физические SF подходят для расчета свободной энергии связывания между белками и лигандами с относительно большей прогностической точностью.

1.4.2.2 Эмпирические скоринговые функции

Эмпирические SF оценивают аффинность связывания комплекса, за счет суммирования важных энергетических факторов для связывания белок-лиганд, такие как водородные связи, гидрофобные эффекты, стерические столкновения и т. д. Уравнение расчета данной функции (3) (X-score) представлено ниже [79].

$$E_{\text{bind}} = W_0 + W_1\Delta G_{\text{vdW}} + W_2\Delta G_{\text{Hbond}} + W_3\Delta G_{\text{rot}} + W_4\Delta G_{\text{hydro}}, \quad (3)$$

где, W_n – коэффициенты аффинности;

ΔG – различные типы энергии.

Эмпирические SF состоят из двух направлений: использование высококачественного набора обучающих данных для оптимизации структур белок-лиганд и выбора соответствующих энергетических терминов с помощью ступенчатых переменных и систематического отбора в отношении целевого белка [80].

Эмперические SF хороши для прогнозирования аффинности связывания, положения лиганда и виртуального скрининга с низким затратами на вычисления [81].

1.4.2.3 Скоринговая функция Glide

ChemScore [82] – это основа для оценочной функции Glide, при использовании которой запускается серию фильтров с постепенным увеличением уровня точности для поиска возможного положения лиганда в активном сайте структуры белка. Форма и свойства белка-мишени представлены на сетке различными наборами полей, которые обеспечивают точную оценку положения лиганда. На следующем этапе создается набор начальных конформаций лиганда, которые выберутся из перебора

минимумов в пространстве торсионных углов лиганда и представляются в компактной комбинаторной форме. Начальный скрининг выполняется по всему фазовому пространству с учетом конформации белковой мишени для определения перспективных положений лиганда. Glide уникальна тем, что полагается на методы исчерпывающего систематического поиска, начиная с поз, выбранных при начальном скрининге, лиганд минимизируется в поле белковой молекулы с использованием стандартной функции энергии молекулярной механики (в данном случае функции силового поля OPLS-AA) в сочетании с диэлектрической моделью, зависящей от расстояния [83].

Уравнение 4 является основным для Glide:

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} N_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{hb}} \sum f(\Delta R, \Delta a) + \Delta G_{\text{io}} \sum f(\Delta R, \Delta a) + \Delta G_{\text{ar}} f(\Delta R, \Delta a) + \Delta G_{\text{lipo}} f^*(\Delta R), \quad (4)$$

где, ΔG_0 – свободный член;

ΔG_{rot} – потеря энергии на одну связь;

N_{rot} – количество вращающихся связей;

ΔG_{hb} – энергия оптимальной водородной связи;

ΔG_{io} – энергия образования солевого мостика;

$f(\Delta R, \Delta a)$ – функция масштабирования, которая описывает отклонение от теоретически идеальной геометрии взаимодействия в терминах расстояния (ΔR) и угла (Δa);

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

ΔG_{lipo} – энергетический вклад липофильных фрагментов;

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

Суммирование во втором слагаемом распространяется на все пары лиганд-атом/белок-атом, которые ChemScore определяет как липофильные, в то время как в третьем слагаемом распространяется на абсолютно все водородные связи лиганда с белком [82].

Также существует расчет для Glide XP, представленный ниже, в уравнении 5 [84]:

$$\text{XP GlideScore} = E_{\text{coul}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{bind}} + E_{\text{penalty}}, \quad (5)$$

где, E_{coul} – энергия электростатического взаимодействия;

E_{vdW} – энергия Ван-дер-Вальсовых взаимодействий;

E_{bind} – основные дескрипторы, способствующие связыванию;

E_{penalty} – основные дескрипторы, препятствующие связыванию.

1.4.2.4 Скориноговые функции, основанные на знаниях

SF, основанные на знаниях, помогают вычислить парные потенциалы из трехмерных структур большого набора комплексов белок-лиганд на основе обратного статистического принципа Больцмана. Предполагается, что частота различных пар атомов на разных расстояниях связана с взаимодействием двух атомов и преобразует частоту в зависящий от расстояния потенциал средней силы [85].

Преимуществом SF, основанных на знаниях, является снижение стоимости вычислений и при этом достаточно высокий уровень точности прогнозов по сравнению с SF, основанными на физике и эмпирическими методами. Однако минусом данной SF можно считать трудность нахождения эталонного состояния. В настоящее время для этого используются две классические стратегии: аппроксимирование эталонного состояния случайным распределением пар атомов в обучающем наборе [86] и внесение исправлений элементов, основанных на первой стратегии, таких как метод коррекции объемного коэффициента [87], основанный на физике итерационный метод [88] и другие. На рисунке 11 показана последовательность вычислений скоринговой функции, основанной на знаниях.

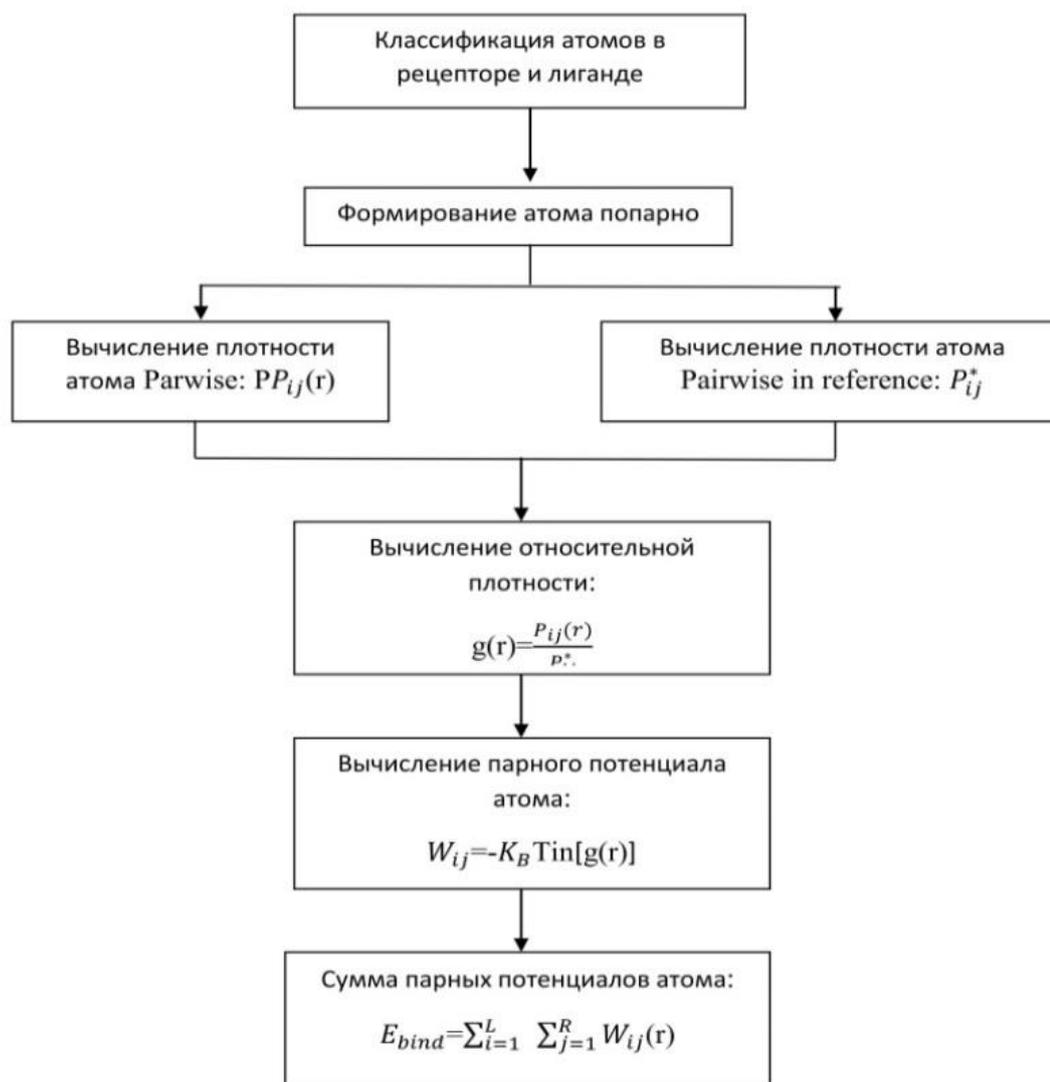


Рисунок 11 – Схема последовательности вычислений SF, основанной на знаниях

1.4.3 Подходы к *in silico* дизайну ингибиторов CDK8

Известно, что почти все известные соединения, проявляющие ингибирующую активность по отношению к CDK8, относятся к конкурентным ингибиторам, нацеленным на сайт связывания CDK8 с АТФ.

Известно, что в зависимости от связывания со структурой CDK8 существуют два класса ингибиторов: I и II типа.

Ингибиторы I типа, к ним относятся ингибиторы природного происхождения, например, кортистатин А, различные полициклические соединения, а также соединения на основе замещенного пиридина,

связываются с активной конформацией CDK8/Сус С и занимают всю область связывания АТФ. Также они образуют водородную связь с остатком Ala100 в шарнирной области, π - π – стэкинг-взаимодействие с остатком Phe97, Н-связи с остатками Lys52 или Asp173 и катион- π взаимодействие с Arg356. На рисунке 12 представлены мотивы связывания различных ингибиторов CDK8 I типа.

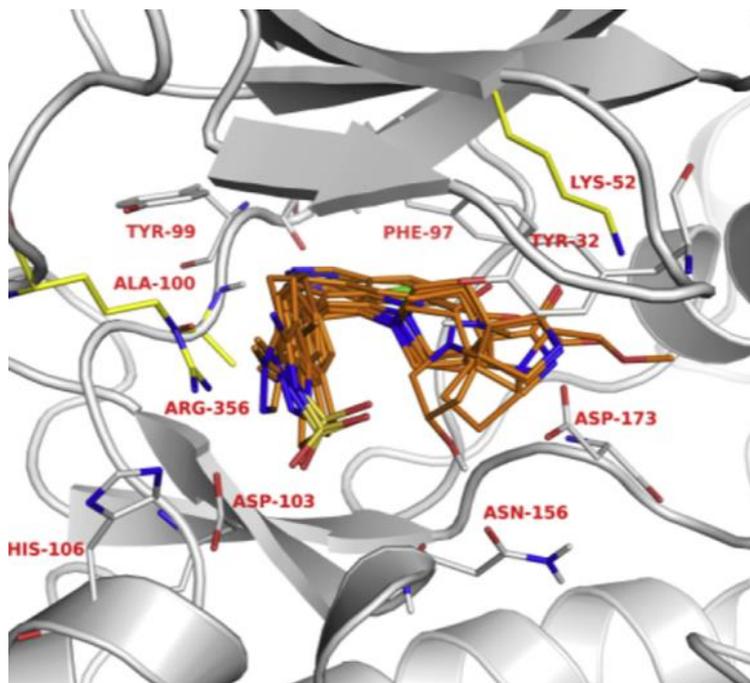


Рисунок 12 – Мотивы связывания различных ингибиторов CDK8 I типа

Но структуры кортистатина А и сенексина А расширяются к поверхности, доступной для растворителя, в месте связывания АТФ, образуя π - π – стэкинг-взаимодействие (сенексин А) или катионное взаимодействие (кортистатин А) еще с остатком Trp105 [89].

Ингибиторы типа II связывают DMG- out конформацию CDK8/СусС и занимают глубокий гидрофобный карман. К ним относятся ингибиторы с линкером мочевины, самым известным из которых является сорафениб. Данный тип ингибиторов CDK8 образуют водородные связи с остатками Lys52 и Glu66, нарушая образование солевого мостика между Lys52 и Glu66.

Наиболее отличительной особенностью ингибиторов CDK8 типа II является сильное гидрофобное взаимодействие с глубоким карманом, окруженным Leu70, Leu69, Val147, Leu73, Leu142, Val78 и Tyr32. Но сорафениб и образуют дополнительную водородную связь с Ala100 в шарнирной области. Мотивы связывания ингибиторов II типа (на примере сорафениба) с кристаллической структурой CDK8 представлены на рисунке 13 [90].

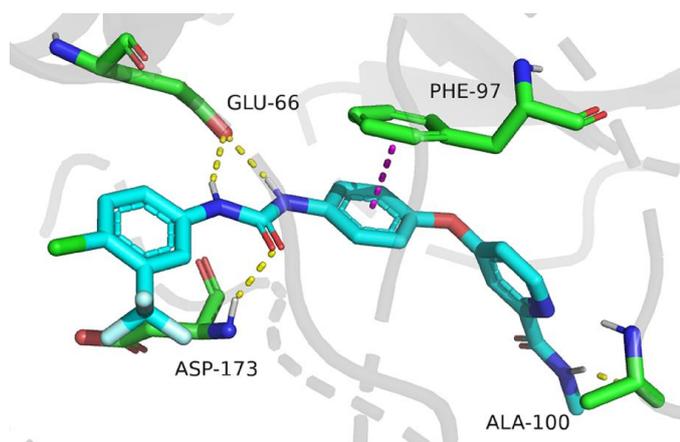


Рисунок 13 – Мотивы связывания сорафениба с кристаллической структурой CDK8 (PDB: 3RGF)

Шарнирная область – это основа для эффективного связывания ингибиторов, количество образованных в этой области водородных связей напрямую влияет на активность и селективность [91].

Передний карман содержит аминокислоты Trp105, His106 и Arg356 в зоне воздействия растворителя, он важен для определения селективности. Он проявляет повышенную селективность в отношении соединений, содержащих структуры, способные подвергаться катионированию. Важные для связывания ингибиторов области в структуре CDK8 представлены на рисунке 14 [92].

Описанные в этом разделе мотивы связывания играют ключевую роль в оценке афинности при *in silico* анализе. Ниже приведен пример

осуществления *in silico* подхода при разработке селективных ингибиторов CDK8.

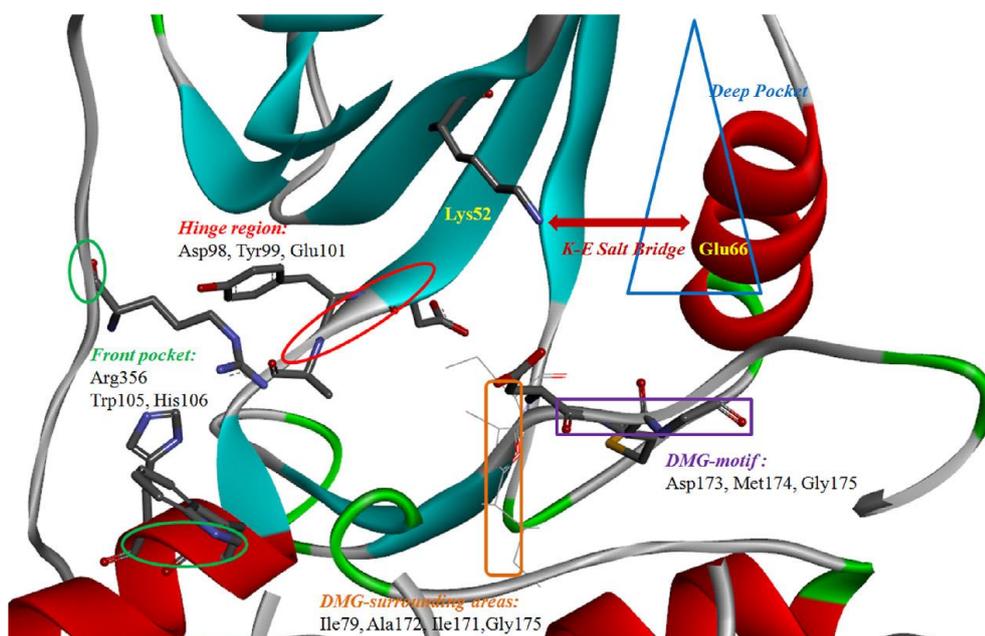


Рисунок 14 – Важные для связывания ингибиторов области в структуре CDK8

Авторы выполнили трехэтапный VS *in silico*, нацеленный на многокристаллические структуры CDK8. Структуры соединений были отобраны из коммерческой библиотеки ChemDiv, содержащей 16×10^4 формул. Этапы осуществления данного *in silico* дизайна представлены на рисунке 15.

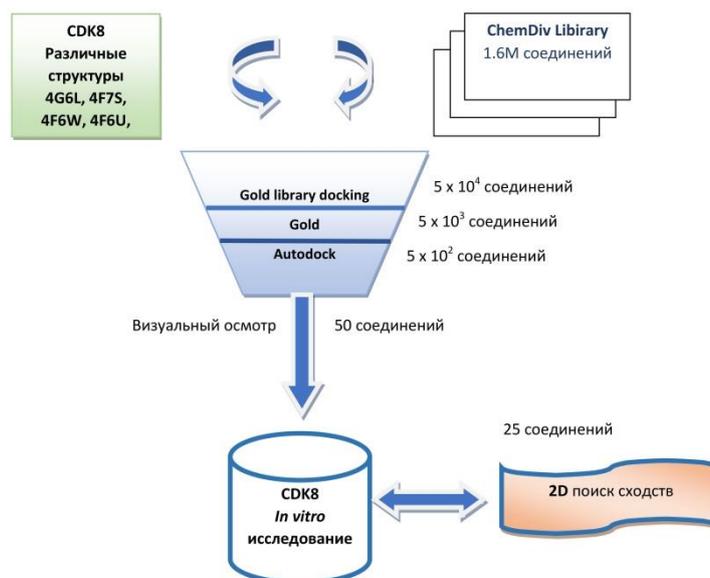


Рисунок 15 – Этапы осуществления *in silico* дизайна

Трехступенчатый анализ включал первоначальное использование метода автоматического виртуального скрининга GOLD, затем скрининг с использованием автоматического метода GOLD и третий этап - скрининг с использованием AutoDock.

На первом этапе VS все соединения в библиотеке ChemDiv были состыкованы с пятью wybranными структурами CDK8/СусС (коды PDB 4G6L, 4F7S, 4F6W, 4F6U и 3RGF) с использованием метода автоматического виртуального скрининга GOLD, реализованного в Discovery Studio 3.1., после чего 1×10^4 лучших соединений были сохранены на основе Goldscore Fitness в каждой структуре. Метод виртуального скрининга Gold был использован первым, потому что он достаточно удобен и оперативен для стыковки более 1×10^5 молекулярных библиотек.

Затем на втором этапе позы с самым высоким показателем пригодности по шкале Goldscore Fitness для этих сохраненных соединений были состыкованы с соответствующими кристаллическими структурами с

помощью автоматического метода Golds, и 1×10^4 лучших соединений были сохранены.

На третьем этапе VS AutoDock использовался для проверки оставшихся соединений, после чего 100 лучших соединений были сохранены на основе оценки стыковки в каждой структуре.

После трех раундов виртуального скрининга было отобрано и исследовано в общей сложности 500 соединений. В процессе визуального отбора авторы удалили аналогичные структуры, которые были схожи со структурами ингибиторов против других киназ, и также исключили соединения с неверными способами связывания.

Затем 50 соединений были приобретены в ChemDiv для осуществления *in vitro* анализа. На основании результатов этого анализа, авторы провели двумерный поиск сходств, чтобы найти аналогичные структуры с уже известными по результатам виртуального скрининга ингибиторами CDK8.

Затем 25 соединений-хитов, полученных в результате поиска сходств, были оценены с помощью GOLD и AutoDock, после чего отправлены на тестирование *in vitro* [89].

1.5 Удачные кейсы открытия ингибиторов CDK8

Функции CDK8/CycC в раковых клетках в настоящее время достаточно изучены, исходя из этого ясно, что ингибирование активности данной киназы является перспективной областью в медицинской химии. Первые ингибиторы CDK8 уже более 20 лет назад, но сейчас также активно ведется разработка новых низкомолекулярных соединений с улучшенной активностью, селективностью по отношению именно к CDK8, а также улучшенной метаболической стабильностью. Подходы к синтезу некоторых из них будут рассмотрены в следующих пунктах работы.

1.5.1 Ингибиторы CDK8 I типа

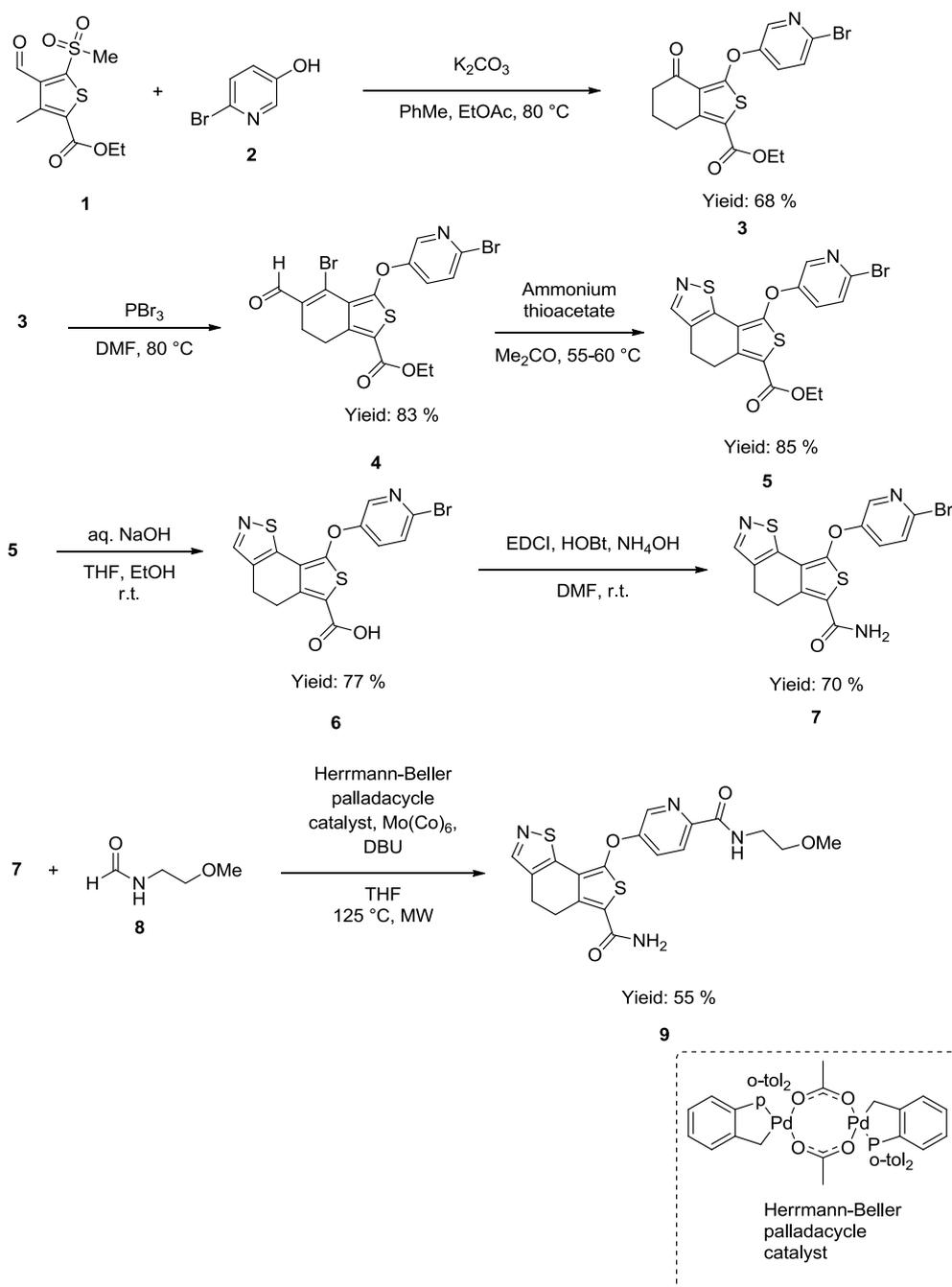
К ингибиторам CDK8 данного типа относятся ингибиторы природного происхождения, например, кортистатин А, различные полициклические соединения, а также соединения на основе замещенного пиридина, не имеющие линкер мочевины, из-за чего они не способны нарушить образование солевого мостика между Lys52 и Glu66, что характерно для ингибиторов II типа. Для них характерно связывание с активной конформацией CDK8/Cyc C, за счет чего они занимают всю область связывания АТФ. Далее будут приведены ингибиторы данного типа и подходы к их синтезу.

Ингибитор на основе производных изотиазола показал противоопухолевую эффективность (значение $IC_{50} = 0.46$ нМ при ингибировании активности CDK8) в модели лимфоидного ксенотрансплантата человека RPMI8226.

Синтез целевого соединения производного изотиазола **9** начинается с взаимодействия производного – метилсульфоксида конденсированного тиофена **1** с 2-бромпиридоном-4 **2**, в ходе которого под действием основания образуется простая эфирная связь в соединении **3**. Далее оно подвергается действию бромида фосфора (III), после чего в конденсированном к тиофену гексаноновом цикле происходит бромирование по карбонильному атому углерода и альдегидной группы в соседнем положении, таким образом осуществляется синтез **4** соединения. Под действием аммония триацетата происходит конденсация с образованием тиазольного цикла в **5** соединении, **6** соединение образуется после гидролиза сложноэфирной группы. Далее под действием гидроксида аммония и активатора карбоновых кислот синтезируется амид **7**. И ключевая реакция данного синтеза – карбонилирование по Хеку в присутствии амида **8** с использованием катализатора Herrmann-Beller в сочетании с $Mo(CO)_6$ в качестве твердого источника CO в присутствии DBU обеспечивала хороший выход целевого

соединения **9**, которое обладало ингибирующей активностью по отношению к CDK8 [93]. Синтез данного соединения представлен на схеме 1.

Схема 1

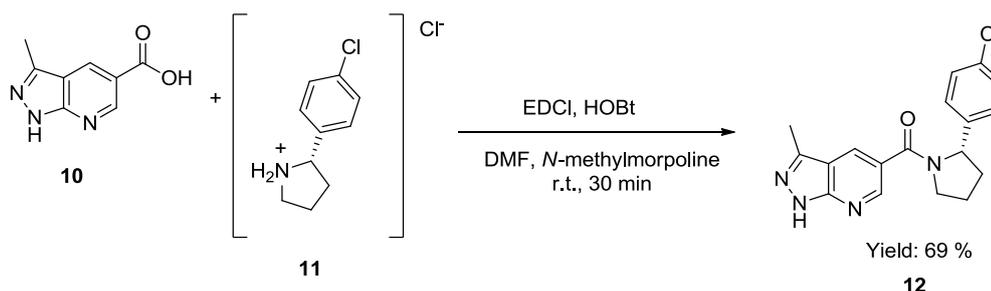


Другой новый ингибитор был открыт в результате успешной оптимизации соединений имидазо-тиадиазольного ряда, которые были

идентифицированы в высокопроизводительной скрининговой кампании как селективные ингибиторы CDK8. За несколько циклов оптимизации авторы улучшили микросомальную стабильность, активность ($IC_{50} = 2.6$ нМ) и селективность в отношении CDK8. Первоначальный каркас имидазотиадиазола был заменен на 3-метил-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]-пиридин, что привело авторов к соединению MSC2530818, которое влияло на фосфо-STAT1, то есть фармакодинамический биомаркер активности CDK8, и ингибировало роста опухоли у мутанта *APC SW620*. Кроме того, данное соединение обладало микросомальной стабильностью и биодоступностью.

Синтез данного ингибитора представлен на схеме 2.

Схема 2



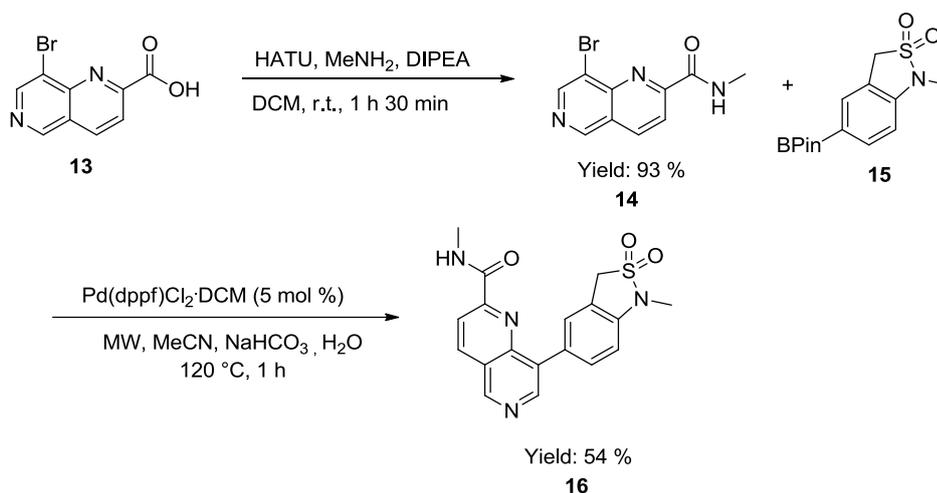
Исходные соединения – 3-метил-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-карбоновая кислотой **10** и (*S*)-2-(4-хлорфенил)пирролидина гидрохлорид **11** под действием активаторов карбоновых кислот вводились в реакцию амидирования с образованием целевого соединения **12** – [(2*S*)-2-(4-хлорфенил)пирролидин-1-ил]-(3-метил-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)метанона [94].

Другое открытие нового ингибитора CDK8 было основано на подходе скаффолд-хоппинг. За основу был взят уже прошедший клинические испытания ингибитор CDK8 - CCT251545. Авторы заменили пиридиновый скаффолд на изохинолиновый. И после проведения оптимизации был открыт ингибитор, продемонстрировавший устойчивое ингибирование ($IC_{50} = 0.9$

нМ) фосфорилирования STAT1 – биомаркера ингибирования CDK8 в модели ксенотрансплантата опухоли человека колоректальной карциномы SW620.

Синтез данного ингибитора представлен на схеме 3.

Схема 3



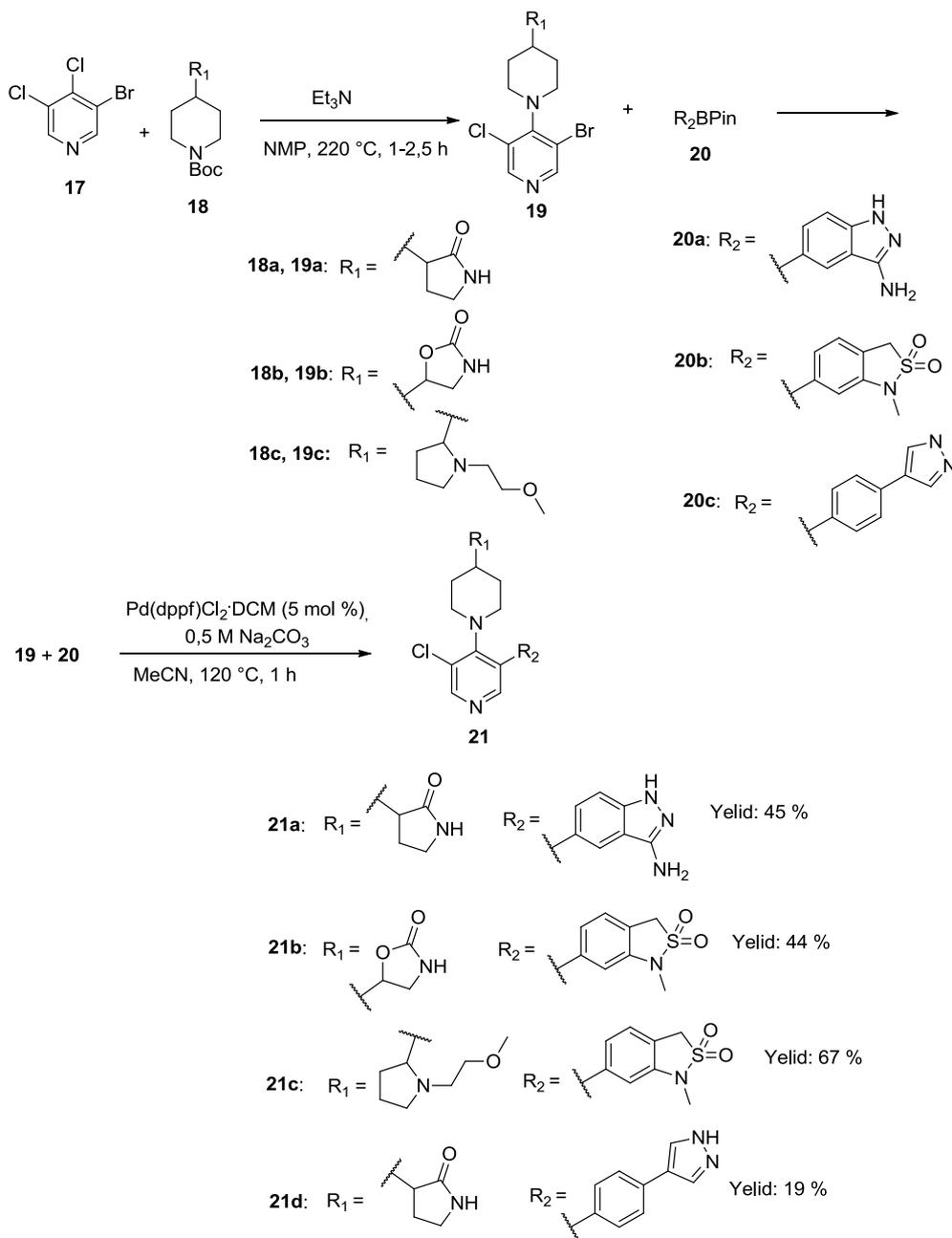
Исходное соединение – коммерчески доступная 8-бром-1,6-нафтиридин-2-карбоновая кислота **13**, из которой под действием активатора карбоновых кислот и триметиламина был синтезирован амид **14**. Далее он вводился в кросс-сочетание по Сузуки с 1-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1,3-дигидробензо[*c*]изотиазол 2,2-диоксидом **15** для образования целевого соединения - *N*-метил-8-(1-метил-2,2-диоксидо-1,3-дигидробензо[*c*]изотиазол-5-ил)-1,6-нафтиридин-2-карбоксамид **16** [95].

Самым известным ингибитором на основе замещенного пиридина является перорально биодоступная малая молекула CCT251545. Синтез данного соединения CCT251545 – **21d** (код PDB: 5BNJ) и его производных **21a** (IC₅₀ = 1.7 нМ, PDB код 5FGK), **21b** (IC₅₀ = 2.3 нМ, PDB код 5HBE), **21c** (IC₅₀ = 49.2 нМ, PDB код 5HBN) представлены на схеме 4.

Исходное соединение для всех производных аминопиридина – 5-бром-3,4-дихлорпиридин **17**. Он вводился в S_NAr-опосредованное замещение различными аминами **18a**, **18b**, **18c** хлора в положении С4 пиридина с

образованием продуктов замещения **19a**, **19b**, **19c** соответственно, которые вводили в Pd – катализируемое кросс-сочетание по Сузуки с различными эфирами бороновых кислот **20a**, **20b**, **20c**, в ходе чего образовались целевые соединения **21a**, **21b**, **21c** или **21d** - ССТ251545 [96].

Схема 4



Изначально ССТ251545 была обнаружена в результате высокопроизводительного скрининга, она показала селективность

ингибирования CDK8 и CDK19 с $IC_{50} = 7.2$ нМ в анализе Lanthascreen TR-FRET [97]. Также было обнаружено, что это соединение проявляет > 100-кратную селективность в отношении 291 других киназ [98].

Дальнейшая оптимизация соединения CCT251545 для улучшения метаболической стабильности привела к идентификации нового ингибитора этой серии – CCT251921 (PDB код: 5HBJ). Биодоступность данного вещества составляет от 30 до 68 %. Это соединение показало сильное сродство к CDK8 (значение $IC_{50} = 2.3$ нМ в анализе Lanthascreen TR-FRET) и продемонстрировало значительное ингибирование показаний на основе репортеров, измеряющих базальную активность пути WNT в линиях раковых клеток человека: LS174T (β -мутант катенина) – клетки с эпителиальной морфологией, аденокарцинома, колоректальный рак; SW480 – выделены из толстой кишки пациента с колоректальным раком Dukes C; Colo205 (мутант APC) – состоит из эпителиальных клеток, выделенных в 1975 году из асцитической жидкости, полученной от 70-летнего белого мужчины с раком толстой кишки и PA-1 (тератокарцинома человека) – представляет собой клеточную линию с эпителиальной морфологией, которая была выделена из яичника.

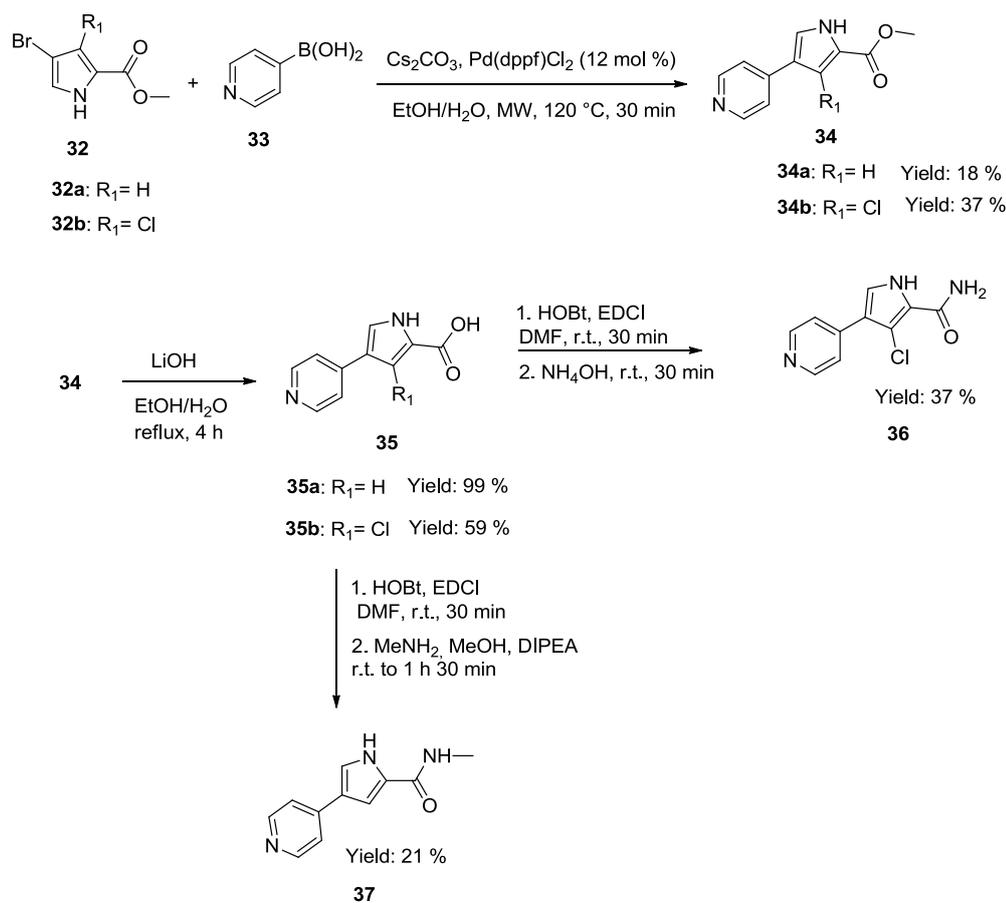
Синтез CDK8 ингибитора CCT251921 представлен на схеме 5.

Исходным соединением для синтеза является 4-хлорпиридин-2-амин **22**. Его последовательно галогенировали по C5 и C3 положениям с *N*-бромсукцинимидом с получением соединения **23** и с *N*-хлорсукцинимидом для получения **24** соединения – 5-бром-3,4-дихлорпиридин-2-амин. Далее аминогруппа была защищена 4-метоксибензилом **25** с образованием как моно-, так и дизамещенных форм, второй тип соединения оказался основным продуктом **26** с выходом 66%. После чего это соединение подвергли воздействию микроволн в присутствии соединения **27** для осуществления нуклеофильного ароматического замещения хлора в положении C4. Фторид калия использовался для облегчения вытеснения через галогенид (т. е. превращение 4-Cl в 4-F, который был лучшей уходящей группой), таким

начали с использования скрининга на основе фрагментов с последующим подходом «SAR по каталогу», где были найдены низкомолекулярные соединения – потенциальные ингибиторы CDK8. После осуществления *in silico* анализа и последующей оптимизации фрагментов авторы идентифицировали соединения 5XS2 и 5XQX (код в RCSB PDB), как селективные и активные ингибиторы, имеющие значения $IC_{50} = 5$ нМ и 410 нМ соответственно при ингибировании активности CDK8. Соединение 5XS2 показало > 1500-кратное улучшение эффективности по сравнению с первоначальным фрагментом.

Синтез данных ингибиторов CDK8 представлен на схеме 6.

Схема 6



Исходным соединением для синтеза является замещенный пиррол **32**, который подвергается кросс-сочетанию по Сузуки с пиридин-4-бороновой

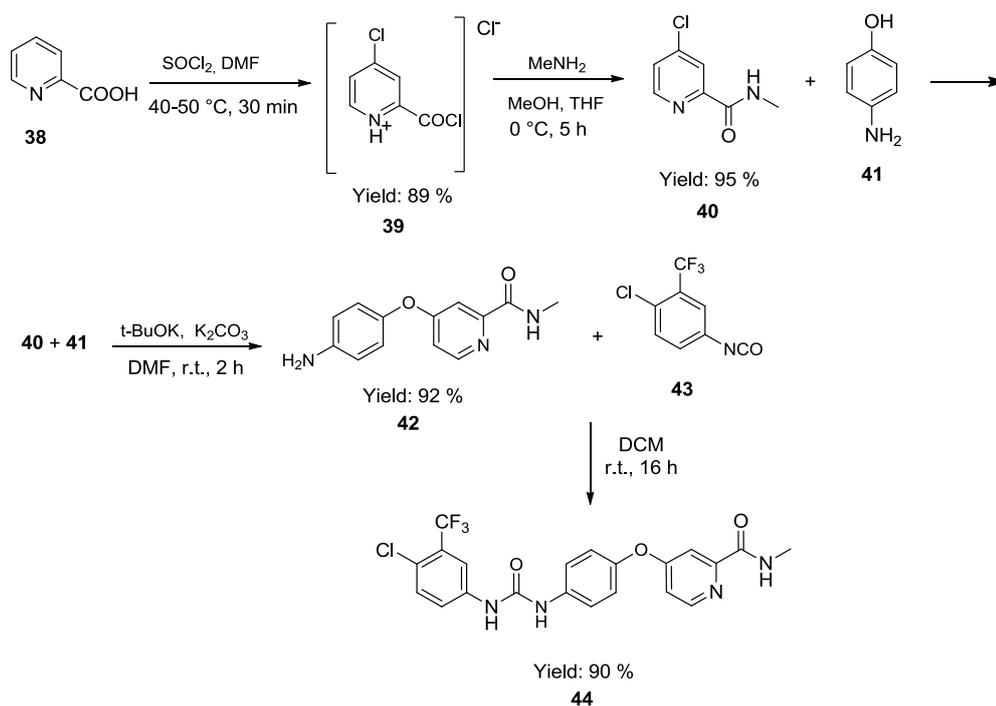
кислотой **33**, в ходе чего образуется продукт реакции **34**. Далее его подвергают гидролизу для образования карбоновой кислоты **35**, которая под действием активаторов карбоксильной группы и соответствующего амина, с последующим снятием *трет*-бутоксикарбоксихарбонильной защитной группы образует целевые продукты **36** (код PDB: 5XS2) и **37** (код PDB: 5XQX) [99].

1.5.2 Ингибиторы CDK8 II типа

Отличительной чертой ингибиторов данного типа является наличие линкера мочевины. Абсолютно для всех ингибиторов CDK8 II типа характерно связывание DMG-out конформации CDK8/CycC, это сопровождается образованием водородных связей с остатками Lys52 и Glu66, что нарушает образование солевого мостика между Lys52 и Glu66, и сильное гидрофобное взаимодействие с глубоким карманом в структуре CDK8/CycC.

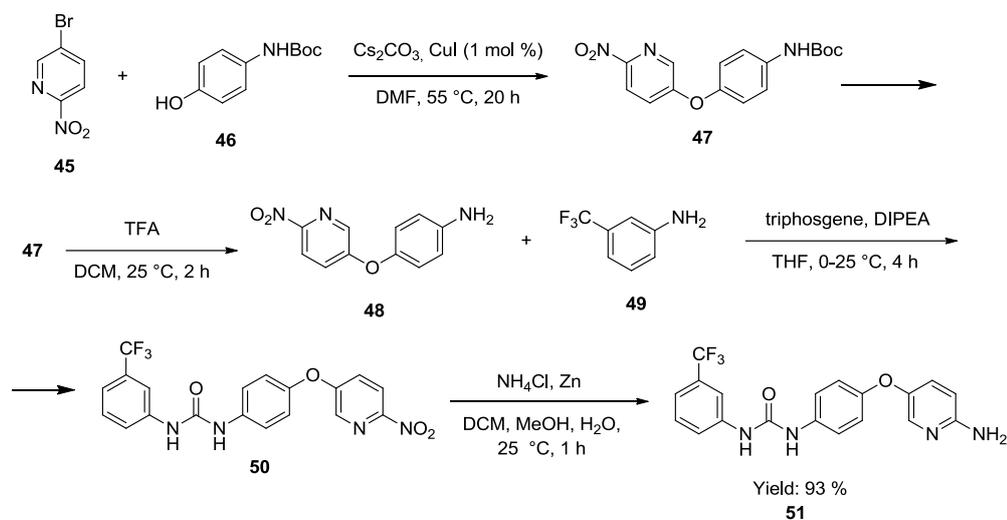
Сорафениб (BAУ-43-9006) — препарат, одобренный «Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США», применяется для лечения нерезектабельной гепатоцеллюлярной карциномы и прогрессирующей почечно-клеточной карциномы. В продаже известен под торговой маркой «Нексавар» [100]. Данный препарат является мультикиназным ингибитором, но есть доказательства того, что сорафениб связывается с шарнирной областью CDK8, индуцируя DMG-out конформацию [101].

Синтез сорафениба со значением $IC_{50} = 0.13$ мМ ингибирования CDK8 представлен на схеме 7. Пиколиновую кислоту **38** нагревали с тионилхлоридом в безводном *N,N*-диметилформамиде для получения гидрохлоридной соли **39** с выходом 89%. Далее он был превращен в 4-хлор-*N*-метилпиколинамид **40** с выходом 95% при реакции с метиламином в тетрагидрофуране. 4-(4-аминофенокси)-*N*-метилпиколинамид **42** был синтезирован при добавлении 3-аминофенола **41** к **40** соединению. В итоге сорафениб **44** был получен с отличным выходом путем проведения реакции **42** с соответствующим фенилизотиоцианатом **43** в дихлорметане (схема 7) [102].



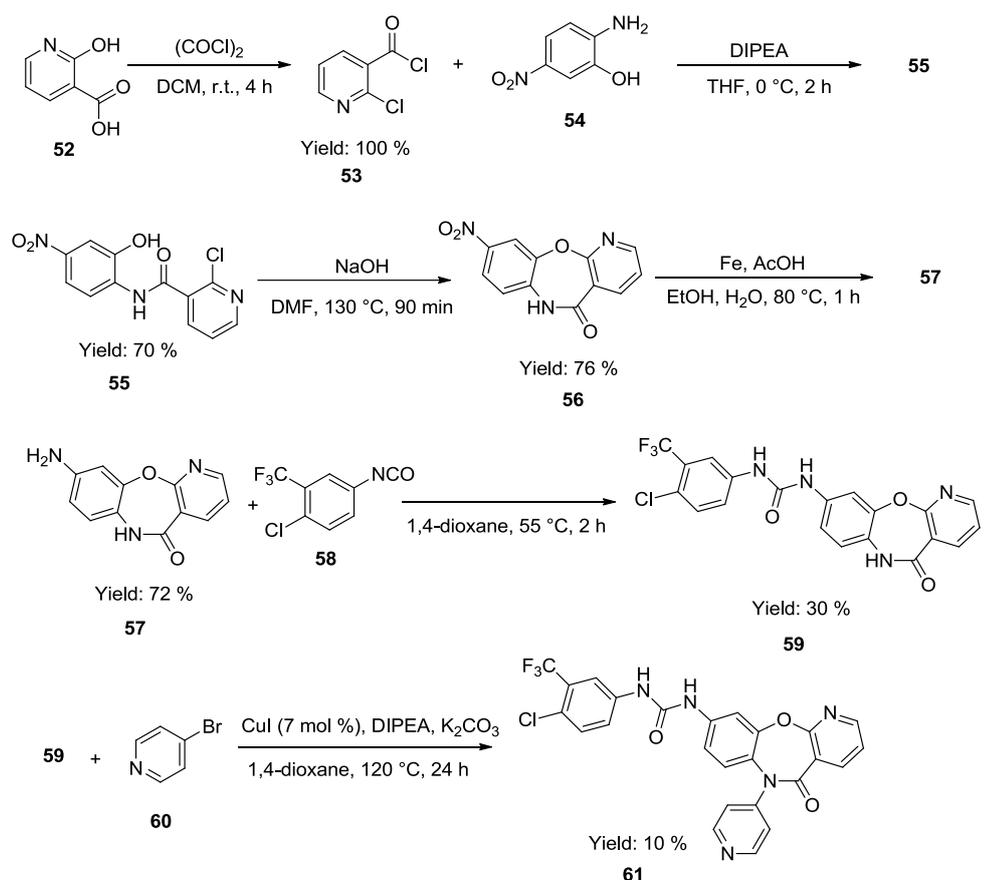
Авторы недавно опубликованной статьи сообщают о синтезе нового ингибитора CDK8, содержащего линкер мочевины, характерный для ингибиторов II типа. Также авторы провели тесты *in vivo*, доказывающие активность данного соединения. На схеме 8 показана последовательность реакций, приводящих к целевому соединению **56** со значением $IC_{50} = 46.5$ нМ по отношению к CDK8, при этом оно является селективным, так как значение IC_{50} для других типов CDKs значительно больше.

Исходное вещество – 5-бром-2-нитропиридин **45** вводят в реакцию Ульмана с 3-аминофенолом **46** с *трет*-бутилкарбоматной защитой аминогруппой для образования соединения **47**. После осуществления снятия защитной группы образуется соединение **48**, далее оно вводится в реакцию с 3-(трифторметил)анилином **49** под действием трифосгена в присутствии основания, что приводит к образованию мочевинового линкера в **50** соединении. После чего осуществляют восстановление нитрогруппы в пиридиновом кольце, тем самым приводя синтез к целевому соединению **51** (схема 8) [103].



Авторы недавно опубликованной статьи сообщают об открытии нового трициклического ингибитора CDK8 – пиридо[2,3-*b*][1,5]бензоксазепин-5(6*H*)-она, разработанного на основе прошедшего клинические испытания мультикиназного ингибитора – сорафениба, проявляющего ингибирующую активность по отношению к CDK8, путем усложнения его структуры. После оценки связывания и проведения оптимизации авторы пришли именно к этому ингибитору, так как он показал отличную селективность и ингибирующую активность со значением $IC_{50} = 8.25$ нМ. Данный ингибитор показал умеренное снижение фосфорилирования субстрата STAT1 за счет подавления активности CDK8 в клеточных анализах, что характерно и для других зарегистрированные ингибиторов CDK8 типа II.

Синтез данного ингибитора представлен на схеме 9.

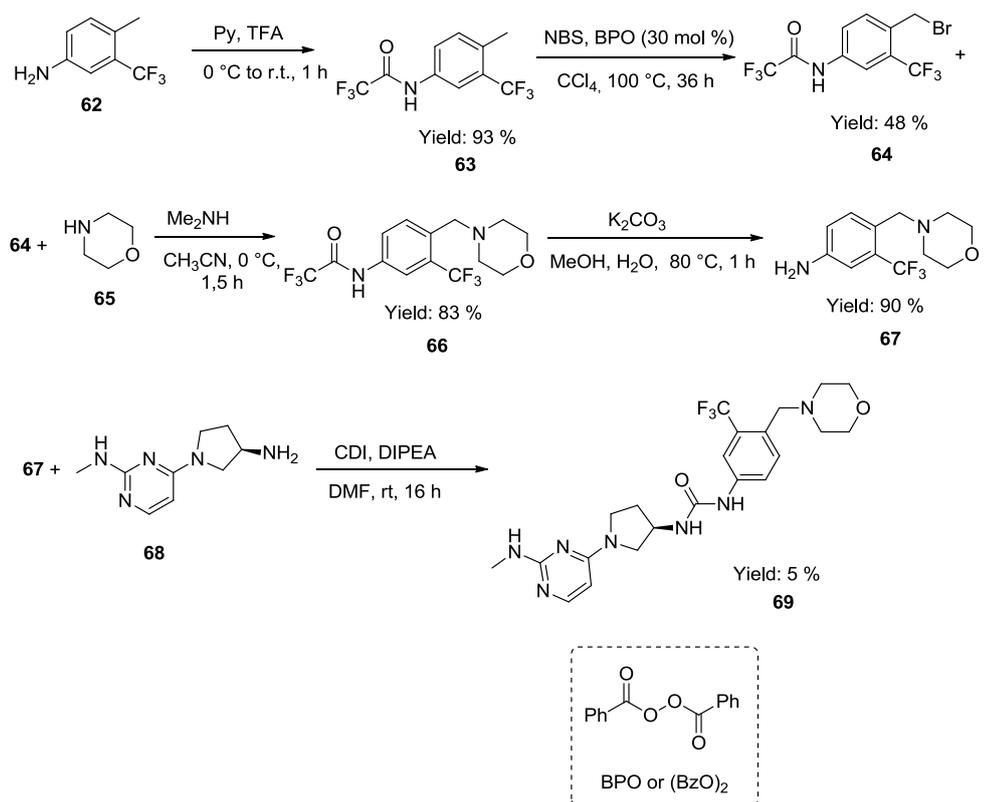


Исходным соединением для данного синтеза была 2-гидроксиникотиновая кислота **52**, которая после обработки оксалилхлоридом была превращена в соответствующий хлорангидрид **53**. Этот промежуточный продукт затем подвергали реакции с 2-амино-5-нитрофенолом **54** с получением бензамида **55**. Последующая обработка щелочью в DMF приводит к образованию трициклического производного **56** с хорошим выходом, соединение **57** образуется путем восстановления нитрогруппы, затем его подвергали взаимодействию с 4-хлор-3-(трифторметил)фенилизотиоцианатом **58** в стандартных условиях с получением производного мочевины **59** с умеренным выходом. Далее его сочетание с 4-бромпиридином **60** в условиях медного катализа привело к получению целевого продукта **61** [104].

Другой ингибитор II типа – (*S*)-1-(1-(2-(метиламино)пиримидин-4-ил)пирролидин-3-ил)-3-(3-(трифторметил)фенил)мочевины морфолин был также разработан на структурно-ориентированной модификации сорафениба. Замена фенильного линкера пирролидиновым кольцом улучшает активность, селективность и растворимость. Добавление морфолина в пара-положение фенилмочевины значительно улучшило растворимость, сохранив при этом эффективность ($IC_{50} = 17.4$ нМ) и селективность. Сообщается, что данный ингибитор подавляет фосфорилирование STAT1 по Ser727.

Синтез данного ингибитора представлен на схеме 10.

Схема 10



Исходное вещество для синтеза – коммерчески доступный 3-трифторметил-4-метиланилин **62** обрабатывали трифторуксусным ангидридом и пиридином для получения *N*-(3-трифторметил-4-метилфенил)-2,2,2-трифторацетамида **63**, который далее подвергался бромированию под

действием NBS с получением **64** продукта, взаимодействующего с морфолином **65** под действием основания, что приводило к продукту нуклеофильного замещения **66**, который под действием K_2CO_3 превращался в замещенный фениламин **67**. При добавлении к нему активатора CDI в присутствии основания DIPEA происходило взаимодействие с (*S*)-4-(3-аминопирролидин-1-ил)-*N*-метилпиримидин-2-амином **68** до образования целевого соединения **69** [105].

Таким образом, как было описано в литературном обзоре, CDK8 имеет обширную биологическую роль, но, в первую очередь, ее стоит рассматривать как важный транскрипционный фактор и регулятор сигнальных путей Wnt, NOTCH, STAT и BMP/TGF- β , активация которых приводит к неограниченной пролиферации, характерной для раковых клеток.

Существенный вклад в разработку различных низкомолекулярных ингибиторов в последнее десятилетие вносит молекулярное моделирование, позволяющее предсказать аффинность и снизить затраты на начальных этапах разработки препаратов.

В настоящее время уже существуют различные соединения с доказанной ингибирующей активностью по отношению к CDK8, но часть из них, к сожалению, являются мультикиназными, поэтому открытие и синтез новых селективных ингибиторов CDK8 остается перспективным направлением в медицинской химии.

2 Результаты и их обсуждение

В настоящее время активно ведется разработка ингибиторов CDK8, так как гиперэкспрессия данной киназы замечена при различных видах онкологических заболеваний, а особенно при колоректальном раке, который стоит на третьем месте из наиболее часто диагностируемых злокачественным новообразованием во всем мире. Ежегодно регистрируется около 1.36 миллиона новых пациентов и почти 7×10^5 смертей [106]. Поэтому разработка новых селективных ингибиторов CDK8 была и остается перспективной.

Известно, что CDK8 участвует в регуляции транскрипции, в отличие от большинства других CDKs. Она может связываться с медиаторным комплексом или фосфорилирующими факторами транскрипции (TF) [12]. Следовательно, ингибируя ее активность, возможно вовсе не допустить синтез онкогенов, тем самым снизив скорость пролиферации раковых клеток. Транскрипционная роль CDK8 проявляется в регуляции различных сигнальных путей, таких как NOTCH [29], STAT [30] и Wnt/ β -катенин, особенно значимых для выживания раковых клеток [22].

Таким образом, дизайн и синтез новых селективных ингибиторов является значимым и перспективным.

Цель данной работы – поиск и дизайн структур новых ингибиторов с применением методов молекулярного моделирования.

Общий дизайн исследования включает этапы, представленные на рисунке 16. Первый этап включает выбор коммерческой виртуальной библиотеки соединений, а также подбор X-Ray структур CDK8/Сус С из RCSB PDB [107]. Виртуальный скрининг, представляющий из себя классическую «стыковочную воронку», состоит из трех стадий с постепенным увеличением точности докинга. Соединения, идентифицированные в качестве хитов в процессе HTVS, далее подвергались оценке аффинности с помощью MM GBSA [108] и индуцированному докингу для исследования поз в условиях подвижного сайта связывания

согласно алгоритму Glide IFD. Заключительным этапом данной работы является *in vitro* исследование активности найденных в результате *in silico* анализа соединений-хитов, то есть перспективных ингибиторов CDK8.

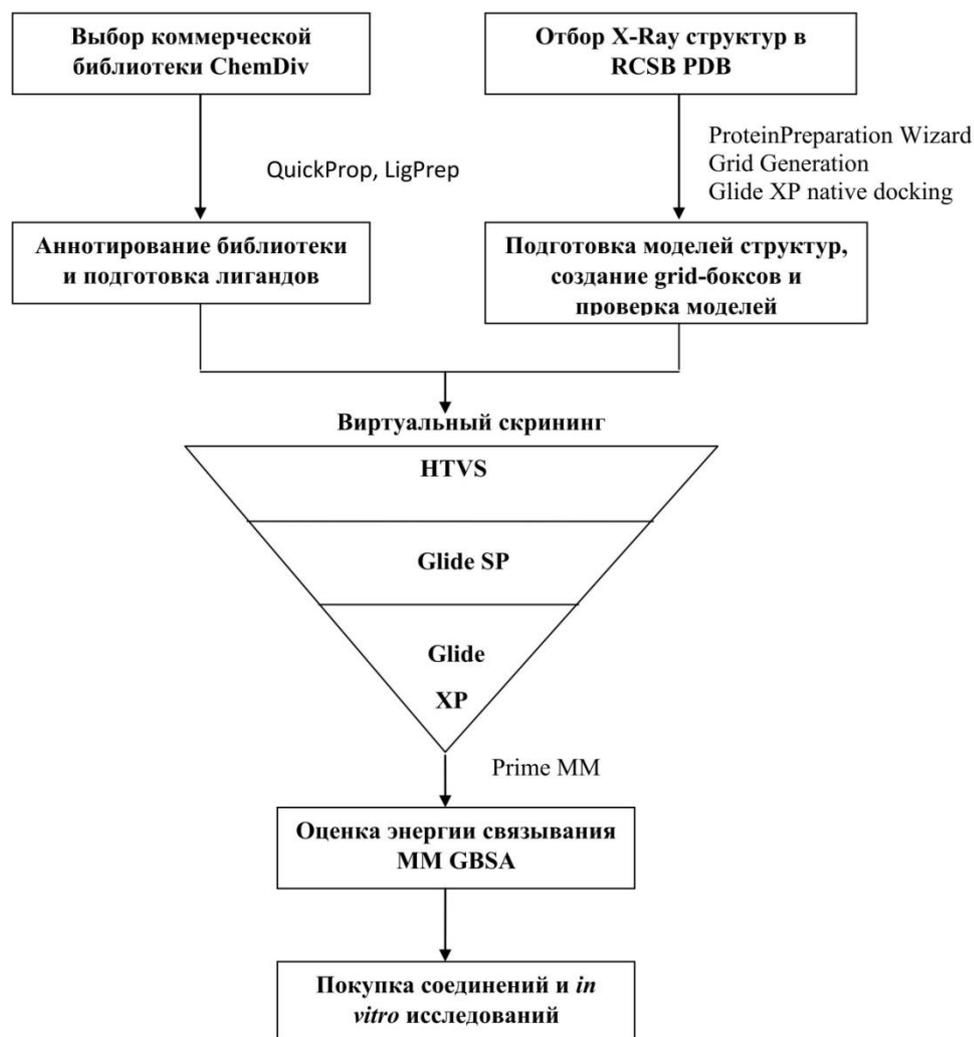


Рисунок 16 – Общий дизайн исследования

2.1 Аннотирование и подготовка библиотеки лигандов

Нами была проведена выгрузка коммерческих библиотек ChemDiv [109], включающих наборы различных мультикиназных ингибиторов. Данные сету соединений не содержали ковалентно-реактивных групп,

дубликатов, PAINS. Кроме того, предоставленные ChemDiv библиотеки уже обогащены соединениями с удовлетворительными уровнями структурного разнообразия.

Всего было загружено 4 различные библиотеки:

– библиотека фенотипического скрининга для идентификации мишени (*англ.* Target identification phenotypic screening library (TIPS)) [110];

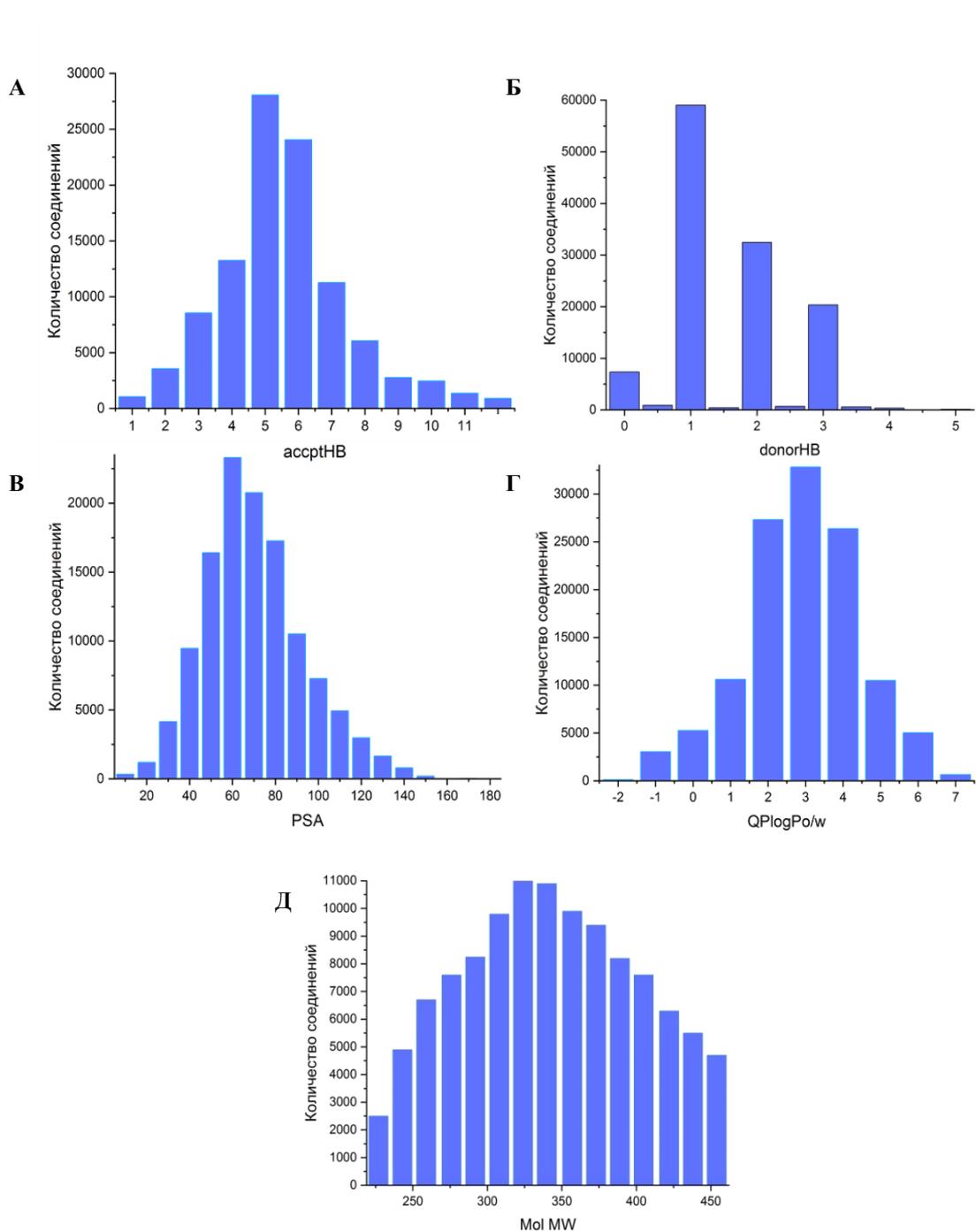
– аннотированная библиотека ингибиторов человеческих киназ (*англ.* Human kinase annotated library) [111];

– библиотека ингибиторов протеинкиназ (*англ.* Protein kinases inhibitors library) [112];

– библиотека на основе структурно разнообразных 3D-фармакофоров (*англ.* 3D-pharmacophore based diversity library) [113].

Они были объединены в один набор, трехмерные структуры и состояния протонирования определены с помощью модуля LigPrep [114], после чего с использованием модуля QuickProp [115] были рассчитаны различные физико-химические свойства представленных 24 тысячи соединений. Диаграммы распространения свойств, определенных правилами Липински [116] представлены ниже, на рисунке 17, где ось ординат на диаграммах показывает число соединений библиотеки, а ось абсцисс – диапазон значений свойства.

Как можно увидеть, объединенная библиотека целиком охватывает весь диапазон свойств.



А – количество акцепторов водородной связи, шт; Б – количество доноров водородной связи, шт; В – площадь полярной поверхности, Å²; Г – липофильность; Д – молекулярная масса, Да.

Рисунок 17 – Распределение свойств среди соединений библиотеки

2.2 Белковые мишени и нативный докинг

На данный момент в базе Protein Data Bank (PDB) [107] находится 31 кристаллическая структура CDK8/CycC с различными низкомолекулярными ингибиторами. Нами были выбраны четыре комплекса (коды и лиганды которых представлены на рисунке 18), имеющих разрешение менее трех Å, а также включающих разнообразные хемотипы ингибиторов, обеспечивающих различную геометрию и степень занятости сайтов. Структуры белков были подготовлены модулем Protein Preparation Wizard [117], который позволил удалить не нужные цепи и гетероатомы, добавить водороды и отсутствующие остатки. С помощью модуля Receptor Grid Generation определялась область стыковки. Для проведения нативного докинга сокристаллические лиганды были удалены из сайтов и пристыкованы вновь с помощью модуля Ligand Docking (оценочная функция Glide XP [118] в режиме конформационной подвижности малой молекулы). Ниже представлены структуры ингибиторов из отобранных комплексов: соединение **70** – 6TPA [104], **71** – 5IDN [94], **72** – 5HBE [98], **73** – 5CEI [119], **74** – 6QTG [120].

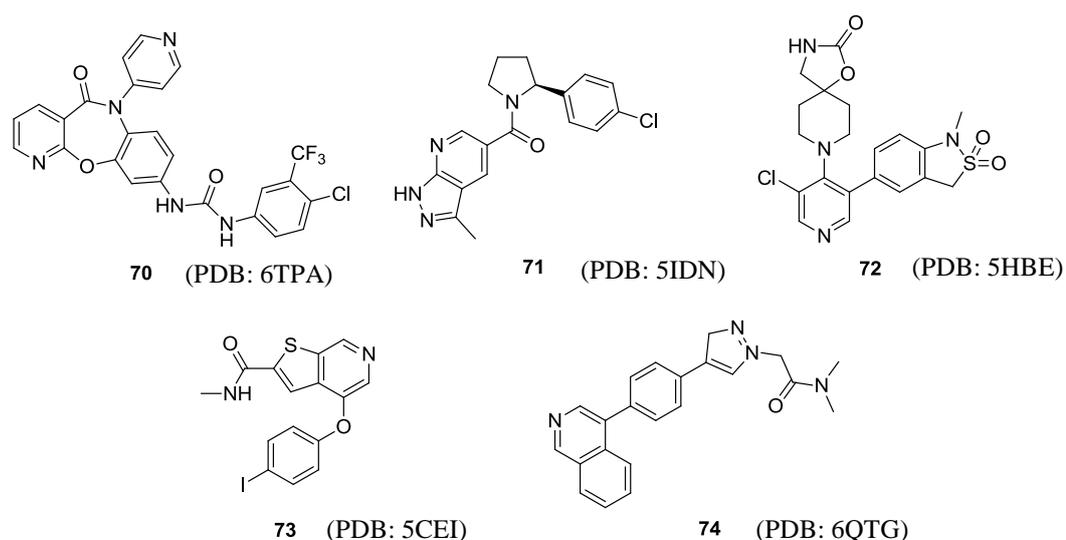
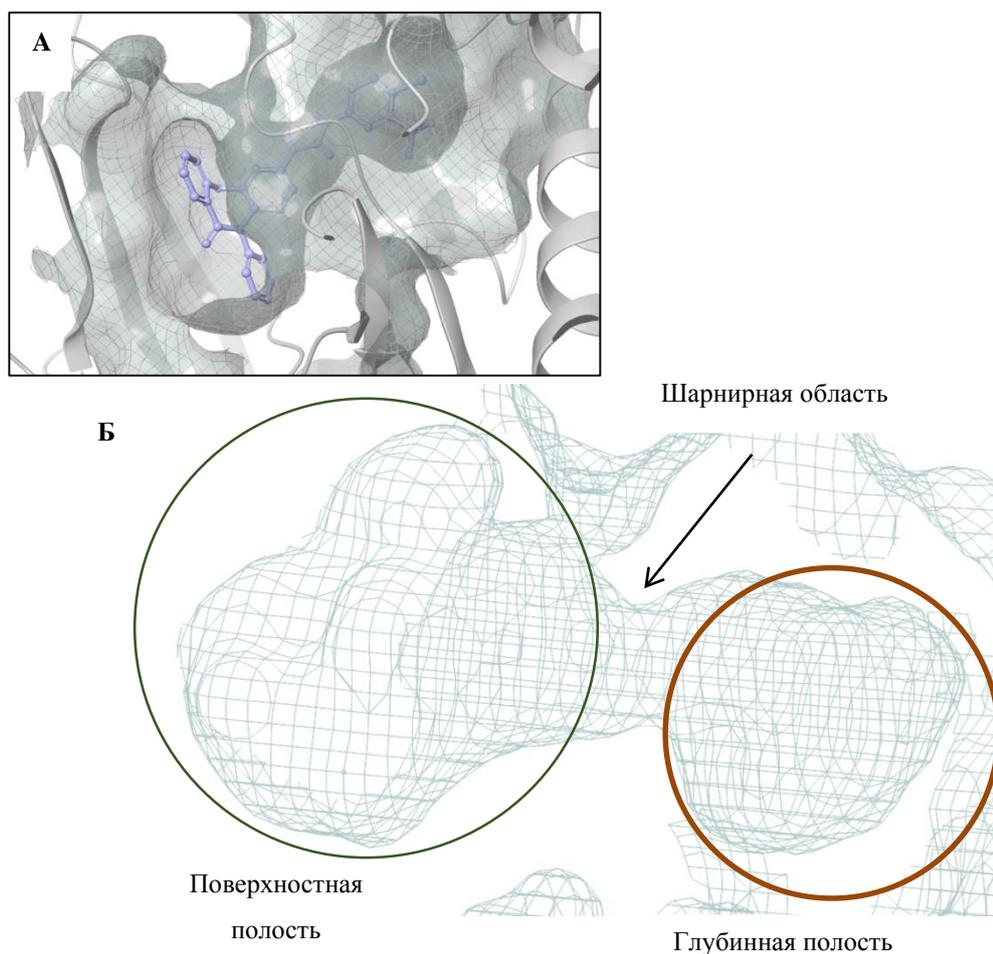


Рисунок 18 – Структуры нативных лигандов

Нами был проведен анализ сайта связывания с помощью модуля SiteMap [121], представленного в пакете Schrodinger. Объем сайта составляет $\sim 620 \text{ \AA}^3$, при этом можно выделить две области – поверхностный карман, который затем продолжается вглубь белка. Доступность для связывания глубинной полости является характерной чертой для конформации CDK в конформации DFG-out. Как было показано далее, лиганды, индуцирующие переход киназы в неактивную форму, то есть связывающиеся в глубоком кармане, проявляют наибольшую активность и наилучшие значения скоринга. Условные области активного сайта CDK8 представлены на рисунке 19.

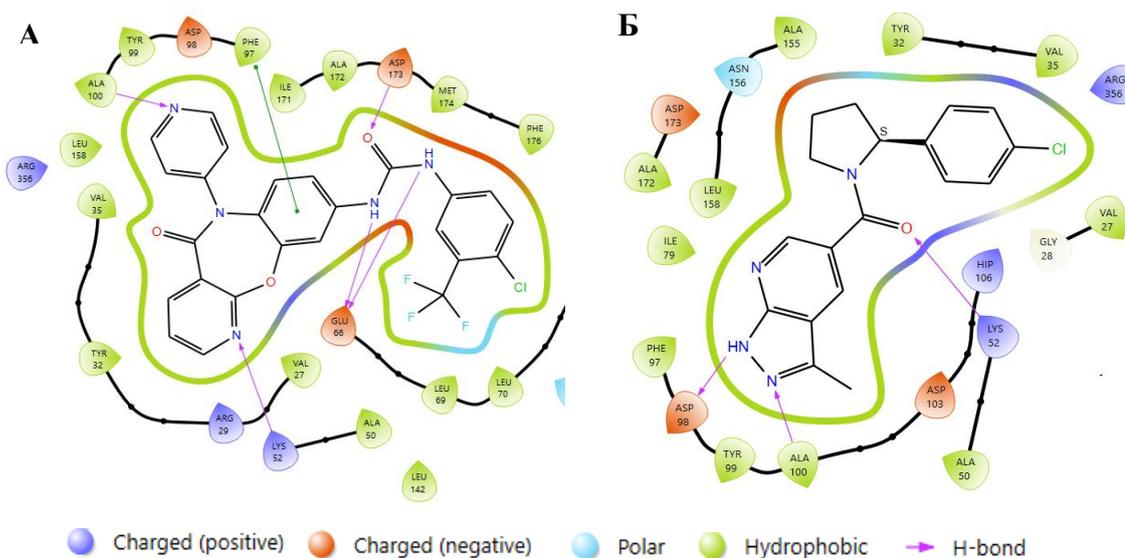


А – Расположение нативного лиганда (PDB ID: 6TPA) в сайте связывания CDK8;
Б – Области гидрофобного кармана CDK8.

Рисунок 19 – Сайт связывания CDK8 (PDB ID: 6TPA)

Комплекс 6TPA состоит из ингибитора **70**, имеющего мочевиный линкер, который включен в активный сайт CDK8. Среди проявляемых взаимодействий для данного комплекса можно выделить водородные связи с остатками Ala100, Lys52, Asp173 (доноры водородной связи) и с остатком Glu66, который является акцептором водородной связи, и образует важнейшее взаимодействие с мочевиным линкером, характерным для ингибиторов CDK8 II типа, а также π - π – стэкинг-подобное взаимодействие с Phe 97 (рисунок 20 А). После проведения нативного докинга были рассчитаны следующие значения скоринговой функции (Glide Score XP = -17.130 ккал/моль) и среднеквадратичного отклонения (RMSD = 0.491 Å).

Следующий комплекс 5IDN включает ингибитор **71** в активном сайте CDK8. В нем так же, как и в предыдущем комплексе, присутствуют водородные связи с остатками Ala100, Lys52, а также добавляется связь с Asp98 (рисунок 20 Б). Результат нативного докинга (Glide Score XP = -11.425 ккал/моль) подтверждает, что нативный лиганд воспроизводится в активном сайте белка с также минимальным отклонением (RMSD = 0.541 Å).

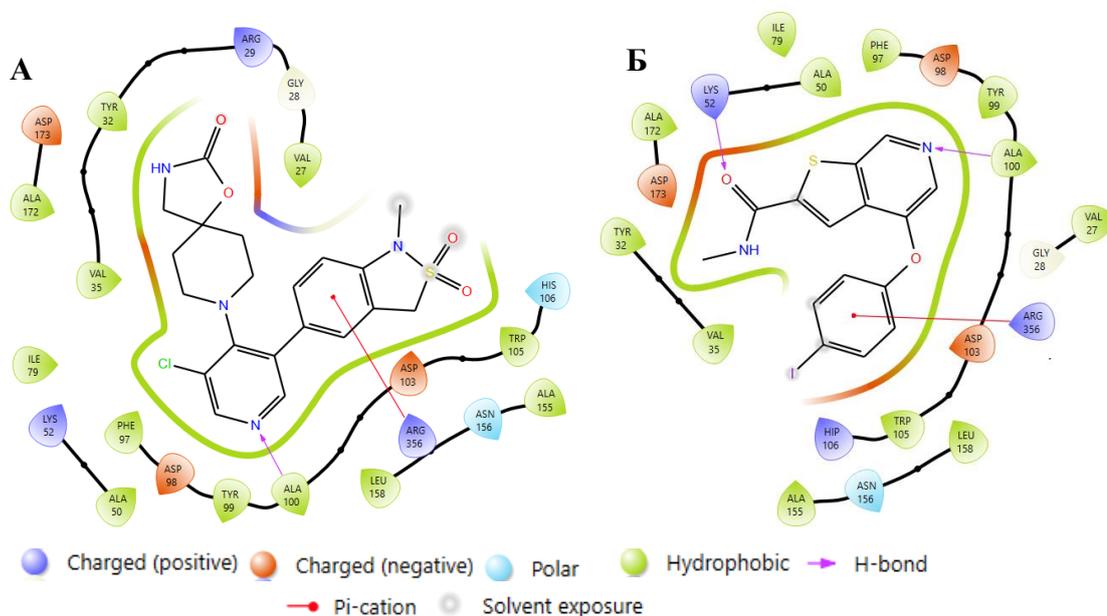


А – **70** (комплекс PDB ID: 6TPA); Б – **71** (комплекс PDB ID: 5IDN).

Рисунок 20 – Связывание нативных **70** и **71** лигандов в активном сайте CDK8

5HBE – третий комплекс, используемый для осуществления нативного докинга. Состав данного комплекса включает ингибитор **72** в активном сайте CDK8, в нем присутствует единственная водородная связь с Ala100, а также образуется π -катионное взаимодействие с Arg356 (рисунок 21 А). Стыковка лиганда с активным сайтом белка воспроизводится с минимальным отличием от первостепенного комплекса (RMSD = 0.585 Å, Glide Score XP = -10.111 ккал/моль).

Следующим комплексом в нативном докинге был комплекс 5CEI, который содержит ингибитор **73** в активном сайте. Важными аминокислотами для связывания в данном случае являются также Ala100 и Lys52, которые являются донорами водородных связей, и также присутствует характерное для предыдущего лиганда π -катионное взаимодействие с Arg356 (рисунок 21 Б). Значения Glide Score XP = -8.724 ккал/моль, RMSD = 0.286 Å, что доказывает стыковку лиганда с активным центром белка с минимальным отличием от первостепенного комплекса.



А – **72** (комплекс PDB ID: 5HBE); Б – **73** (комплекс PDB ID: 5CEI).

Рисунок 21 – Связывание нативных **72** и **73** лигандов в активном сайте CDK8

Последним комплексом, взятым в нативный докинг, является комплекс 6QTG, содержащий ингибитор **74** в активном сайте киназы CDK8. Ключевые взаимодействия обусловлены водородными связями с Ala100 и Arg29, а также π -катионным взаимодействием с Arg356 и π - π – стэкингом с His106 (рисунок 22). Значения Glide Score XP = -11.470 ккал/моль, RMSD = 0.488 Å.

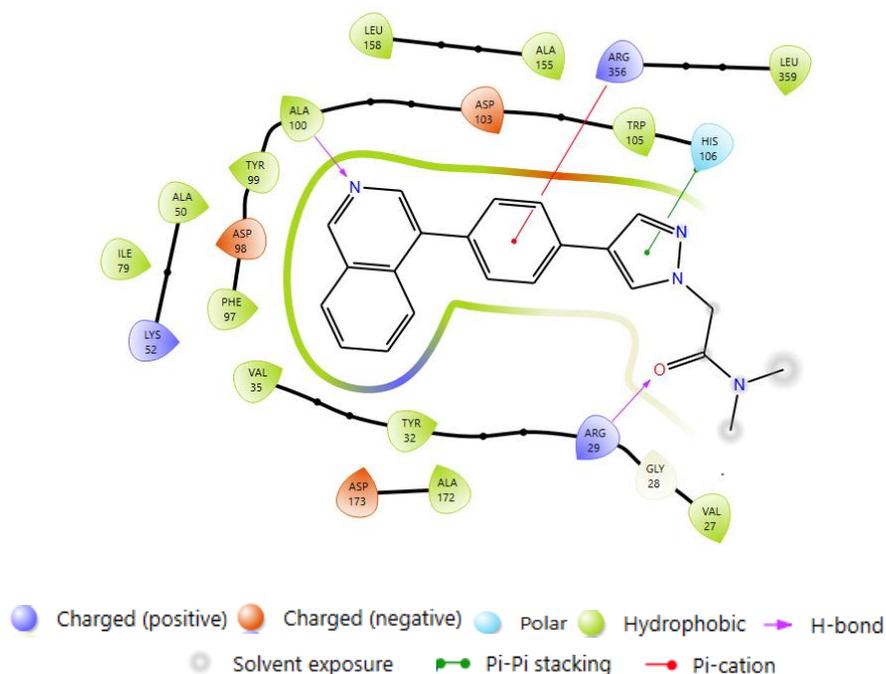


Рисунок 22 – Связывание лиганда **74** в комплексе 6QTG

Численные значения оценочной функции, среднеквадратичного отклонения и дескрипторов оценочной функции Glide в расширенном режиме XP для описанных выше лигандов представлены в таблице 1 (дескрипторы с нулевыми значениями не приведены). Такие результаты доказывают, что данные лиганды при проведении нативного докинга воспроизводятся с минимальным отклонением от изначальной стыковки (значения RMSD), следовательно, данные комплексы подходят для стыковки с исследуемыми соединениями.

Таблица 1 – Дескрипторы оценочной функции Glide в расширенном режиме XP для нативных лигандов

Дескрипторы оценочной функции Glide расширенном формате XP (ккал/моль)														
Код PDB	№ лиганда	Glide RMSD, Å	XP GScore	XP HBond	XP PhobEn	XP PhobEnHB	XP LowMW	XP RotPenal	XP Lipophilic EvdW	XP PhobEnPairHB	XP Electro	XP Sitemap	XP Penalties	XP Expos Penal
6TPA	70	0.491	-17.198	-2.255	-2.700	-1.500	0.000	0.160	-8.487	0.000	-1.236	-1.188	0.008	0.000
5IDN	71	0.541	-11.772	-2.168	-1.040	0.000	-0.364	0.147	-5.205	-1.950	-0.808	-0.400	0.016	0.000
5HBE	72	0.585	-9.932	-1.105	-0.709	-1.500	-0.004	0.085	-5.918	0.000	-0.806	-0.053	0.000	0.077
5CEI	73	0.286	-10.784	-0.784	-0.525	-1.500	-0.133	0.150	-5.223	0.000	-0.496	-0.226	0.000	0.000
6QTG	74	0.488	-11.470	-1.330	-2.125	-1.500	-0.312	0.258	-6.037	0.000	-0.422	-0.323	0.000	0.155

Нулевые дескрипторы в таблице не приведены.

XP GScore (ккал/моль) – общее количество баллов Glide Score;

XP HBond (ккал/моль) – награда за наличие водородных связей;

XP PhobEn (ккал/моль) – награда за соответствие гидрофобных атомов лиганда и рецептора;

XP PhobEnHB (ккал/моль) – награда за наличие водородных связей в гидрофобной полости рецептора;

XP LowMW (ккал/моль) – награда за небольшую молекулярную массу;

XP RotPenal (ккал/моль) – штраф за вращение лиганда;

XP LipophilicEvdW (ккал/моль) – награда за наличие гидрофобного потенциала на гидрофобных атомах лиганда;

XP PhobEnPairHB (ккал/моль) – награда за наличие коррелированных водородных связей в гидрофобной полости белка;

XP Electro (ккал/моль) – электростатические награды;

XP Penalties (ккал/моль) – штраф за десольватацию и внутрилигандные контакты.

XP ExposPenal (ккал/моль) – штраф за выход неполярных групп лиганда в область сайта, доступную для растворителя.

В качестве ключевого взаимодействия нами была идентифицирована водородная связь с Ala 100; все лиганды образуют эту связь за счет акцепторного атома пиридина (6TPA, 5HBE) или атома азота пиридинового типа (5IDN, 5CEI, 6QTG). Данный акцептирующий мотив во всех лигандах ориентирован одинаково (рисунок 23).

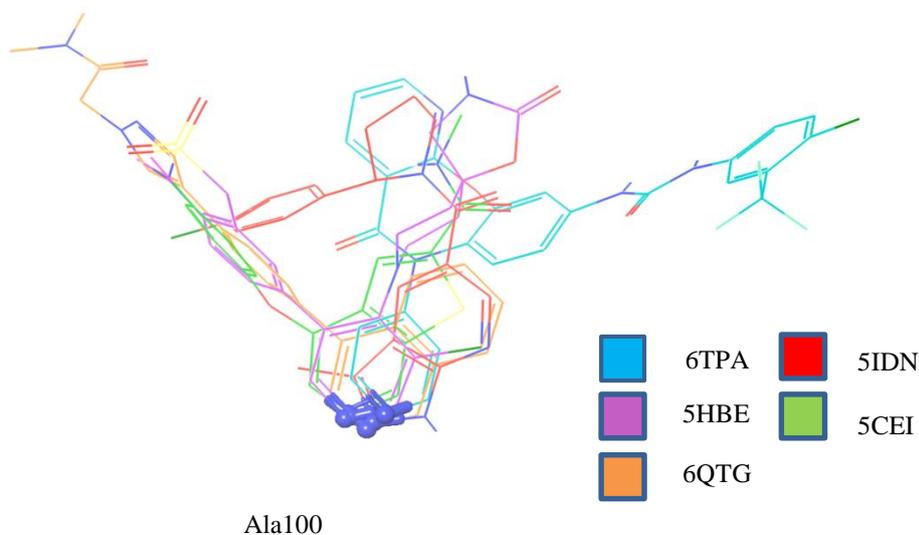
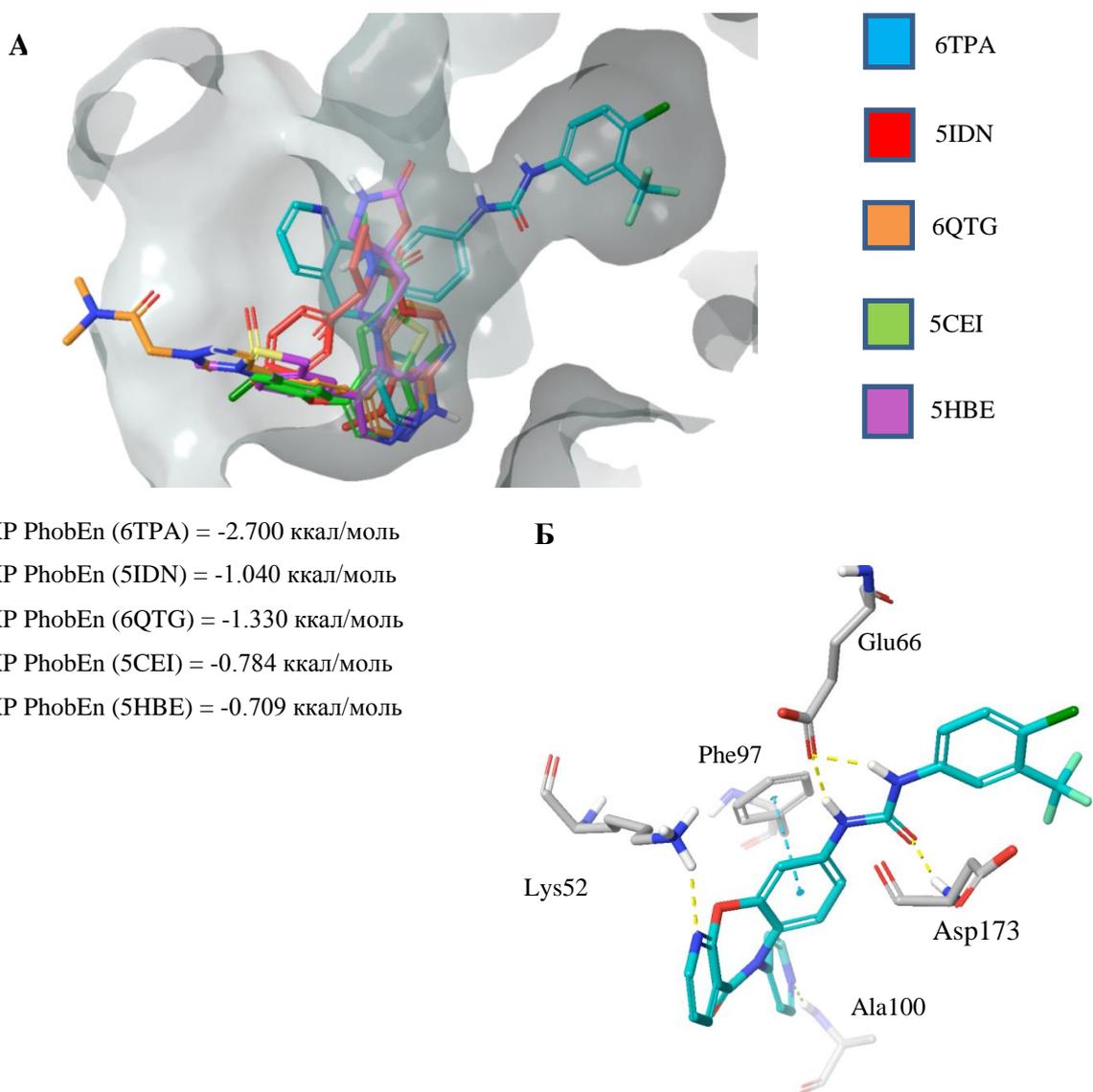


Рисунок 23 – Наложение структур нативных лигандов

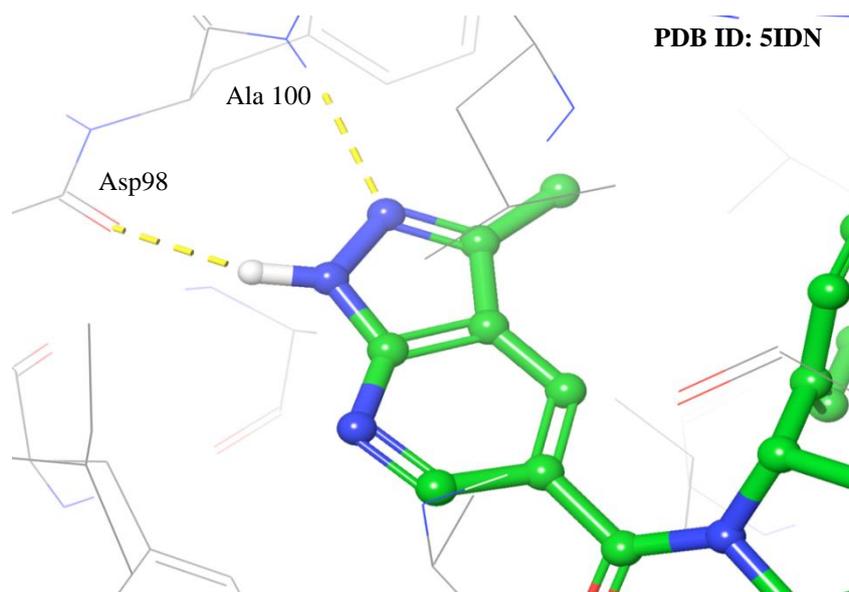
Все лиганды связываются в поверхностном кармане сайта, образуя там выгодное взаимодействие с Ala100, и только лиганд 6TPA за счет геометрии оксазепанового ядра и мочевинового линкера занимает глубинную полость, где образует важные взаимодействия с Glu и Asp (как было описано ранее), но главное – крайне обширные гидрофобные взаимодействия за счет трифторзамещенного ароматического цикла. Также заметно, что боковые цепи с атомами галогенов лигандов (в комплексах 5CEI, 5IDN, 6TPA) глубоко входят в гидрофобный карман (рисунок 24; значения дескриптора гидрофобности приведены в ккал/моль).



А – Расположение нативных лигандов в активном сайте;
 Б – Выгодное связывание в гидрофобном кармане лиганда комплекса 6TPA.

Рисунок 24 – Сравнение поз связывания нативных лигандов

Кроме этого, все структуры получают награды за образование водородных связей в гидрофобном кармане (см. значение дескриптора XP PhobEn НВ, ккал/моль) кроме лиганда 5IDN, которой образует коррелированные связи благодаря донорно-акцепторному ансамблю НВ, образуемых азаиндозольным ядром (рисунок 25).



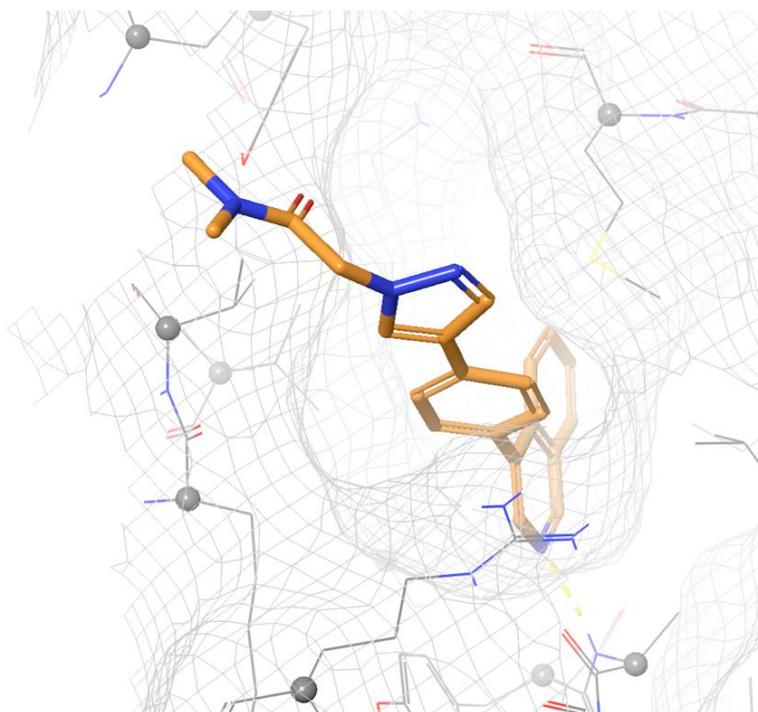
XP PhobEn Pair HB (5IDN) = -1.950 ккал/моль

Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 25 – Коррелированные водородные связи лиганда **71**

Все нативные лиганды, как было отмечено ранее, компактно умещаются в полости сайта – только соединение **74** простирает *N,N*-диметиламидный фрагмент в область, доступную для растворителя, при этом не образуя за счет него никаких взаимодействий с аминокислотной периферией кармана – данный факт объясняет значение штрафа за невыгодную сольватацию XP ExposPenal = 0.155 ккал/моль.

Ориентация нативного лиганда из комплекса PDB ID: 6QTG представлена на рисунке 26.



XP ExposPenal (6QTG) = 0.155 ккал/моль

Рисунок 26 – Ориентация лиганда **74** в область, доступную для растворителя

По результатам проведенного анализа связывающих конформаций нативного лиганда можно сделать следующие выводы:

- взаимодействие лиганда с Ala100 является важнейшим критерием, определяющим связывание лигандов с активным сайтом киназы. Причем акцепторные атомы, образующие эту водородную связь, должны быть включены в состав плоских гетероциклов, позволяющих занять гидрофобную полость. Наличие атомов галогенов, ориентированных вглубь этого входного кармана также может улучшить значение энергии связывания;

- ключевым взаимодействием для лигандов, имеющих мочевиный линкер, является образование водородных связей с Lys52 и Glu66, так как это приводит к разрушению солевого мостика, существующего между этими аминокислотами, что необходимо для проявления ингибирующей активности;

– наличие групп в центральном фрагменте лигандов, позволяющих занять дальний карман, как было показано в случае бТРА, будет крайне выгодно сказываться на значении скоринга.

2.3 Виртуальный скрининг и анализ результатов

С помощью модуля VirtualScreeningWorkflow был осуществлен трехстадийный процесс виртуального скрининга соединений библиотек в активный сайт CDK8 (в качестве рецептора нами была выбрана структура бТРА). Стыковочная воронка включала последовательный докинг, оценку и отбор соединений (Glide HTVS: сохранение 30% лучших соединений; Glide SP: сохранение 20%; Glide XP – сохранение 10% лучших). Заключительный этап был представлен оценкой свободной энергии связывания методом MM GBSA с помощью Prime [108].

По результатам виртуального скрининга лигандов с разными хемотипами, которые были загружены из четырех различных библиотек: библиотека фенотипического скрининга для идентификации мишени (*англ.* TIPS) [110], аннотированная библиотека ингибиторов киназ человека [111], библиотека ингибиторов протеинкиназ [112] и библиотека на основе структурно разнообразных 3D-фармакофоров [113], было идентифицировано 184 коммерчески доступных соединения, которые были разделены на 20 структурных кластеров, сформированных в соответствии с наличием общего скаффолда. Представленные в библиотеках структурные кластеры изображены на рисунке 27.

Также в библиотеки были соединения, которые не имели схожего хемотипа ни с одним из кластеров, и, следовательно, они не были отнесены ни к одному из них.

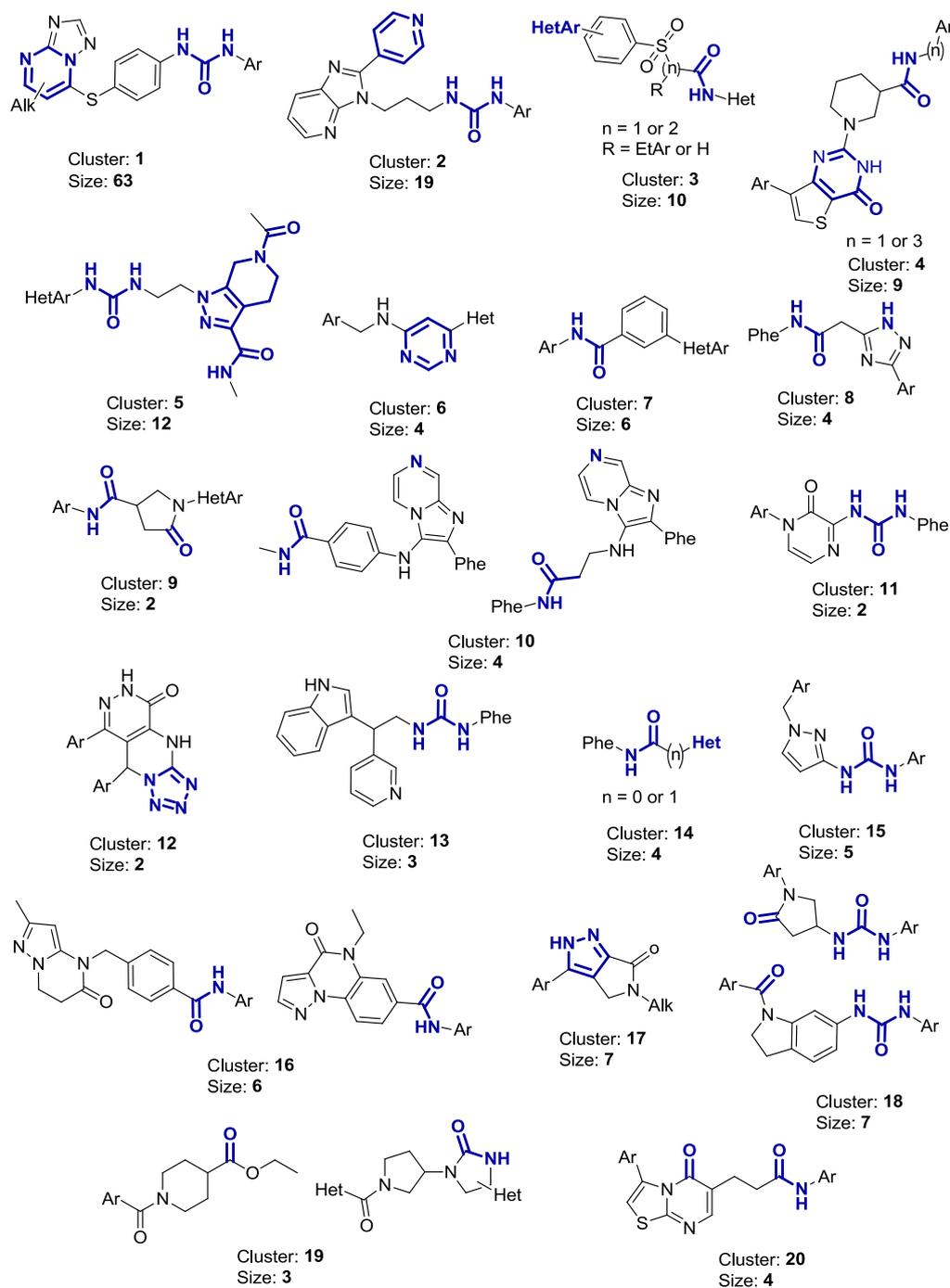
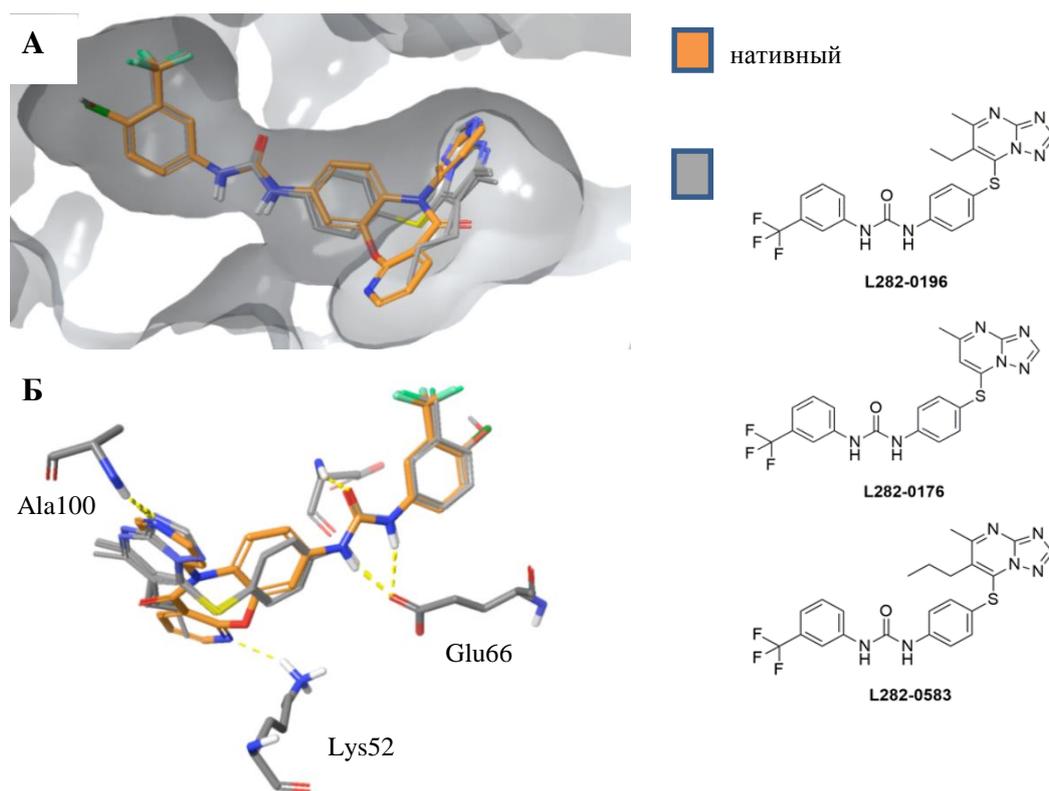


Рисунок 27 – Представленные в библиотеках структурные кластеры

Полные результаты виртуального скрининга представлены в приложении А (таблица А). Предвосхищая описание результатов, хотелось бы с сожалением отметить, что ни одно из соединений не смогло показать значения скоринга лучше, чем у нативного лиганда (XP GScore = -17.130 ккал/моль). Было обнаружено, что лиганды кластера №1 и №2 имели лучшее

значение XP GScore (ккал/моль) и средние значения MM GBSA = -86.50 ккал/моль. Все эти структуры имеют мочевиный линкер, который позволяет им проникать в глубинную полость гидрофобного кармана в конформации DMG-out CDK8, а также занимать шарнирную область, что напрямую влияет на активность. Эти области в сайте связывания CDK8 представлены на рисунке 19.

Заметно, что лиганды кластера №1 достаточно хорошо воспроизводят позу нативного лиганда из комплекса с PDB: 6TPA в глубинной полости гидрофобного кармана и в шарнирной области, а в поверхностной – наблюдается некоторая конформационная подвижность, за счет чего лиганды теряют водородные связи с Lys52 в отличие от нативного (рисунок 28).



А – Расположение L282-0196, L282-0176, L282-0583; Б – Связывание L282-0196, L282-0176, L282-0583 в активном сайте CDK8 (PDB: 6TPA): желтым пунктиром обозначены водородные связи.

Рисунок 28 – Наложение структур лигандов кластера № 1 и нативного (комплекс PDB ID: 6TPA) в полости гидрофобного кармана

Восстановление связи с Lys52 может стать точкой дальнейшей оптимизации данного хемотипа в случае проявления им активности *in vitro*. Сохраняются водородные связи с Ala100 в поверхностной полости сайта, а также с Glu66, Asp173 в шарнирной (рисунок 28).

Лучший по значению скоринга лиганд **L282-0196** из кластера № 1 имеет значение XP GScore = -14.154 ккал/моль и значение свободной энергии MMGBSA = -88.55 ккал/моль. На рисунке 29 представлено наложение структур данного соединения и **70**.

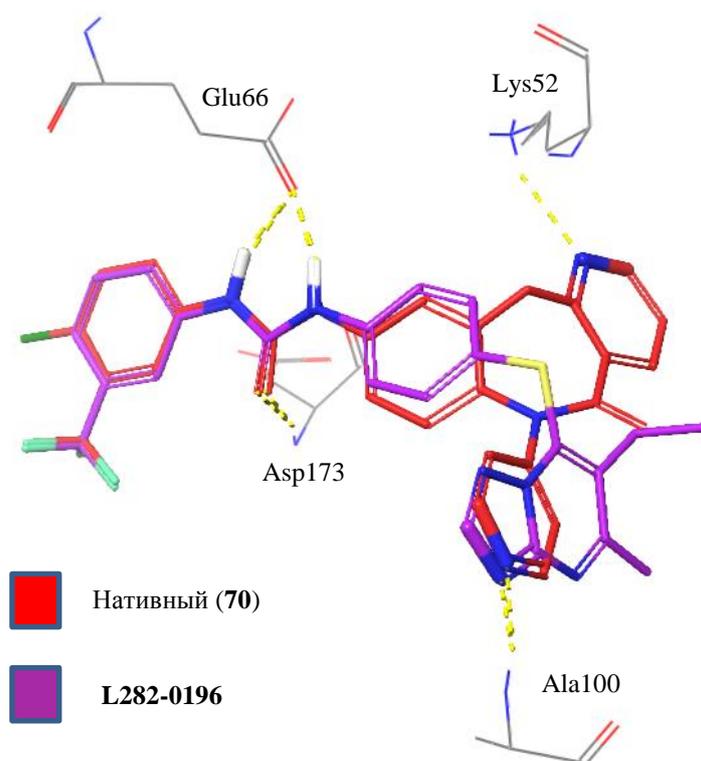
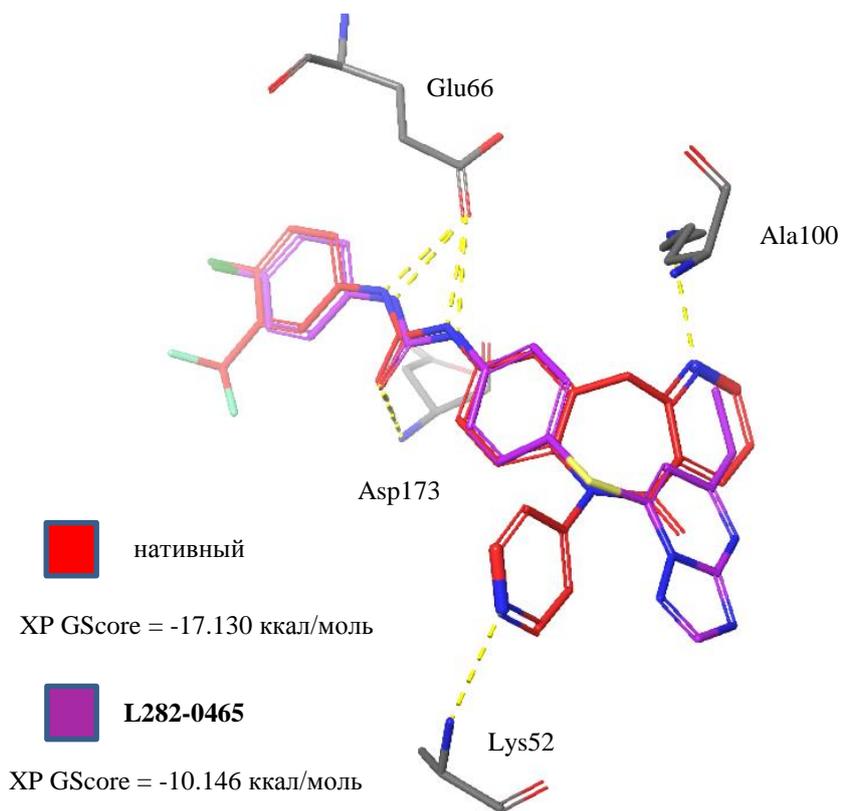


Рисунок 29 – Наложение структур **L282-0196** и нативного (**70**) лиганда в связывающих конформациях

Видно, что происходит полное соответствие в наложении ароматических фрагментов. Трифторметильная группа бензольного кольца отлично располагается в глубинной полости гидрофобного кармана, образуя там локальные фобические взаимодействия, за что данный лиганд получает одно из лучших значений – XP PhobEn = -1.791 ккал/моль. Также

наблюдается почти полное покрытие сайта связывания (что отражается в значении дескриптора XP Sitemap = -1.600 ккал/моль) и сохранение важных водородных связей аминокетогруппы мочевинового линкера с Glu66, кетогруппы – с Asp173 и атома азота триазолопиримидина с Ala100.

На рисунке 30 представлено наложение структур **70** и структуры **L282-0465**, относящегося также к кластеру №1. Заметно, что он теряет важную водородную связь с Ala100, что сказывается на вкладе дескриптора XP HBond = -1.216 ккал/моль. Водородные связи с Asp173 и Glu66 в шарнирной области сохраняются. Также при оценке энергии связывания было обнаружено, что значение MMGBSA = -82.23 (ккал/моль), то есть меньше, чем у других лигандов кластера №1.

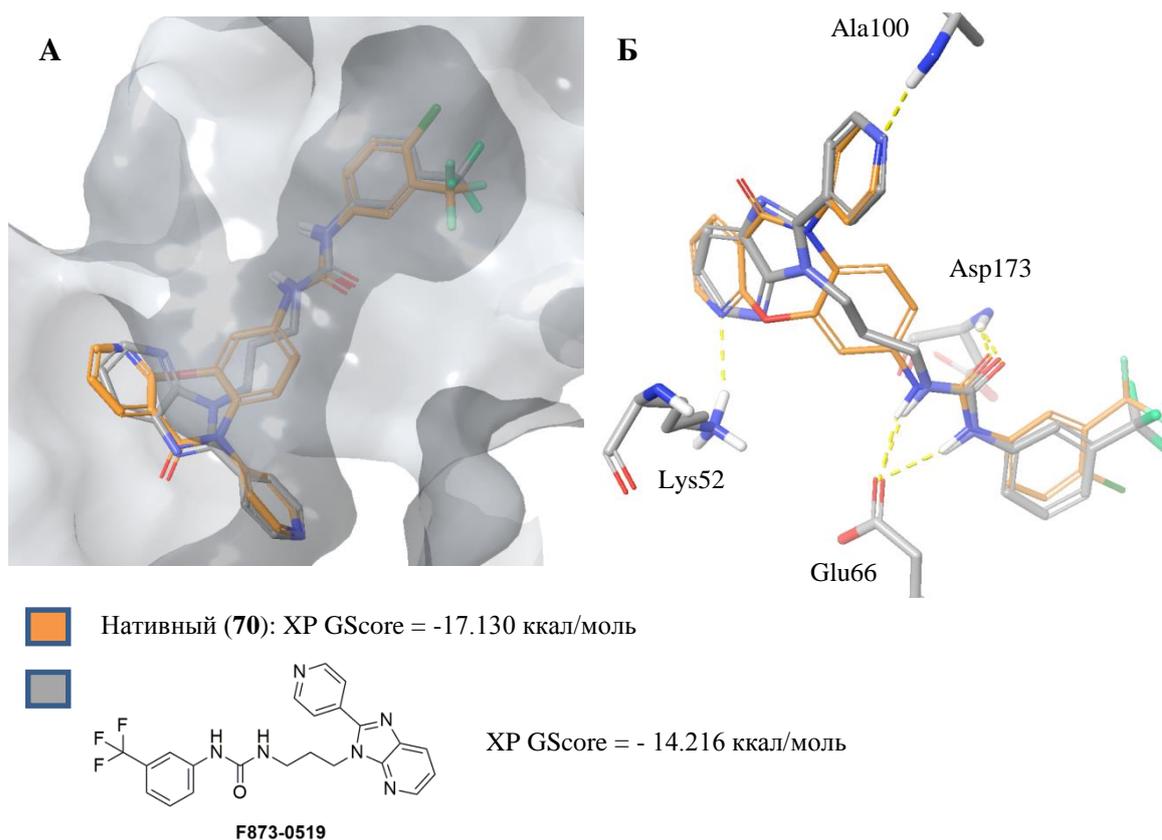


Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 30 – Наложение структуры **L282-0465** и нативного лиганда в связывающих конформациях

Можно отметить, что большинство представителей кластера № 1 отлично воспроизводят позу нативного лиганда в глубинной и шарнирной областях сайта связывания, что позволяет им образовывать минимум 2 важнейшие водородные связи с Asp173 и Glu66.

Помимо соединений кластера № 1, которые в среднем имеют лучшее среднее значение XP GScore (представлены в приложении А, таблица А), соединения кластера № 2 также выходят в лидеры. Наибольшее значение скоринга из них и значение свободной энергии MMGBSA = -89.86 (ккал/моль), получает соединение **F873-0519**. На рисунке 31 представлен режим связывания соединения-лидера из кластера 2 и нативного лиганда в гидрофобном кармане CDK8.

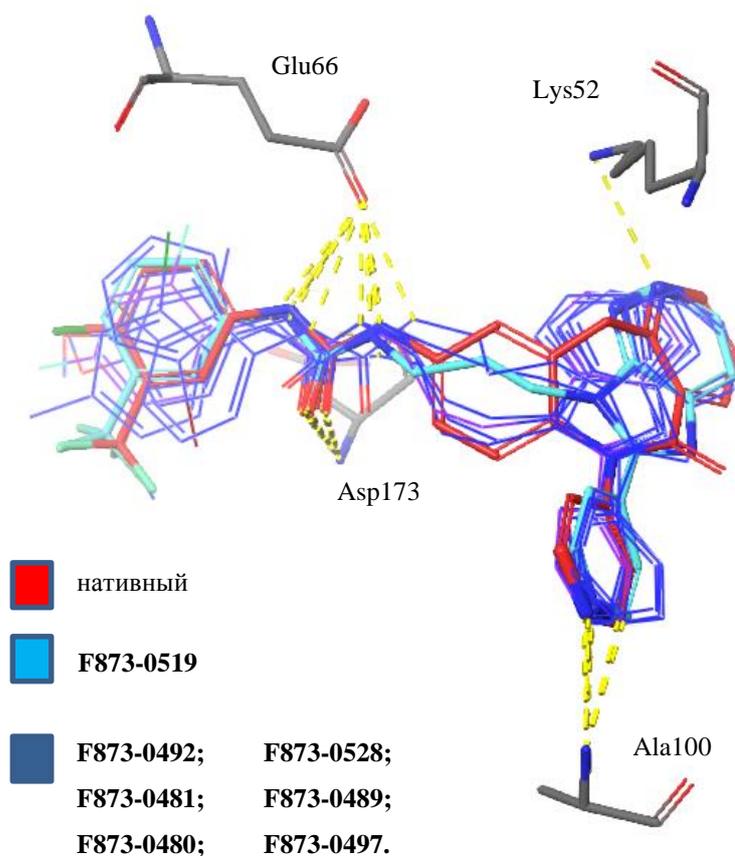


Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 31 – Наложение структур нативного лиганда и соединения **F873-0519** в сайте связывания

Заметно, что фрагмент 2-(пиридин-4-ил)-3*H*-имидазо[4,5-*b*]-пиридина отлично заполняет поверхностную часть гидрофобного кармана, но конформация линкера все же не дает возможности образования водородной связи с Lys52. Однако **F873-0519** показывает чуть лучшее значение дескриптора липофильности Liphophilic EvdW = -7.280 ккал/моль, в отличие от, например, соединения **L282-0196** (Liphophilic EvdW = -6.563 ккал/моль).

Остальные соединения кластера № 2 не получают таких низких значений XP GScore (таблица А) из-за замены трифторметильной группы фенильного кольца на другие менее объемные заместители, не позволяющие эффективно заполнять весь глубинный гидрофобный карман. Также заметна потеря консервативности расположения ароматического кольца на входе в сайт (рисунок 32).



Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 32 – Наложение структур нативного лиганда (красный) и соединений кластера № 2

Во кластере № 2 соединение **F873-0519** имеет большой вклад дескриптора XP Sitemap = -1.394 ккал/моль по сравнению с другими, что свидетельствует о большей степени комплиментарности поверхностей лиганда и сайта.

Большинство структур со средним значением XP GScore (диапазон от -11 до -8 ккал/моль) и MM GBSA (диапазон от -77.68 до 63.50 ккал/моль), сохраняют важные водородные связи, но имеют невыгодное расположение фрагментов, ориентированных в поверхностную полость гидрофобного кармана, из-за чего иногда возможно попадание части молекулы в зону растворителя, и, следовательно, начисление этим лигандам штрафов (дескриптор XP ExposePenal = 0.327).

На рисунке 33 представлен такой пример ориентации: лиганда **E760-536** (кластер № 7), XP GScore = -9.113 ккал/моль.

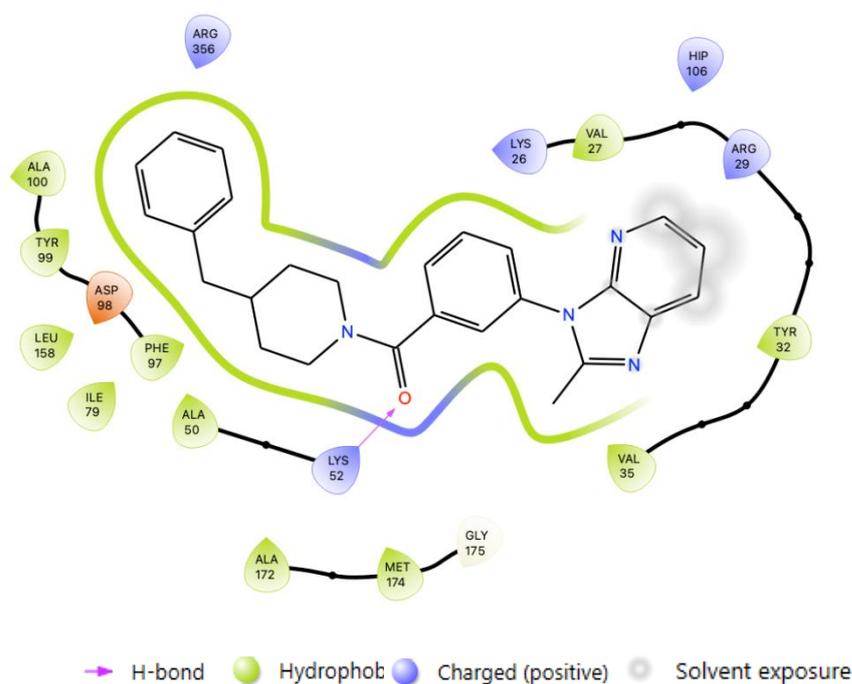
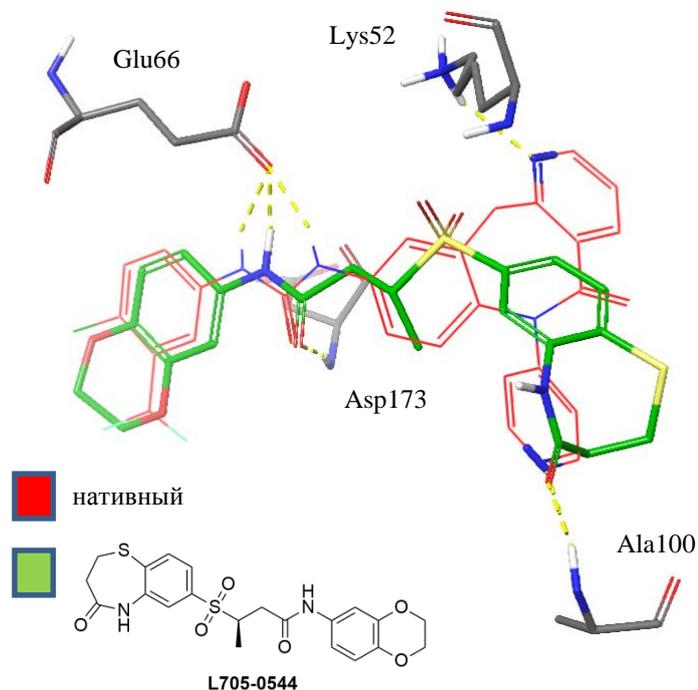


Рисунок 33 – Режим связывание соединения **E760-536**

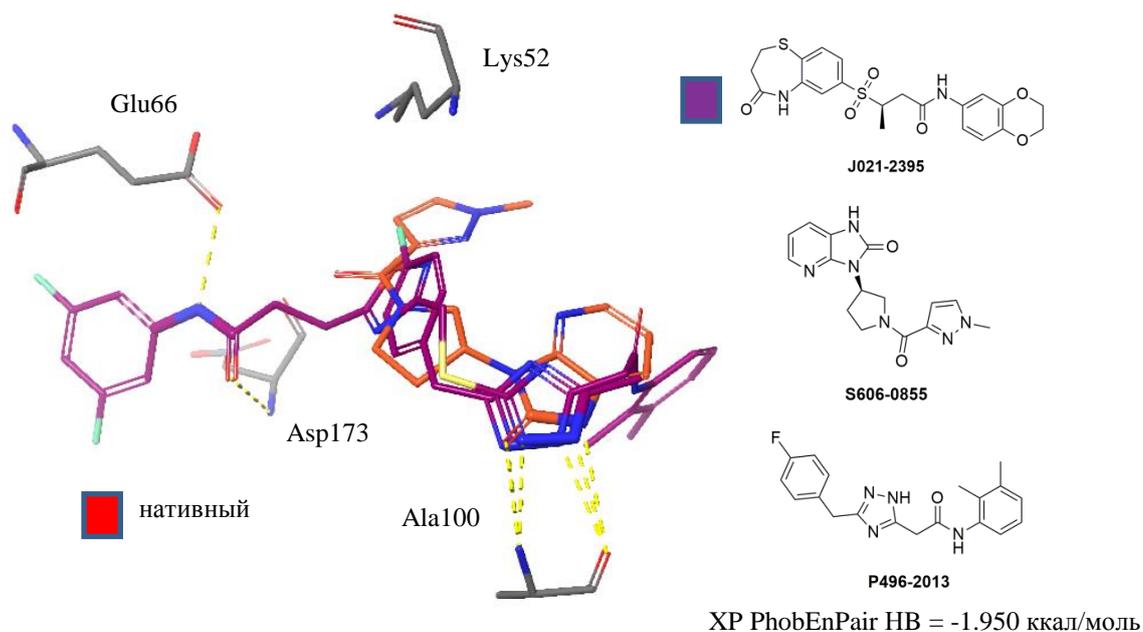
У соединений кластера 3, можно также отметить потерю важной водородной связи с Lys52 (рисунок 34), что, к сожалению, было также характерно для всех соединений кластера № 1 и 2.



Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 34 – Наложение структур соединения **L705-0544** и нативного лиганда

Среди соединений со средними значениями XP GScore (представлены в приложении А.1) встречаются соединения **J021-2395** (кластер № 8), **S606-0855** (кластер № 18) и **P496-2013** (кластер № 8), получающие награду за наличие коррелированных водородных связей (дескриптор XP PhobEnPairHB). Несмотря на то, что данные структуры получают награду за наличие парных водородных связей с Ala100, значение XP GScore у них остается не столь низким. Основной причиной является потеря у соединений **S606-0855** и **P496-2013** связей с Glu66 и Asp173 в шарнирной области, что не позволяет им войти в глубинную полость гидрофобного кармана (рисунок 35).



Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 35 – Наложение структур некоторых лигандов кластера № 8 и № 18 в сайте гидрофобного кармана CDK8

Худшие значения XP GScore и MM GBSA (ккал/моль) показали соединения, относящиеся к кластерам № 6, 4 и 12. Лиганды из кластера № 6 не имеют мочевинового или амидного линкера, который мог бы позволить им входить в глубинную полость гидрофобного кармана и образовывать там взаимодействия. Из-за этого они находятся только в поверхностной части кармана, образуя водородную связь лишь с Ala100, а некоторые из них еще π - π стекинговое взаимодействие с Phe97. Также заметно, что лиганды-аутсайдеры по результатам виртуального скрининга имеют малое структурное сродство с нативным, следовательно, это приводит к низкой степени эффективного покрытия кармана связывания (рисунок 36).

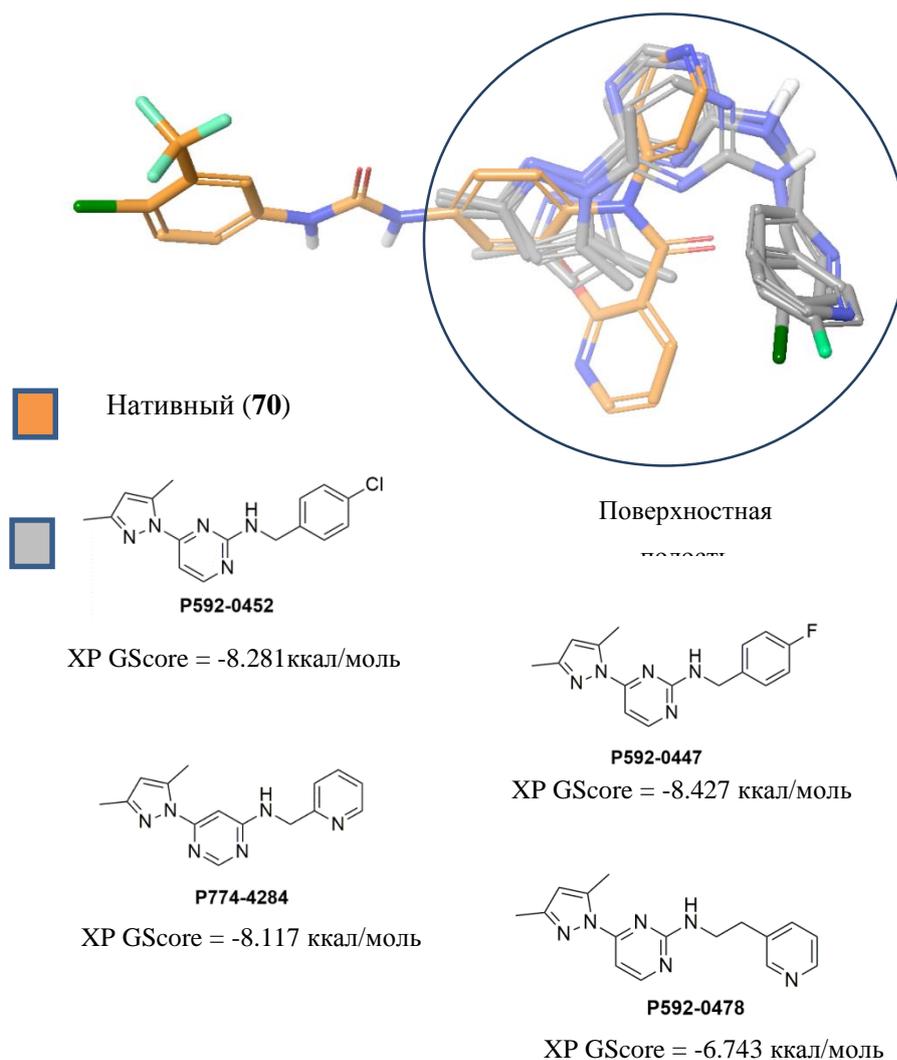


Рисунок 36 – Сравнение областей связывания лигандов кластера № 6, 4 и 12 и нативного лиганда **70**

Представители кластера № 4 получают также плохое, то есть высокое значение XP GScore и MM GBSA (ккал/моль), причиной чему является их неудачное расположение в сайте. Несмотря на то, что в отличие от ранее описанных лигандов, относящихся к кластеру № 6, многим соединениям удается занять глубинную полость гидрофобного кармана и сохранить взаимодействие с Glu66 и Asp173, или даже образовать дополнительное π - π стекинговое взаимодействие с Tyr32, функцией XP им назначаются весомые штрафы XP Penalties, ExposPenal и другие (представлены в приложении А – таблица А) за выход значительной части молекулы в область, доступную для

растворителя. На рисунке 37 показан данный режим связывания на примере соединения **Z250-1124** (XP GScore = -7.116 ккал/моль, MMGBSA = -74.15 ккал/моль) которое относится к кластеру № 4.

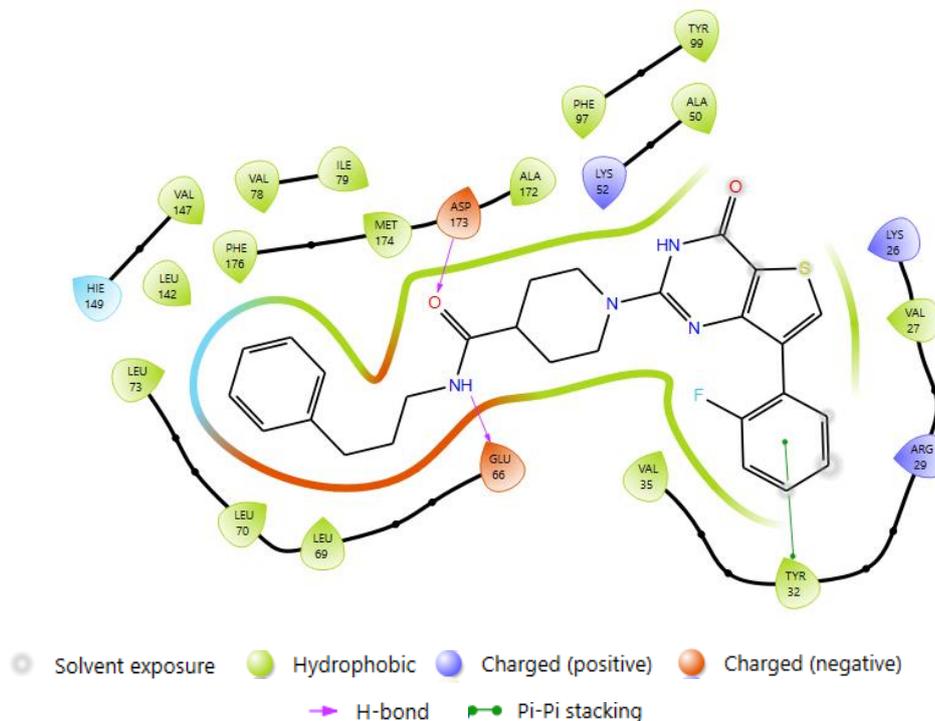
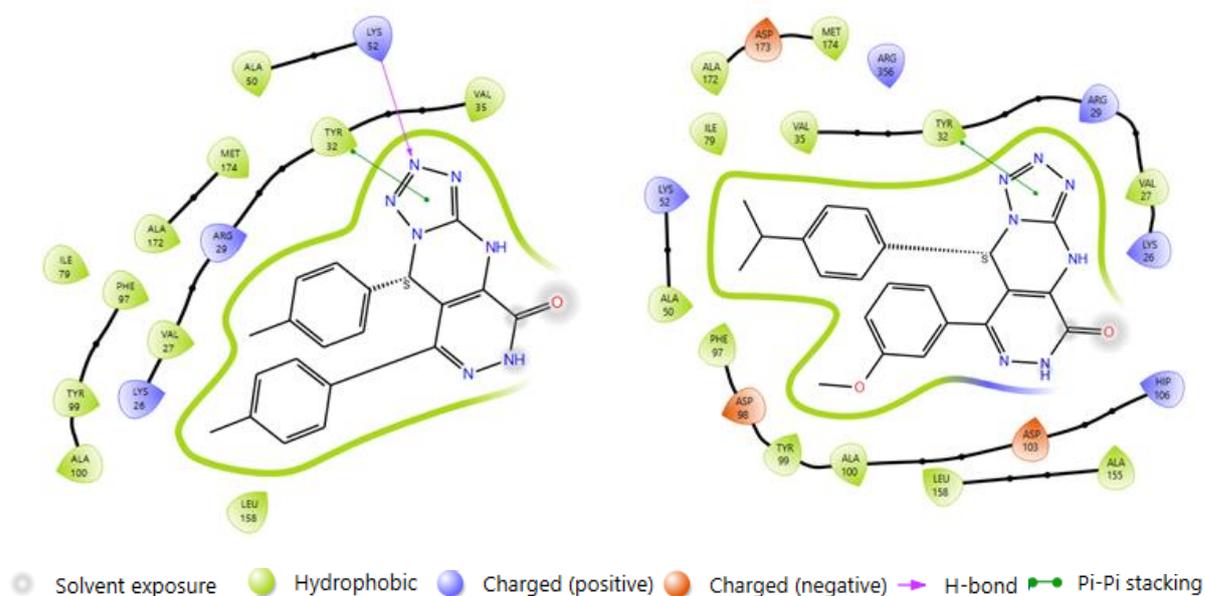


Рисунок 37 – Режим связывания лиганда **Z250-1124** в комплексе CDK8

И в итоге по результатам виртуального скрининга самые худшие значения получили соединения из кластера № 12. Они не имеют ни амидного, ни мочевинового линкера, а значит, теряют важные водородные связи и не входят в глубинную полость сайта связывания.

В поверхностной полости гидрофобного кармана также заметно их неудачное расположение (рисунок 38), они не плотно заходят в него, из-за чего большая часть молекулы уходит в зону взаимодействия с растворителем, за что оценочной функцией им начисляются высокие значения XP Penalties (представлены в приложении А, таблица А).



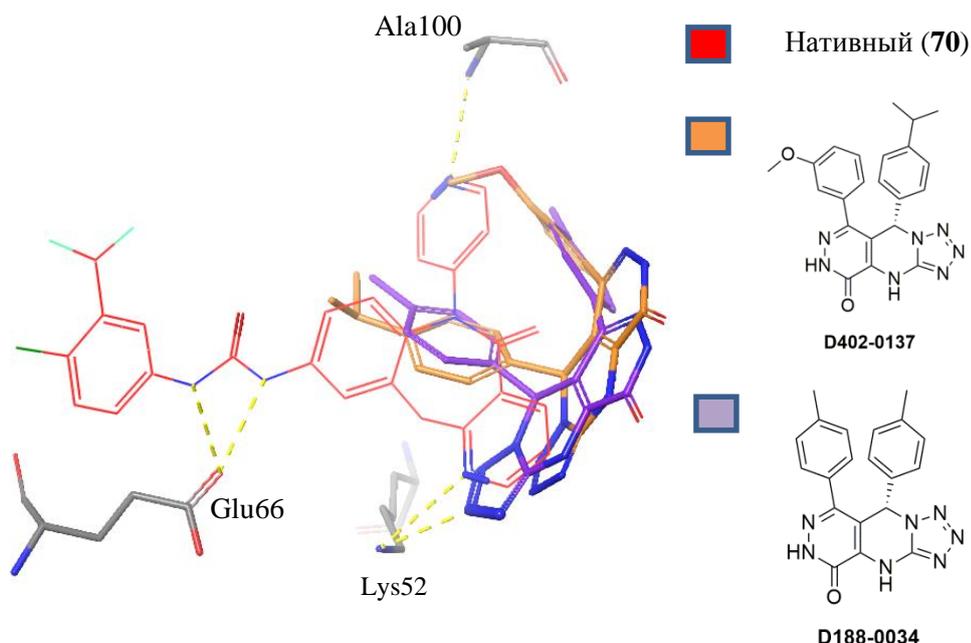
А – Режим связывания **D402-0137**;

Б – Режим связывания **D188-0034**.

Рисунок 38 – Режимы связывания лигандов кластера № 12 в гидрофобном кармане CDK8

К тому же, они образуют либо всего лишь одну водородную связь с Lys52 и π - π стекинг-взаимодействие с Tyr32, либо вообще не образуют водородную связь (режимы связывания – рисунок 38).

Кроме того, такие лиганды демонстрируют низкую степень совпадения со связывающей конформацией нативного лиганда, что также косвенно объясняет высокие значения XP GScore и MM GBSA (приложение А, таблица А). На рисунке 39 показано такое наложение – вновь можно обратить внимание на то, что ни одна из представленных структур не демонстрирует занятия глубинной полости и связывания в шарнирной области, за счет чего не происходит образования важнейших водородных связей с Asp173 и Glu66.



Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 39 – Наложение структур лигандов **D402-0137**, **D188-0034** и нативного **70** из комплекса PDB ID: 6TPA

2.4 Идентификация соединений-хитов

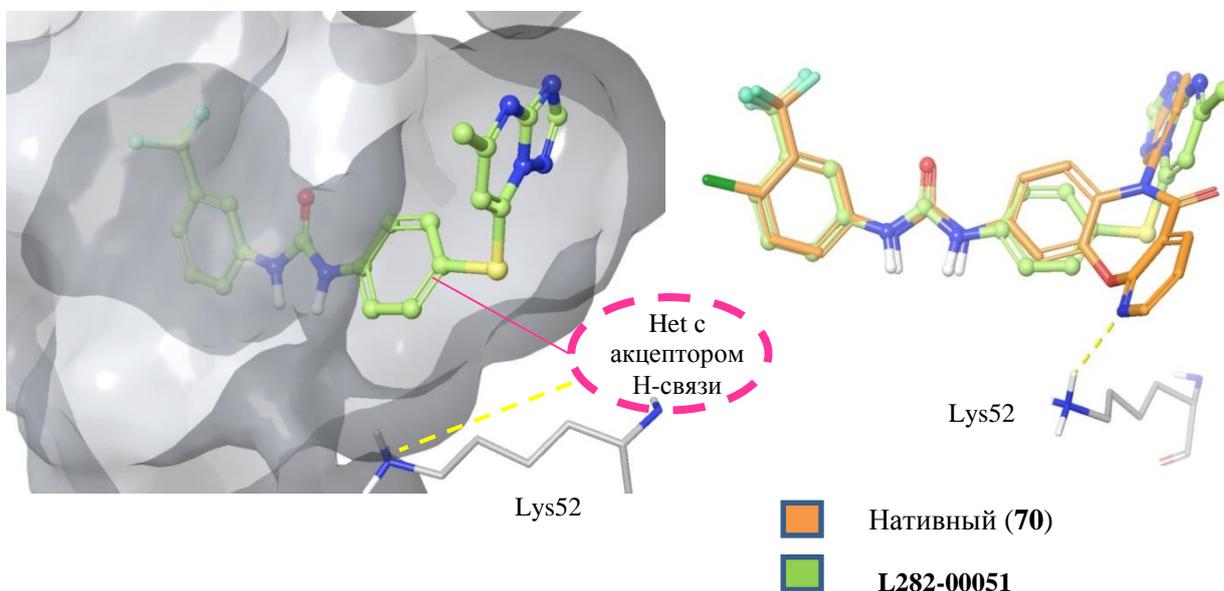
В итоге, в качестве потенциальных хитов можно выделить лучшие соединения (с наименьшим значением XP GScore) кластера № 1 и № 2. Исходя из этого, можно сделать вывод, что соединения-лидеры содержат в своей структуре:

- мочевиный или амидный линкер, необходимый для образования водородных связей с остатками Glu66 и Asp173 в шарнирной области гидрофобного кармана;

- фенильное кольцо с различными видами заместителей, лучше трифторметильным, для более выгодного расположения в глубокой полости гидрофобного кармана;

– азотсодержащий гетероцикл, который сможет выгодно расположиться в поверхностной полости гидрофобного кармана и образовать водородную связь с Ala100.

Как уже упоминалось ранее, к сожалению, все соединения хиты теряли водородную связь с Lys52 в поверхностной полости гидрофобного кармана, поэтому модификация структур соединений-хитов для возвращения связывания с данным остатком представлено в качестве первичной точки последующей SAR-оптимизации. На рисунке 40 представлен вариант оптимизации на примере лиганда **L282-0051**.



Жёлтый пунктир – водородные связи

Рисунок 40 – Вариант оптимизации соединений – хитов (на примере лиганда **L282-0051**)

Кроме прочего, хотелось бы отметить, что выбранные нами соединения-лидеры также отличаются довольно низкими значениями рассчитанной методом ММ GBSA свободной энергии связывания (таблица А). Сами отобранные соединения представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Соединения-хиты по результатам виртуального скрининга

Код соединения	XP GScore, ккал/моль	Код соединения	XP GScore, ккал/моль
F873-0519	-14.216	L282-0562	-13.000
F873-0492	-13.964	L282-0186	-12.983
L282-0051	-13.700	L282-0571	-12.976
F873-0481	-13.699	L282-0703	-12.904
F873-0480	-13.651	L282-0204	-12.898
L282-0537	-13.575	L282-0587	-12.884
F873-0528	-13.350	F873-0498	-12.874
F873-0477	-13.338	F873-0513	-12.870
F873-0488	-13.337	L282-0156	-12.863
F873-0473	-13.330	L712-0522	-12.845
F279-0268	-13.238	F873-0471	-12.835
L282-0148	-13.227	L282-0034	-12.828
F873-0499	-13.201	L282-0149	-12.797
F873-0504	-13.146	L282-0103	-12.768
F873-0467	-13.130	L282-0210	-12.754
F873-0500	-13.109	L282-0160	-12.721
L282-0124	-13.073	L282-0242	-12.699

2.5 *In vitro* исследование

Для валидации результатов виртуального скрининга в данной дипломной работе была проведена серия *in vitro* исследований на 3 клеточных линиях: SW837, SW948 и HCT116 – это клеточные линии колоректального рака. Именно они были выбраны для исследования, так как в них наблюдается гиперэкспрессия β -катенина, который участвует в сигнальном пути Wnt [122]. А CDK8 действует как активатор β -катенин-зависимой транскрипции, что ведет к пролиферации клеток [22].

Таким образом, именно на клеточных линиях колоректального рака мы можем наиболее явно проследить наличие или отсутствие цитотоксического эффекта исследуемых коммерчески-доступных соединений, приобретенных в компании ChemDiv [109].

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток определяли с помощью колориметрического теста МТТ.

Был проведен одноконцентрационный тест МТТ (результаты представлены в приложении Б – таблица Б): все исследуемые соединения были добавлены в концентрации 10 мкМ. Далее по значению «% выживших клеток» были выявлены хиты (таблица 3).

Таблица 3 – Соединения-хиты по результатам одноконцентрационного МТТ теста

Код соединения	№ кластера	% выживших клеток		
		НСТ116	SW837	SW948
D577-0132	1	0	0	0
G642-6351	-	7	32	92
L282-0076	1	0	68	6
L282-0109	1	0	0	0
L282-0164	1	4	82	24
L282-0172	1	4	62	51
L282-0175	1	0	54	19
L282-0176	1	0	54	31
L282-0196	1	0	22	0
L282-0236	1	5	22	0
L282-0244	1	0	30	0
L282-0247	1	9	36	24
L282-0248	1	0	25	0
L282-0253	1	5	31	0
L282-0254	1	12	24	0
L282-0255	1	3	25	0
L282-0268	1	0	27	0
L282-0269	1	10	30	0
L282-0264	1	12	44	0
L282-0465	1	5	19	0
L282-0488	1	1	24	0
L282-0514	1	0	19	0
L282-0549	1	0	52	26
L282-0561	1	0	51	56
L282-0571	1	0	58	60
L282-0583	1	8	47	68
L282-0192	1	6	80	34
L282-0692	1	0	25	0

По данным результатам видно, что большая часть соединений проявила цитотокс эффект на клеточных линиях НСТ 116 и SW948, в то время как % выживших клеток в клеточной линии SW837 снизился незначительно. Этот эффект связан с меньшей метаболической активностью данных клеток, и, следовательно, 72 часов для инкубирования им было недостаточно.

Также заметно, что все соединения-хиты относятся к кластеру № 1, что означает коррелирование результатов виртуального скрининга и теста *in vitro*. Таким образом, в ходе проведения данной дипломной работы был проведен виртуальный скрининг, по результатам которого были определены 184 соединения – хита, которые далее были направлены на *in vitro* исследование.

Как было описано ранее, 28 из них оказали явный цитотоксический эффект на клеточные линии колоректального рака. Следовательно, получив эти данные, возможно определить значение Hit rate, как представлено в формуле 6.

$$\text{Hit rate} = \frac{n \text{ Hit in vitro}}{n \text{ CompLib}} \times 100\% = \frac{28}{184} \times 100\% = 15.217\%, \quad (6)$$

где, $n \text{ Hit in vitro}$ – количество соединений-хитов по результатам МТТ теста;

$n \text{ CompLib}$ – количество соединений в библиотеке.

Значение 15.217% является отличным результатом. Кроме того, можно утверждать, что сделанные нами выводы о потенциальной активности соединений по результатам моделирования коррелируют с *in vitro* тестами.

3 Экспериментальная часть

3.1 Компьютерное моделирование

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

3.1.1 Подготовка структур белка

Кристаллические структуры CDK8/CycC (PDB ID: 6TPA, 5HBE, 5IDN, 6QTG), обладающие разрешением $<$ трех Å были загружены из Protein Data Bank [107]. Подготовка осуществлялась с помощью модуля ProteinPreparationWizard [117]. Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, уточнены порядки связей, состояние протонирования уточнено с использованием алгоритма Epik [123] при диапазоне pH = 7 ± 2 . Цепь, содержащая циклин C, молекулы воды и гетероатомы кроме лигандов удалены из структур.

3.1.2 Генерация грид-сеток

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

3.1.3 Нативный докинг

Структуры нативных лигандов были удалены из сайтов, а затем подвергнуты стыковке с помощью модуля LigandDocking в режиме «flexible» на протоколе точности Glide XP [124] с расчетом RMSD. Для проведения

виртуального скрининга был отобран грид-бокс, рассчитанный для комплекса CDK8 бТРА. Дополнительно с помощью модуля Prime [125] был проведен расчет свободной энергии связывания методом MMGBSA, все параметры были установлены по умолчанию.

3.1.4 Подготовка виртуальных библиотек

Для проведения виртуального скрининга из доступных каталогов ChemDiv [126] были загружены следующие библиотеки соединений в формате sdf:

- библиотека фенотипического скрининга идентификации мишени («Target identification phenotypic screening library (TIPS)») [110],
- аннотированная библиотека киназ человека («Human kinase annotated library») [111],
- библиотека ингибиторов протеинкиназы («Protein kinases inhibitors library») [112],
- библиотека разнообразия на основе 3D-фармакофоров («3D-pharmacophore based diversity library») [113].

Структуры лигандов были подготовлены с помощью модуля LigPrep; хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования с использованием алгоритма Epik [123] при диапазоне $pH = 7 \pm 2$. Дополнительно проводился расчет физико-химических свойств с помощью модуля QikProp [111]. Библиотеки использовались для скрининга без предварительной фильтрации.

3.1.5 Виртуальный скрининг

После подготовки все структуры библиотек были подвергнуты процедуре виртуального скрининга, выполняемого с помощью модуля VirtualScreeningWorkflow в грид-бокс бТРА. Стыковочная воронка включала первичную оценку на протоколе точности HTVS с сохранением 30% лучших лигандов, повторную стыковку в режиме Glide SP [119] с сохранением 20% лучших лигандов и финальный XP [124] докинг. Заключительный расчет

свободной энергии методом ММ GBSA проводился для 10% структур, обладающих самыми низкими значениями скоринговой функции.

3.2 Биологические исследования

3.2.1 Реагенты и оборудование

Для проведения биологических исследований были использованы: ламинарный бокс (SafeFAST Elite, Italy), автоматическая раскапывающая станция (epMotion 5070, Germany), криохранилище (THERMO FISHER, USA), CO₂-инкубатор с 5% содержанием CO₂ (BINDER, Germany), CO₂-инкубатор без доступа CO₂ (BINDER, Germany), инвертированный микроскоп (ZEISS, Germany), автоматический счетчик клеток (TC20 Bio-Rad, USA), настольная центрифуга (Elmi centrifuge CM-75, Latvia), полная питательная среда McCoy's 5A (Gibco, UK), полная питательная среда Leibovitz's L-15 Medium (Gibco, UK), FBS - фатальная бычья сыворотка (Gibco, UK), планшетный ридер (Promega, USA), микродозатор на 10, 300, 1000 мкл (Eppendorf, Germany), автоматический дозатор (Eppendorf, Germany), TrypLE (Gibco, UK), PBS – фосфатно-буферный раствор (Capricorn Scientific, USA), МТТ – тетразолиевый краситель (Chemicon, USA), 0.4% раствор трипанового синего (cGMP, USA) DMSO (Invitrogen, USA), культуральный флакон с обработанной поверхностью T75 (Eppendorf, Germany), прозрачные 96-ти луночные планшеты для адгезивных культур (Eppendorf, Germany), наконечники для микродозаторов 0.5-1000 мкл (Vertex, USA), наконечники для автоматической раскапывающей станции (1000 мкл), серологические пипетки 5, 10, 50 мл (Eppendorf, Germany), криобробирки (Cryofreeze, USA), центрифужные пробирки 15, 50 мл (Eppendorf, Germany).

3.2.2 Культивирование клеток

Клеточные линии SW837, SW948 и HCT116 были получены из ATCC. Клетки SW837, SW948 поддерживали в питательной среде Leibovitz's L-15 Medium (Gibco, UK), а HCT116 - в McCoy's 5A (Gibco, UK), с добавлением 10

% эмбриональной бычьей сыворотки FBS (Gibco, UK), пенициллина (100 МЕ/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax (2 mM, Gibco, UK). Клеточные линии SW837, SW948 культивировали во влажной атмосфере 100% воздуха при 37 °C, а клеточную линию HCT116 - во влажной атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂ при 37 °C. Субконфлюэнтные монослои в логарифмической фазе роста собирали путем кратковременной обработки раствором TrypLE Express (Gibco, UK) в фосфатно-солевом буфере (PBS, Capricorn Scientific, Germany) и трижды промывали PBS. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

3.2.3 МТТ-тест

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток определяли с помощью колориметрического теста МТТ. Подготовка клеток к МТТ включала в себя процесс трипсинизации и подсчета. Все исследуемые клетки разбавляли питательной средой до 7×10^3 клеток (SW837), 1×10^4 клеток (SW948) и 6×10^3 клеток (HCT116) на лунку в прозрачном 96-луночном планшете. Через 24 ч клетки обрабатывали исследуемыми соединениями по отдельности в конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 72 ч при 37 °C во влажной атмосфере 100% воздуха (для клеточных линий SW837, SW948) и в атмосфере 95% воздуха и 5% CO₂ (для HCT116). Далее в исследуемые лунки добавляли по 40 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, 5 мг/мл в PBS) и инкубировали в течение 4 часов. Затем содержимое лунок удаляли и добавляли ДМСО (150 мкл) для растворения кристаллов формазана. Планшеты встряхивали в течение 10 мин. Оптическую плотность раствора из лунок определяли при 560 нм с помощью планшетного ридера GloMax Multi + (Promega, USA). Каждое из тестируемых соединений оценивали в 3 отдельных экспериментах.

Заключение

По результатам проделанной работы можно прийти к следующим выводам:

- были проведены подготовка кристаллических комплексов и анализ режимов связывания различных ингибиторов с CDK8/CycC, в результате чего идентифицированы ключевые взаимодействия и структурные закономерности, обуславливающие аффинность. Сайт CDK8 имеет вытянутую узкую форму, уходит далеко вглубь структуры белка, состоит из глубинной и поверхностной частей. Для большинства ингибиторов идентифицирован следующий паттерн связывания: образование водородных связей с остатками Lys52 и Ala100 в поверхностной части кармана, расположение гидрофобных групп в глубинной и взаимодействие с Glu66 и Asp173 в шарнирной области;

- проведен виртуальный скрининг 4 различных библиотек киназных ингибиторов, идентифицировано 184 коммерчески-доступных хита. В качестве лидирующих хемотипов выделены [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-ил)тио)фенил)-3-арил-мочевины и 1-(3-(2-(пиримидин-4-ил)-3*H*-имидазо[4,5-*b*]пиримидин-3-ил)алкил)-3-арил-мочевины, показывающие лучшие значения скоринговой функции XP GScore -14.216 ккал/моль и -14.154 ккал/моль, соответственно (XP GScore нативного лиганда = -17.130 ккал/моль, PDB ID: 6TPA);

- все соединения лидеры располагают гидрофобные фенильные кольца в глубинной части кармана, мочевиновый мотив обеспечивает связь с Glu66/Asp173 в шарнирной области, а гетероциклическая составляющая является акцептором водородной связи для Ala100;

- также анализ результатов стыковки показал, что все хиты полностью воспроизводят режимы связывания известных ингибиторов по части взаимодействия с Ala100, Glu66, Lys52 и Asp173, но не с Lys52 с поверхностной части сайта; модификация структур соединений-хитов для

возвращения связывания с данным остатком представлено в качестве первичной точки дальнейшей SAR-оптимизации;

- проведено *in vitro* исследование для выявленных хитов, цитотоксический эффект на клеточных линиях колоректального рака (SW837, SW948 и HCT116) продемонстрировало 28 соединений, большая часть которых относится к [1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-ил)тио)фенил)-3-арил-мочевинам;

- проведенный *in silico* скрининг демонстрирует превосходный Hit Rate = 15.217 %;

- полученные данные имеют большое значение для текущих научных проектов Центра медицинской химии в области разработки новых киназных ингибиторов; результат данной работы – вклад в расширение химического пространства низкомолекулярных модуляторов CDK8.

Список используемой литературы

1. Sánchez-Martínez C. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015–2019) / C. Sánchez-Martínez, M. José Lallena, S. Gutiérrez Sanfeliciano, A. de Dios // *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* – 2019. – V. 29, № 20. – P. 1-18.
2. Iqba N. G. Cyclin-dependent kinase 4 is a preclinical target for diet-induced obesity / N. J. Iqbal, Z. Lu, S. M. Liu, et al. // *JCI Insight* – 2018. – V. 3, № 17 – P. e123000
3. Klein M. E. CDK4/6 inhibitors: the mechanism of action may not be as simple as once thought / M. E. Klein, M. Kovatcheva, L. E. Davis, et al. // *Cancer cell* – 2018. – V. 34, № 1 – P. 9-20.
4. Nebenfuhr S. Cdk6: at the interface of Rb and p53 / S. Nebenfuhr, F. Bellutti, V. Sexl // *Mol. Cell. Oncology* – 2018. – V. 5, № 5 – P. e1511206
5. Echalié A. An Inhibitor's-eye View of the ATP-binding Site of CDKs in Different Regulatory States / A. Echalié, A. J. Hole, G. Lolli, J. A. Endicott, M. E. M. Noble // *ACS Chem. Biol.* – 2014. – V. 9, № 6 – P. 1251-1256.
6. Roskoski R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors / R. Roskoski // *Pharm. Research* – 2015. – V. 100 – P. 1-23.
7. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases / M. Malumbres // *Genome Biol.* – 2014. – V. 15, № 6 – P. 2-10.
8. Tadesse S. Cyclin dependent kinase 2 Inhibitors in cancer therapy: an update / S. Tadesse, E. Caldon, W. Tilley, S. Wang // *J. Med. Chem.* – 2018. – V. 9, № 6 – P. 4233–4251.
9. Lim S. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation / Lim S., Kaldis P. // *Development* – 2013. – V. 140, № 15 – P. 3079–3093.
10. Galbraith M. D. CDK8: a positive regulator of transcription / M. D. Galbraith, A. J. Donner, J. M. Espinosa // *Transcription.* – 2010. – V. 1, № 1 – P. 4-12.

11. Knuesel M. T. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls mediator coactivator function / M. T. Knuesel, K. D. Meyer, C. Bernecky, D. J. Taatjes // *Genes Dev.* – 2009. – V. 23, № 4 – P. 439-451.
12. Knuesel M. T. The human CDK8 subcomplex is a histone kinase that requires Med12 for activity and can function independently of mediator / M. T. Knuesel, K. D. Meyer, A. J. Donner, J. M. Espinosa, D. J. Taatjes // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – V. 29, № 3 – P. 650-661.
13. Ebmeier C. C. Activator-mediator binding regulates mediator-cofactor interactions / C. C. Ebmeier, D. J. Taatjes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107, № 25 – P. 11283-11288.
14. Philip S. Cyclin-dependent kinase 8: a new hope in targeted cancer therapy? / S. Philip, M. Kumarasiri, T. Teo, M. Yu, S. Wang // *J. Med. Chem.* – 2018. – V. 61, № 12 – P. 5073-5092.
15. McDermott M. S. J. Inhibition of CDK8 mediator kinase suppresses estrogen dependent transcription and the growth of estrogen receptor positive breast cancer / M. S. J. McDermott, A. A. Chumanevich, C. U. Lim, et al. // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8, № 8 – P. 12558-12575.
16. Donner A. J. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network / A. J. Donner, C. C. Ebmeier, D. J. Taatjes, J. M. Espinosa // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – V. 17, № 2 – P. 194-201.
17. Galbraith M.D. HIF1A Employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia / M.D. Galbraith, M.A. Allen, C.L. Bensard, et al. // *Cell.* – 2013. – V. 153, № 6 – P. 1327-1339.
18. Perez-Perri J.I. The TIP60 complex is a conserved coactivator of HIF1A / J.I. Perez-Perri, V.L. Dengler, K.A. Audetat, et al. // *Cell Rep.* – 2016. – V. 16, № 1 – P. 37-47.
19. Galbraith M.D. CDK8 kinase activity promotes glycolysis / M.D. Galbraith, Z. Andrysik, A. Pandey, et al. // *Cell Rep.* – 2017. – V. 21, № 6 – P. 1495-1506.

20. Seo J.O. Role of CDK8 and b-catenin in colorectal adenocarcinoma / J.O. Seo, S.I. Han, S.C. Lim // *Oncol. Rep.* – 2010. – V. 24, № 1 – P. 285-291.
21. Nusslein-Volhard C. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* / C. Nusslein-Volhard, E. Wieschaus // *Nature.* – 1980. – V. 287, № 5785 – P. 795-801.
22. Firestein R. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity / R. Firestein, A.J. Bass, S.Y. Kim, et al. // *Nature.* – 2008. – V. 455, № 7212 – P. 547-551.
23. Carrera I. Wingless target gene transcription through the mediator complex subunits Med12 and Med13 / I. Carrera, F. Janody, N. Leeds, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105, № 18 – P. 6644-6649.
24. Morris E. J. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8 / E. J Morris, J. Y Ji, F. Yang, et al. // *Nature.* – 2008. – V. 455, № 7212 – P. 552-556.
25. Zhao J. CDK8 regulates E2F1 transcriptional activity through S375 phosphorylation / J. Zhao, R. Ramos, M. Demma // *Oncogene.* – 2013. – V. 32, № 30 – P. 3520-3530.
26. Macias M.J. Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling / M.J. Macias, P. Martin-Malpartida, J. Massague // *Trends in Biochem. Sci.* – 2015. – V. 40, № 6 – P. 296-308.
27. Khan A. Integrative modeling reveals key chromatin and sequence signatures predicting super-enhancers / A. Khan, X. Zhang // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9, № 1 – P. 2877.
28. Alarcon C. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways / C. Alarcon, A.I. Zaromytidou, Q. Xi, et al. // *Cell.* – 2009. – V. 139, № 4 – P. 757-769.
29. Chiang M.Y. Identification of a conserved negative regulatory sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1 / M.Y. Chiang, M.L. Xu, G. Histen, et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2006. – V. 26, № 16 – P. 6261-6271.

30. J. Bancerek. CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response / J. Bancerek, Z.C. Poss, I. Steinparzer, et al. // *Immunity*. – 2013. – V. 38, № 2 – P. 250-262.

31. He L. Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells / L. He, N. Lu, Q. Dai, et al. // *Toxicology*. – 2021. – V. 312 – P. 36-47.

32. Diab S. CDK7 inhibitors in cancer therapy: the sweet smell of success? / S. Diab, M. Yu, S. Wang // *J. Med. Chem.* – 2020. – V. 63, № 14 – P. 7458-7474.

33. Nakamura A. CDK8/19 inhibition induces premature G1/S transition and ATR-dependent cell death in prostate cancer cells / A. Nakamura, D. Nakata, Y. Kakoi, et al. // *Oncotarget*. – 2018. – V. 9, № 14 – P. 13474-13487.

34. Szilagy Z. Emerging roles of Cdk8 in cell cycle control / Z. Szilagy, C. M. Gustafsson // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* – 2013. – V. 1829, № 9 – P. 916-920.

35. Cai W.S. Downregulation of CDK-8 inhibits colon cancer hepatic metastasis by regulating Wnt/beta-catenin pathway / W.S. Cai, F. Shen, Z. Feng, et al. // *Biomed. Pharmacother.* – 2015. – V. 74 – P. 153-157.

36. Luo Q.F. Tumor-suppressive microRNA-195-5p regulates cell growth and inhibits cell cycle by targeting cyclin dependent kinase 8 in colon cancer / Q.F. Luo, Z.Y. Zhang, Z.L. Dai, et al. // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – V. 8, № 5 – P. 2088-2096.

37. McClelland M.L. Cdk8 deletion in the *Apc^{Min}* murine tumour model represses E2F2 activity and accelerates tumorigenesis / M.L. McClelland, T.M. Soukup, S.D. Liu, et al. // *J. Pathol.* – 2015. – V. 237, № 4 – P. 508-519.

38. Li X.Y. MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer / X.Y. Li, Q.F. Luo, C.K. Wei // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – V. 7, № 1 – P. 32-40.

39. Li X.Y. siRNA-mediated silencing of CDK8 inhibits proliferation and growth in breast cancer cells / X.Y. Li, Q.F. Luo, C.K. Wei, et al. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2014. – V. 7, № 1 – P. 92-100.

40. Xu D. Skp2–MacroH2A1–CDK8 axis orchestrates G2/M transition and tumorigenesis / D Xu, CF Li, X Zhang, et al. // Nat. Comm. – 2015. – V. 6 – P. 6641-6655.

41. Wei R. CDK8 regulates the angiogenesis of pancreatic cancer cells in part via the CDK8-beta-catenin-KLF2 signal axis / R. Wei, L. Kong, Y. Xiao, et al. // Exp. Cell Res. – 2018. – V. 369, № 2 – P. 304-315.

42. Xu W. Mutated K-ras activates CDK8 to stimulate the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer in part via the Wnt/beta-catenin signaling pathway / W. Xu, Z. Wang, W. Zhang, et al. // Canc. Lett. – 2015. – V. 356, № 2 Pt B – P. 613-627.

43. Lin Y. Long non-coding RNA DLGAP1-AS1 facilitates tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via the feedback loop of miR-26a/b-5p/IL-6/JAK2/STAT3 and Wnt/beta-catenin pathway / Y. Lin, Z. Jian, H. Jin, et al. // Cell Death Dis. – 2020. – V. 11, № 1 – P. 34-44.

44. Li X. Understanding obesity as a risk factor for uterine tumors using *Drosophila* / X. Li, M. Liu, J.Y. Ji // Adv. Exp. Med. Biol. – 2019. – V. 1167 – P. 129-155.

45. Xiaoli F. Mediating lipid biosynthesis: implications for cardiovascular disease / F. Xiaoli, F. Yang // Trends Cardiovasc. Med. – 2013. – V. 23, № 7 – P. 269-273.

46. Sliwoski G. Computational methods in drug discovery / G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler, et al. // Pharm. Rev. – 2014. – V. 66, № 1 – P. 334-395.

47. Pinzi L. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery / L. Pinzi, G. Rastelli // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20, № 18 – P. 4331-4354.

48. Morrison J. L. A lock-and-key model for protein-protein interactions / Morrison J. L., Breitling R., Higham D. J., Gilbert D. R. // Bioinformatics . – 2006. – V. 22, № 16 – P. 2012-2019.

49. Koshland D. E. The key–lock theory and the induced fit theory / D. E. Koshland // Angew. Chem. Int. Ed. – 1995. – V. 33, № 23-24 – P. 23-24.

50. Audie J. A novel empirical free energy function that explains and predicts protein-protein binding affinities / Audie J., Scarlata S. // *Biophys. Chem.* – 2007. – V. 129, № 2-3 – P. 198-211.

51. Morris G.M. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function / G.M. Morris, D.S. Goodsell, D. S. Halliday et al. // *J. Comput. Chem.* – 1998. – V. 19, № 14 – P. 1639-1662.

52. Trott O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / Trott O., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* – 2010. – V. 31, № 2 – P. 455-461.

53. De Magalhães C.S. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands / C.S De Magalhães, D.M. Almeida, H.J.C Barbosa // *Inf. Sci.* – 2014. – V. 289 – P. 206-224.

54. De Magalhães C.S. Selection-insertion schemes in genetic algorithms for the flexible ligand docking problem / C.S. De Magalhães, H.J.C. Barbosa, L.E. Dardenne // *Lect. Notes Comput. Sci.* – 2004. – V. 3102 – P. 368-379.

55. Jones G. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking / G. Jones, P. Willett, R.C. Glen // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 267, № 3 – P. 727-748.

56. Verdonk M.L. Improved protein-ligand docking using GOLD / M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn // *Proteins Struct. Funct. Genet.* – 2003. – V. 52, № 4 – P. 609-623.

57. Rarey M. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm / M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V. 261, № 3 – P. 470-489.

58. Thomsen R. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking / R. Thomsen, M. H. Christensen // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49, № 11 – P. 3315-3321.

59. Halgren T. A. A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening / T. A Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, et al. // *J. Med. Chem.* – 2004. – V. 47, № 7 – P.1750-1759.

60. Berman H.M. The Protein Data Bank / H.M. Berman // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28, № 1 – P. 235-242.
61. Hetényi C. Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues / C. Hetényi, D. Van Der Spoel // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580, № 5 – P. 1447-1450.
62. Volkamer A. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions / A. Volkamer, D. Kuhn, T. Grombacher // *J. Chem. Inf. Model.* – 2012. – V. 52, № 2 – P. 360-372.
63. Radoux C.J. Identifying interactions that determine fragment binding at protein hotspots / C.J. Radoux, T.S.G. Olsson, W.R. Pitt // *J. Med. Chem.* – 2016. – V. 59, № 9 – P. 4314-4325.
64. Meng E.C. Automated docking with grid-based energy evaluation / E.C. Meng, B.K. Shoichet, I.D. Kuntz // *J. Comput. Chem.* – 1992. – V. 13, № 4 – P. 505-524.
65. Irwin J.J. ZINC—a free database of commercially available compounds for virtual screening / J.J. Irwin, B.K. Shoichet // *J. Chem. Inf. Model.* – 2004. – V. 45, № 1 – P. 177-182.
66. Kim S. PubChem substance and compound databases / S. Kim, P.A. Thiessen, E.E. Bolton, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44, № D1 – P. D1202–D1213.
67. McCammon J.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations / J.A. McCammon, J.E. Nielsen, N.A. Baker, T. J. Dolinsky // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32, № Web Server issue – P. W665–W667.
68. Anandakrishnan R. H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations / R. Anandakrishnan, B. Aguilar, A.V. Onufriev // *Nucleic Acids Res* – 2012. – V. 40, № Web Server issue – P. W537–W541.

69. Gioia D. Dynamic docking: a paradigm shift in computational drug discovery / D. Gioia, M. Bertazzo, M. Recanatini // *Molecules* – 2017. – V. 22, № 11 – P. 2029.
70. Hermann J. C. Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function / J. C. Hermann, R. Marti-Arbona, A. A. Fedorov, et al. // *Nature* – 2007. – V. 448, № 7155 – P. 775-779.
71. Joseph-Mccarthy D. Lead optimization via high-throughput molecular docking / D. Joseph-Mccarthy, J. C. Baber, E. Feyfant, et al. // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* – 2007. – V. 10, № 3– P. 264-274.
72. Seifert M. H. Virtual high-throughput screening of molecular databases / M. H. Seifert, J. Kraus, B. Kramer // *Curr. Opin Drug Discov. Devel.* – 2007. – V. 10, № 3 – P. 298-307.
73. Liu J. Classification of current scoring functions / J. Liu, R. Wang // *J. Chem. Inf. Model* – 2015. – V. 55, № 3 – P. 475-482.
74. Meng E. C. Automated docking with grid-based energy evaluation / E.C. Meng, B.K. Shoichet, I. D. Kuntz // *J. Comp. Chem.* – 1992. – V. 13, № 4 – P. 505-524.
75. Jorgensen W. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura // *J. Chem. Phys.* – 1983. – V. 79, № 2 – P. 926-935.
76. Raha K. The role of quantum mechanics in structure-based drug design / K. Raha, M. B. Peters, B. Wang, et al. // *Drug Discov. Today* – 2007. – V. 12, № 17-18 – P. 725-731.
77. Kramer B. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking / B. Kramer, M. Rarey, T. Lengauer // *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* – 1999. – V. 37, № 2 – P. 228-241.
78. Yang Y. Approaches to efficiently estimate solvation and explicit water energetics in ligand binding: the use of WaterMap / Y. Yang, F. C. Lightstone, S. E. Wong // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2013. – V. 8, № 3 – P. 277-287.

79. Murray C. W. Empirical scoring functions. II. The testing of an empirical scoring function for the prediction of ligand-receptor binding affinities and the use of Bayesian regression to improve the quality of the model / C. W. Murray, T. R. Auton, M. D. Eldridge // *J. Comput. Aided Mol. Design.* – 1998. – V. 12, № 5 – P. 503-519.

80. Fornabaio M. Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein–ligand complexes. 3. The free energy contribution of structural water molecules in HIV-1 protease complexes / M. Fornabaio, F. Spyraakis, A. Mozzarelli, et al. // *J. Med. Chem.* – 2004. – V. 47, № 18 – P. 4507-4516.

81. Li Y. Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 1. Compilation of the test set / Y. Li, Z. Liu, J. Li, et al. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2014. – V. 54, № 6 – P. 1700-1716.

82. Eldridge M. D. I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes / M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, et al. // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 1997. – V. 11, № 5 – P. 425-445.

83. Jorgensen W. L. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids / W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1996. – V. 118, № 45 – P. 11225-11236.

84. Friesner R. A. Extra precision Glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes / R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, et al. // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49, № 21 – P. 6177-6196.

85. Gohlke H. Knowledge-based scoring function to predict protein–ligand interactions / H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 295, № 2 – P. 337-356.

86. Velec H. F. DrugScore(CSD)-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native

ligand poses and better affinity prediction / H. F. Velec, H. Gohlke, G. Klebe // J. Med. Chem. – 2005. – V. 48, № 20 – P. 6296-6303.

87. Muegge I. A general and fast scoring function for protein–ligand interactions: a simplified potential approach / I. Muegge, Y. C. Martin // J. Med. Chem. – 1999. – V. 42, № 5 – P. 791-804.

88. Forli S. A force field with discrete displaceable waters and desolvation entropy for hydrated ligand docking / S. Forli, A. J. Olson // J. Med. Chem. – 2012. – V. 55, № 2 – P. 623-638.

89. Wang T. Discovery of novel CDK8 inhibitors using multiple crystal structures in docking-based virtual screening / T. Wang, Z. Yang, Y. Zhanget, et al. // Eur. J. of Med. Chem. – 2017. – V. 129 – P. 275 - 286.

90. Yan Y. Y. Design and synthesis of a 2-amino-pyridine derivative as a potent CDK8 inhibitor for anti-colorectal cancer therapy / Y. Y. Yan, X. X. Zhang, Y. Xiao, et al. // J. Med. Chem. – 2022. – V. 65, № 19 – P. 13216 – 13239.

91. Schneider E.V. The structure of CDK8/CycC implicates specificity in the CDK/cyclin family and reveals interaction with a deep pocket binder / E.V. Schneider, J. Bottcher, M. Blaesse, et al. // J. Mol. Biol. – 2011. – V. 412, № 2 – P. 251 – 266.

92. Wu D. Angel or devil? - CDK8 as the new drug target / D. Wu, Z. Zhang, X. Chen, Y. Yan, X. Liu // Eur. J. of Med. Chem. – 2021. – V. 213, № 11 – P. 1-30.

93. Ono K. Design and synthesis of selective CDK8/19 dual inhibitors: discovery of 4,5-dihydrothieno[3',4':3,4]benzo[1,2-*d*]isothiazole derivatives / K. Ono, H. Banno, M. Okaniwa, et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2017. – V. 25, № 8 – P. 2336-2350.

94. Czodrowski P. Structure-based optimization of potent, selective, and orally bioavailable CDK8 inhibitors discovered by high-throughput screening / P. Czodrowski, A. Mallinger, D. Wienke, et al. // J. Med. Chem. – 2016. – V. 59, № 20 – P. 9337-9349.

95. Mallinger A. 2, 8-disubstituted-1, 6-naphthyridines and 4, 6-disubstituted-isoquinolines with potent, selective affinity for CDK8/19 / A. Mallinger, K. Schiemann, C. Rink, et al. // ACS Med. Chem. Lett. – 2016. – V. 7, № 6 – P. 573-578.

96. Mallinger A. Discovery of potent, selective, and orally bioavailable small-molecule modulators of the mediator complex-associated kinases CDK8 and CDK19 / A. Mallinger, K. Schiemann, C. Rink, et al. // J. Med. Chem. – 2016. – V. 59, № 3 – P. 1078-10101.

97. Yu M. Discovery of a potent, highly selective, and orally bioavailable inhibitor of CDK8 through a structure-based optimization / M. Yu, Y. Long, Y. Yang, et al. // Eur. J. Med. Chem. – 2021. – V. 218 – P. 113391-113415.

98. Dale T. A selective chemical probe for exploring the role of CDK8 and CDK19 in human disease / T. Dale, P. A. Clarke, C. Esdar, et al. // Nat. Chem. Biol. – 2015. – V. 11, № 12 – P. 973-980. .

99. Han X. Discovery of potent and selective CDK8 inhibitors through FBDD approach / X. Han, M. Jiang, C. Zhou, et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2017. – V. 27, № 18 – P. 4488-4492.

100. Abdelgalil A. A. Chapter four - sorafenib / A. A. Abdelgalil, H. M. Alkahtani, F. I. Al-Jenoobi // Profiles of Drug Subst., Excipients and Rel. Method. – 2019. – V. 44 – P. 239-266.

101. Schneider E. V. The structure of CDK8/CycC implicates specificity in the CDK/Cyclin family and reveals interaction with a deep pocket binder / E. V. Schneider, J. Böttcher, M. Blaesse, et al. // J. Mol. Biol. – 2011. – V. 412, № 2 – P. 251-266.

102. Bankston D. A Scaleable synthesis of BAY 43-9006: a potent Raf kinase inhibitor for the treatment of cancer / D. Bankston, J. Dumas, R. Natero, et al. // Org. Proc. Res. Dev. – 2002. – V. 6, № 6 – P. 777-781.

103. Yan Y. Y. Design and synthesis of a 2- amino-pyridine derivative as a potent CDK8 inhibitor for anti-colorectal cancer therapy / Y. Y. Yan, X. X. Zhang, Y. Xiao, et al. // J. Med. Chem. – 2022. – V. 65, № 19 – P. 13216-13239.

104. Martinez-Gonzalez S. Pyrido [2, 3-*b*][1, 5] benzoxazepin-5 (6*H*)-one derivatives as CDK8 inhibitors / S. Martinez-Gonzalez, A. B. García, M. I. Albarrán, et al. // Eur. J. Med. Chem. – 2020. – V. 201 – P. 112443.

105. Bergeron P. Design and development of a series of potent and selective type II inhibitors of CDK8 / P. Bergeron, M. F. T. Koehler, E. M. Blackwood, et al. // ACS Med. Chem. Lett. – 2016. – V. 7, № 6 – P. 595-600.

106. Brody H. Colorectal cancer / H. Brody // Nature. – 2015. – V. 521, № 7551 – P. S1.

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

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

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

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

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

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

113. 3D-Pharmacophore Based Diversity Library - ChemDiv. URL: <https://www.chemdiv.com/catalog/diversity-libraries/3d-pharmacophore-based-diversity-library/> (дата обращения 3.04.2023).

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

115. Schrödinger Release 2023-1: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021

116. Lipinski C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – V. 46, № 1-3 – P. 3-26.

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

118. Friesner R. A. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy / R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, et al. // *J Med Chem.* – 2004. – V. 47, № 7 – P. 1739 - 1749.

119. Koehler M. F. T. Development of a potent, specific CDK8 kinase inhibitor which phenocopies CDK8/19 knockout cells / M. F. T. Koehler, P. Bergeron, E. M. Blackwood, et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2016. – V. 7, № 3 – P. 223-228.

120. Hofmann M. H. Selective and potent CDK8 inhibitors enhance NK cell activity and promote tumor surveillance / M. H. Hofmann, R. Mani, H. Engelhardt, et al. // *Cancer Res.* – 2019. – V. 79, № 13 – P. 1018-1033.

121. Halgren T. New method for fast and accurate binding-site identification and analysis / T. Halgren // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2007. – V. 69, № 2 – P. 146-148.

122. Cai W. S. Downregulation of CDK-8 inhibits colon cancer hepatic metastasis by regulating Wnt/ β -catenin pathway / W. S. Cai, F. Shen, Z. Feng, et al. // *Biomed Pharm.* – 2015. – V. 74 – P. 153-157.

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

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

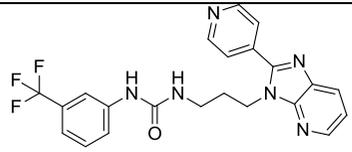
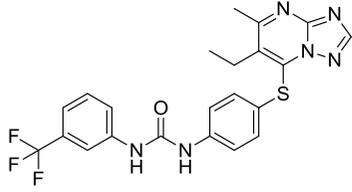
B. Murphy, M. P. Repasky, et al. // J. Med. Chem. – 2006. – V. 49, № 21 – P. 6177-6197.

125. Jacobson M. P. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations / M. P. Jacobson, R. A. Friesner, Z. Xiang, et al. // J. Mol. Biol. – 2002. – V. 320, № 3 – P. 597-608.

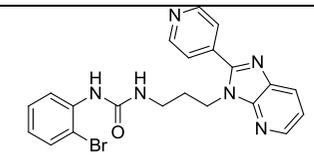
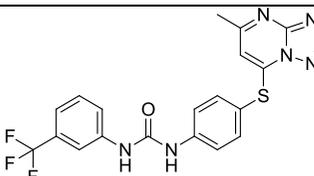
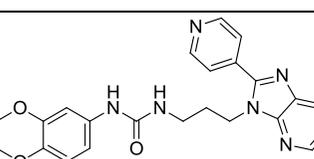
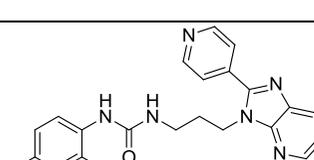
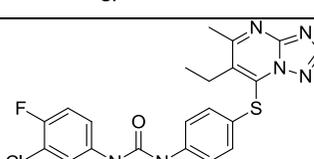
Приложение А

Результат виртуального скрининга библиотеки коммерческих соединений в комплекс CDK8/Cyclin C (код PDB: 6TPA). Deskрипторы оценочной функции Glide в расширенном формате XP.

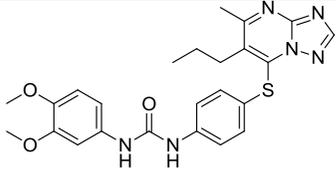
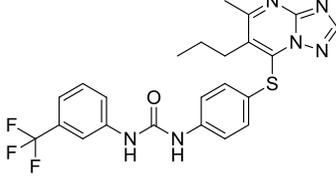
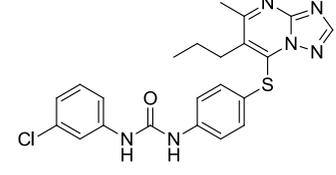
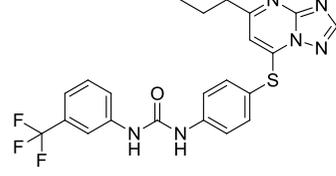
Таблица А – Результат виртуального скрининга

Код соединения	№ кластера	Структура лиганда	Deskрипторы оценочной функции Glide в расширенном формате XP (ккал/моль)													
			MMGBSA dG Bind	XP GScore	XP HBond	XP LipophilicEvdW	XP Electro	XP ExposPenal	XP LowMW	XP Sitemap	XP PhobEn	XP PhobEnHB	XP PhobEnPairHB	XP PoseRank	XP RotPenal	XP Penalties
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F873-0519	2		-89.86	-14.216	-1.510	-7.280	-0.868	0.000	-0.032	-1.394	-1.985	-1.500	0.000	1	0.353	0.000
L282-0196	1		-88.55	-14.154	-1.963	-6.563	-0.969	0.000	0.000	-1.600	-1.791	-1.500	0.000	1	0.233	0.000

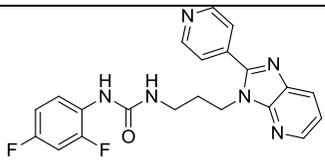
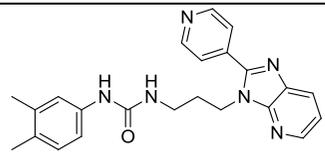
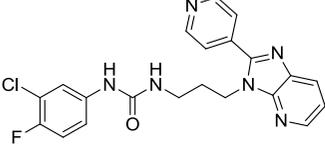
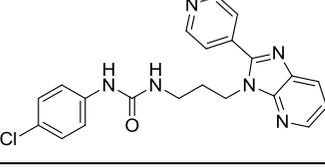
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F873-0492	2		-69.73	-13.964	-1.890	-6.068	-0.625	0.000	0.000	-0.508	-2.168	-3.000	0.000	1	0.295	0.000
L282-0051	1		-84.43	-13.700	-2.073	-5.958	-0.969	0.000	-0.019	-1.600	-1.842	-1.500	0.000	1	0.260	0.000
F873-0481	2		-94.83	-13.699	-1.843	-7.361	-0.789	0.000	-0.058	-0.486	-2.025	-1.500	0.000	1	0.365	0.000
F873-0480	2		-84.25	-13.651	-1.514	-7.057	-0.793	0.000	-0.097	-0.493	-2.580	-1.500	0.000	1	0.383	0.000
L282-0176	1		-89.34	-13.609	-1.809	-6.536	-0.817	0.000	0.000	-0.954	-2.200	-1.500	0.000	1	0.206	0.000

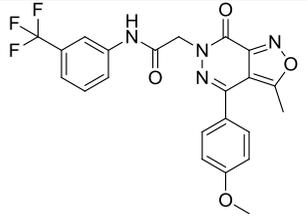
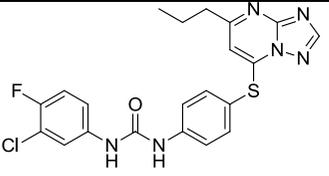
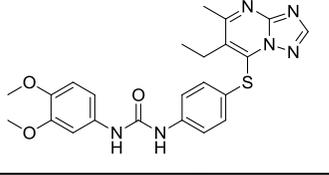
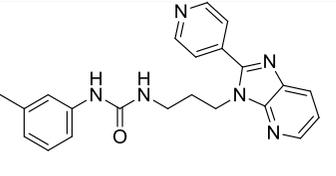
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0537	1		-97.30	-13.575	-1.960	-7.177	-0.896	0.000	0.000	-0.726	-1.581	-1.500	0.000	1	0.265	0.000
L282-0583	1		-89.96	-13.426	-1.546	-6.874	-0.824	0.000	0.000	-1.600	-2.089	-0.750	0.000	1	0.258	0.000
L282-0561	1		-88.78	-13.391	-1.953	-6.877	-0.914	0.000	0.000	-0.713	-1.686	-1.500	0.000	1	0.252	0.000
L282-0268	1		-89.35	-13.367	-1.426	-6.740	-0.681	0.000	0.000	-1.600	-1.692	-1.500	0.000	1	0.272	0.000

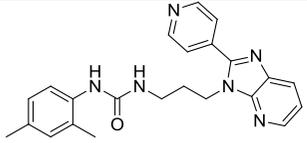
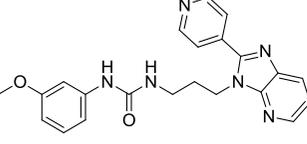
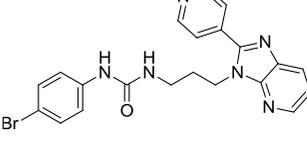
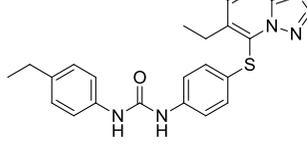
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F873-0528	2		-83.32	-13.350	-1.575	-6.338	-0.876	0.000	-0.139	-0.915	-2.362	-1.500	0.000	1	0.354	0.000
F873-0477	2		-86.97	-13.338	-1.990	-7.012	-0.714	0.000	-0.165	-0.433	-1.945	-1.500	0.000	1	0.419	0.000
F873-0488	2		-81.23	-13.337	-2.060	-6.855	-0.705	0.000	-0.084	-0.638	-1.825	-1.500	0.000	1	0.330	0.000
F873-0473	2		-86.71	-13.330	-2.005	-6.746	-0.883	0.000	-0.144	-0.417	-1.992	-1.500	0.000	1	0.356	0.000

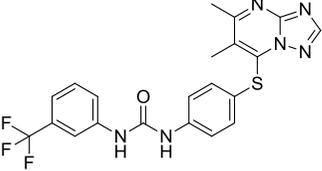
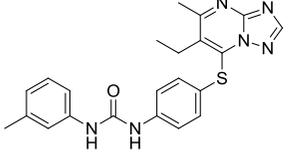
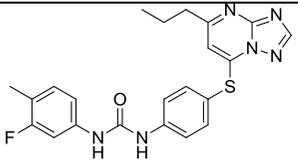
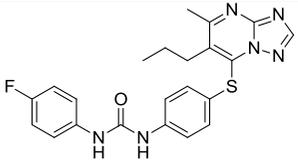
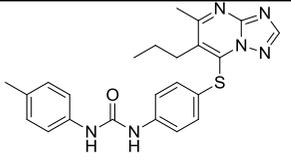
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F279-0268	14		-70.07	-13.238	-1.575	-7.016	-1.010	0.000	0.000	-1.142	-2.700	0.000	0.000	1	0.205	0.000
L282-0248	1		-91.75	-13.228	-1.945	-6.793	-0.800	0.000	0.000	-0.990	-1.447	-1.500	0.000	1	0.248	0.000
L282-0148	1		-94.25	-13.227	-1.803	-6.758	-0.869	0.000	0.000	-0.737	-1.800	-1.500	0.000	1	0.240	0.000
F873-0499	2		-80.22	-13.201	-2.100	-6.767	-0.699	0.000	-0.212	-0.470	-1.900	-1.500	0.000	1	0.447	0.000

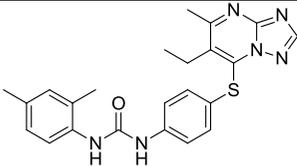
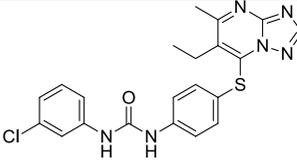
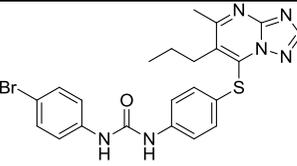
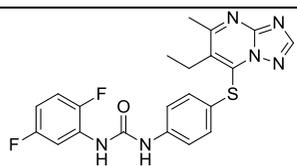
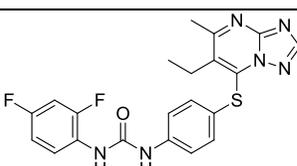
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F873-0504	2		-78.86	-13.146	-1.519	-7.035	-0.855	0.000	-0.165	-0.468	-2.023	-1.500	0.000	1	0.419	0.000
F873-0467	2		-89.95	-13.130	-2.100	-6.675	-0.700	0.000	-0.159	-0.484	-1.927	-1.500	0.000	1	0.415	0.000
F873-0500	2		-78.01	-13.109	-2.053	-6.750	-0.741	0.000	0.000	-0.407	-1.953	-1.500	0.000	1	0.295	0.000
L282-0164	1		-89.24	-13.093	-1.920	-6.577	-0.847	0.000	-0.058	-0.765	-1.700	-1.500	0.000	1	0.274	0.000

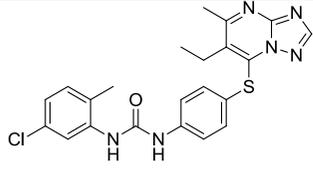
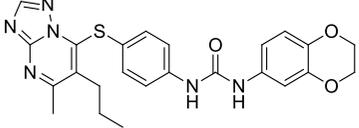
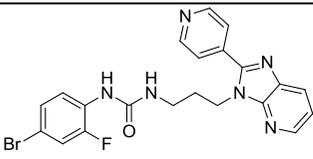
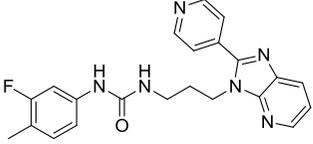
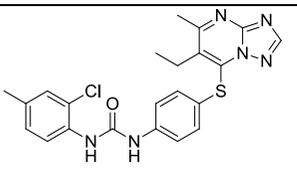
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0124	1		-89.98	-13.073	-1.911	-6.375	-0.870	0.000	0.000	-1.600	-1.062	-1.500	0.000	1	0.246	0.000
L282-0182	1		-86.35	-13.057	-1.551	-6.472	-0.790	0.000	-0.105	-0.729	-2.200	-1.500	0.000	1	0.290	0.000
L282-0264	1		-87.27	-13.019	-1.517	-6.405	-0.832	0.000	-0.045	-1.156	-1.876	-1.500	0.000	1	0.314	0.000
L282-0549	1		-86.80	-13.011	-1.523	-6.423	-0.805	0.000	-0.045	-0.934	-2.050	-1.500	0.000	1	0.269	0.000
L282-0562	1		-86.83	-13.000	-1.987	-6.659	-0.932	0.000	-0.058	-0.703	-1.479	-1.500	0.000	1	0.319	0.000

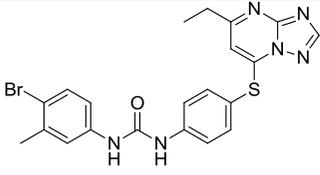
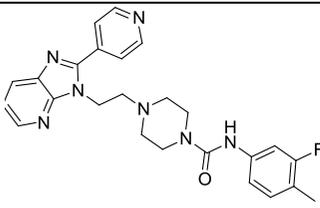
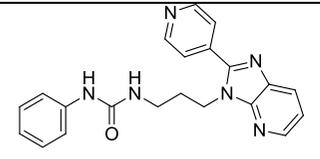
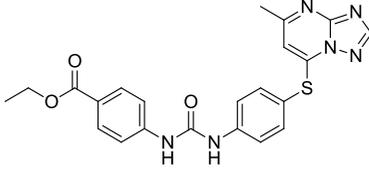
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0186	1		-85.22	-12.983	-1.391	-6.386	-0.845	0.000	-0.058	-0.732	-2.345	-1.500	0.000	1	0.274	0.000
L282-0172	1		-89.85	-12.977	-1.974	-6.446	-0.942	0.000	-0.037	-0.741	-1.559	-1.500	0.000	1	0.222	0.000
L282-0571	1		-84.43	-12.976	-2.032	-6.601	-0.893	0.000	0.000	-0.757	-1.406	-1.500	0.000	1	0.212	0.000
L282-0703	1		-82.64	-12.904	-1.450	-6.027	-0.830	0.000	-0.032	-1.323	-1.963	-1.500	0.000	1	0.221	0.000
L282-0204	1		-84.10	-12.898	-1.459	-6.041	-0.823	0.000	-0.032	-1.136	-2.128	-1.500	0.000	1	0.221	0.000

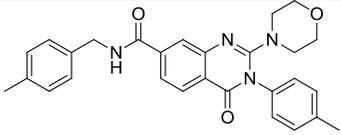
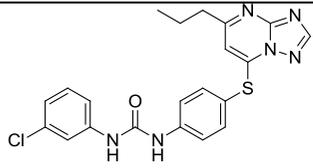
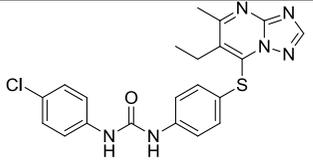
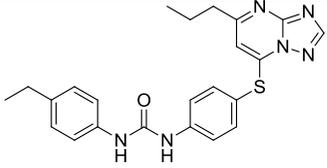
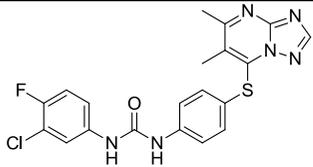
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0175	1		-87.01	-12.885	-1.402	-6.626	-0.832	0.000	0.000	-0.728	-2.048	-1.500	0.000	1	0.252	0.000
L282-0587	1		-85.22	-12.884	-1.494	-6.916	-0.938	0.000	0.000	-0.755	-1.511	-1.500	0.000	1	0.229	0.000
F873-0498	2		-82.91	-12.874	-1.479	-6.924	-0.752	0.000	0.000	-0.616	-1.878	-1.500	0.000	1	0.275	0.000
F873-0513	2		-86.46	-12.870	-1.422	-6.758	-0.895	0.000	-0.152	-0.780	-1.775	-1.500	0.000	1	0.412	0.000
L282-0156	1		-84.16	-12.863	-1.382	-6.467	-0.818	0.000	0.000	-0.726	-2.221	-1.500	0.000	1	0.252	0.000

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0514	1		-87.89	-12.849	-2.018	-6.322	-0.894	0.000	0.000	-0.763	-1.575	-1.500	0.000	1	0.223	0.000
L712-0522	2		-65.73	-12.845	-1.306	-7.549	-0.469	0.000	0.000	-0.858	-1.449	-1.500	0.000	1	0.286	0.000
F873-0471	2		-83.60	-12.835	-1.945	-6.747	-0.837	0.000	-0.259	-0.380	-1.586	-1.500	0.000	1	0.418	0.000
L282-0034	1		-74.99	-12.828	-2.052	-5.953	-1.099	0.000	-0.005	-1.084	-1.477	-1.500	0.000	1	0.341	0.000

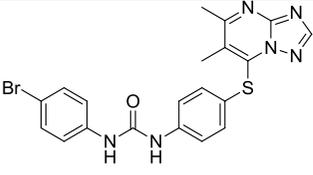
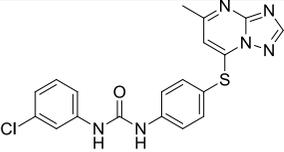
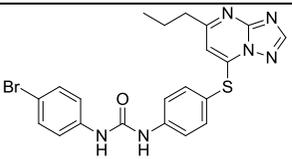
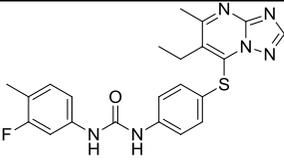
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F072-0646	19		-61.03	-12.810	-1.311	-7.566	-0.564	0.000	0.000	-0.222	-2.385	-1.000	0.000	1	0.236	0.000
L282-0244	1		-90.77	-12.807	-1.958	-6.183	-0.900	0.000	-0.037	-0.769	-1.728	-1.500	0.000	1	0.266	0.000
L282-0149	1		-88.10	-12.797	-2.005	-6.269	-0.944	0.000	-0.037	-0.719	-1.545	-1.500	0.000	1	0.222	0.000
L282-0236	1		-88.25	-12.795	-1.566	-6.705	-0.829	0.000	-0.058	-0.753	-1.703	-1.500	0.000	1	0.319	0.000
L282-0103	1		-92.31	-12.768	-1.877	-6.208	-0.853	0.000	-0.024	-1.112	-1.412	-1.500	0.000	1	0.218	0.000

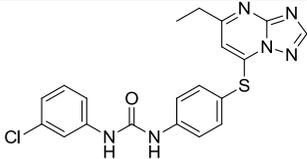
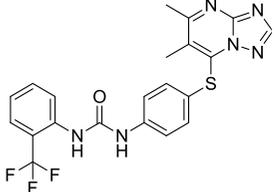
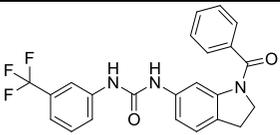
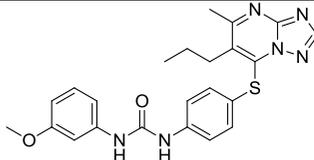
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0210	1		-93.66	-12.754	-2.099	-6.666	-1.015	0.000	0.000	-0.710	-1.017	-1.500	0.000	1	0.254	0.000
L282-0160	1		-83.59	-12.721	-1.890	-6.085	-0.850	0.000	-0.092	-0.894	-1.647	-1.500	0.000	1	0.238	0.000
M976-0252	9		-69.55	-12.702	-0.815	-6.968	-0.420	0.000	-0.148	-0.452	-2.656	-1.500	0.000	1	0.256	0.000
L282-0242	1		-84.87	-12.699	-1.944	-5.968	-0.804	0.000	-0.152	-0.764	-1.875	-1.500	0.000	1	0.309	0.000
G069-0814	3		-78.34	-12.688	-1.558	-5.784	-0.856	0.000	-0.159	-0.892	-2.700	-1.000	0.000	1	0.260	0.000

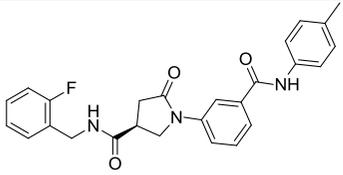
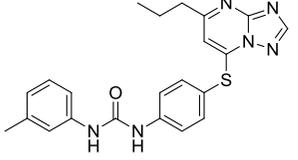
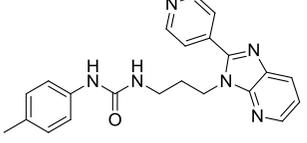
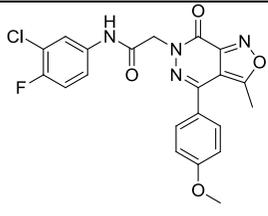
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0111	1		-86.25	-12.667	-1.996	-6.040	-0.877	0.000	0.000	-0.757	-1.693	-1.500	0.000	1	0.196	0.000
L282-0025	1		-85.72	-12.653	-1.988	-5.984	-0.944	0.000	-0.130	-0.732	-1.625	-1.500	0.000	1	0.250	0.000
L282-0255	1		-87.16	-12.637	-1.994	-6.185	-0.786	0.000	0.000	-0.767	-1.629	-1.500	0.000	1	0.223	0.000
L282-0192	1		-87.98	-12.563	-1.633	-6.194	-0.879	0.000	-0.045	-1.151	-1.430	-1.500	0.000	1	0.269	0.000

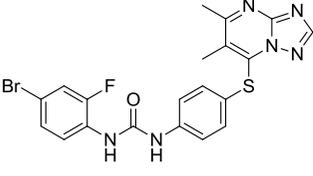
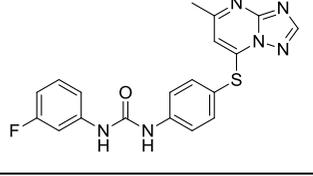
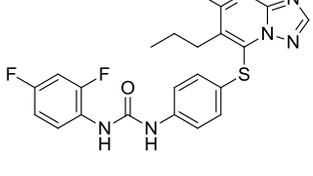
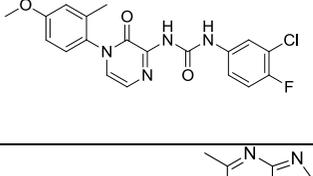
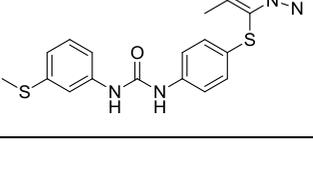
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0488	1		-88.41	-12.560	-1.882	-6.229	-0.871	0.000	-0.084	-0.750	-1.480	-1.500	0.000	1	0.235	0.000
L282-0089	1		-80.51	-12.548	-1.382	-6.079	-0.752	0.000	0.000	-1.350	-1.730	-1.500	0.000	1	0.246	0.000
L439-0154	18		-68.66	-12.503	-1.468	-6.767	-0.726	0.000	-0.082	-1.197	-2.544	0.000	0.000	1	0.282	0.000
L282-0556	1		-92.01	-12.465	-1.551	-6.852	-0.785	0.000	-0.005	-0.721	-2.100	-0.750	0.000	1	0.299	0.000

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
M406-1275	18		-66.53	-12.413	-1.223	-7.422	-0.642	0.000	-0.015	-0.994	-2.420	0.000	0.000	1	0.302	0.000
L282-0254	1		-87.83	-12.396	-1.309	-6.365	-0.624	0.000	-0.105	-0.652	-1.719	-1.962	0.000	1	0.339	0.000
F873-0485	2		-85.03	-12.381	-1.577	-6.789	-0.821	0.000	-0.212	-0.382	-1.917	-1.130	0.000	1	0.447	0.000
F279-0188	14		-71.86	-12.314	-1.575	-6.940	-0.980	0.000	-0.024	-0.309	-2.661	0.000	0.000	1	0.175	0.000

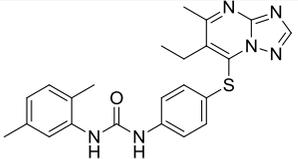
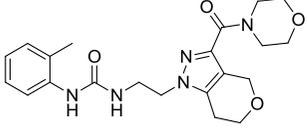
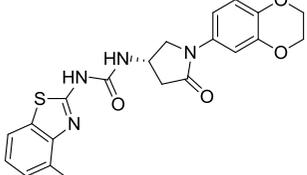
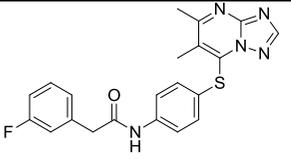
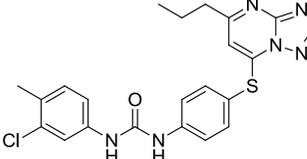
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0109	1		-87.18	-12.294	-1.605	-6.007	-0.828	0.000	0.000	-1.053	-1.484	-1.500	0.000	1	0.183	0.000
L282-0070	1		-81.30	-12.285	-1.886	-5.686	-0.913	0.000	-0.185	-1.115	-1.268	-1.500	0.000	1	0.269	0.000
L282-0590	1		-84.53	-12.272	-1.457	-6.507	-0.880	0.000	0.000	-1.116	-1.062	-1.500	0.000	1	0.250	0.000
L606-0429	11		-59.98	-12.256	-1.475	-5.636	-0.595	0.000	-0.157	-0.400	-2.700	-1.500	0.000	1	0.207	0.000
L282-0138	1		-94.95	-12.252	-1.953	-6.509	-0.926	0.000	-0.045	-0.724	-0.864	-1.500	0.000	1	0.269	0.000

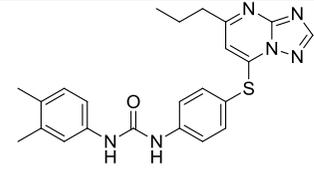
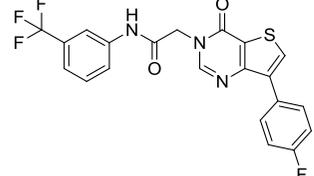
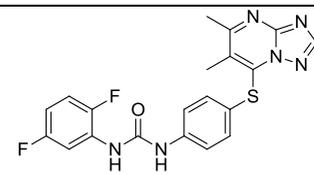
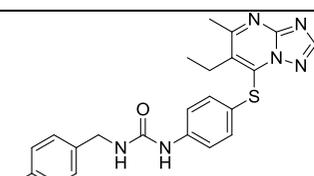
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
M976-0091	9		-70.82	-12.249	-1.221	-6.057	-0.929	0.000	-0.062	-1.464	-2.700	0.000	0.000	1	0.183	0.000
L282-0269	1		-88.77	-12.216	-1.799	-6.719	-0.799	0.000	0.000	-0.754	-1.643	-0.750	0.000	1	0.247	0.000
L282-0247	1		-90.40	-12.205	-1.461	-6.776	-0.863	0.000	0.000	-0.753	-1.145	-1.500	0.000	1	0.293	0.000
F873-0489	2		-86.35	-12.189	-1.463	-6.741	-0.927	0.000	-0.159	-0.378	-1.437	-1.500	0.000	1	0.415	0.000
L282-0253	1		-81.63	-12.185	-1.529	-6.989	-0.869	0.000	0.000	-0.740	-0.850	-1.500	0.000	1	0.293	0.000

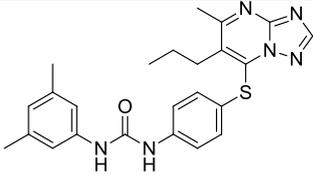
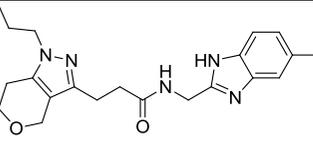
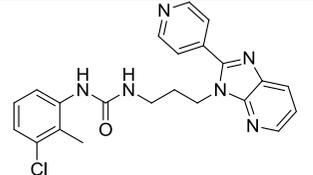
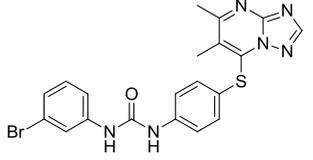
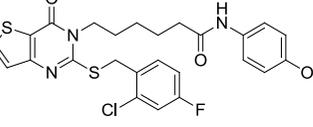
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0151	1		-86.55	-12.154	-1.328	-6.592	-0.896	0.000	-0.058	-0.722	-1.469	-1.363	0.000	1	0.274	0.000
SD31-0200	5		-73.73	-12.154	-1.575	-6.354	-0.656	0.000	-0.122	-0.175	-2.667	-1.000	0.000	1	0.396	0.000
G856-2311	18		-83.84	-12.123	-1.333	-6.732	-0.765	0.000	-0.085	-0.235	-2.686	-0.524	0.000	1	0.236	0.000
L281-0113	1		-83.83	-12.118	-1.469	-5.890	-0.840	0.000	-0.142	-1.132	-1.401	-1.500	0.000	1	0.254	0.000
L282-0227	1		-91.22	-12.091	-1.568	-6.835	-0.765	0.000	0.000	-0.752	-1.714	-0.750	0.000	1	0.293	0.000

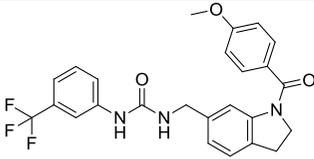
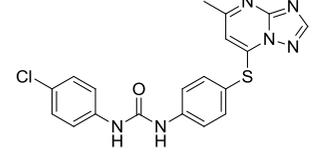
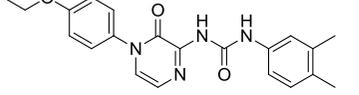
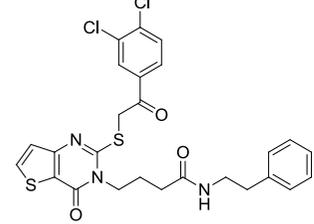
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0240	1		-90.26	-12.050	-1.524	-6.739	-0.873	0.000	-0.058	-0.760	-0.914	-1.500	0.000	1	0.319	0.000
L114-0409	20		-75.48	-12.048	-0.998	-6.372	-0.584	0.000	-0.009	-1.600	-2.700	0.000	0.000	1	0.214	0.000
L282-0696	1		-86.74	-12.006	-1.506	-5.819	-0.887	0.000	-0.079	-1.363	-1.087	-1.500	0.000	1	0.234	0.000
L282-0208	1		-80.40	-12.002	-1.280	-6.115	-0.766	0.000	-0.045	-0.875	-1.691	-1.500	0.000	1	0.269	0.000

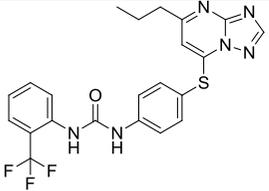
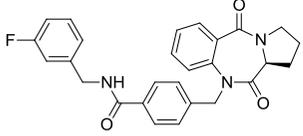
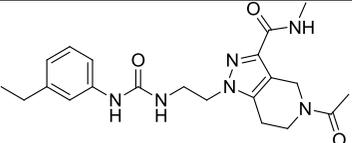
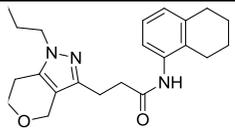
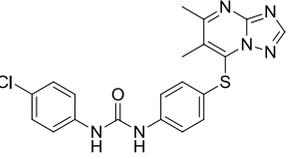
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0543	1		-79.30	-11.989	-1.203	-6.609	-0.734	0.000	-0.011	-0.782	-1.450	-1.500	0.000	1	0.301	0.000
SD48-0416	5		-68.00	-11.969	-1.327	-6.763	-0.710	0.000	-0.228	-0.335	-2.007	-1.000	0.000	1	0.400	0.000
F873-0497	2		-79.12	-11.962	-0.803	-6.843	-0.780	0.000	-0.097	-0.406	-1.915	-1.500	0.000	1	0.383	0.000
L282-0692	1		-89.88	-11.955	-1.682	-6.396	-0.882	0.000	0.000	-0.717	-0.975	-1.500	0.000	1	0.196	0.000
K292-1240	20		-84.68	-11.863	-0.872	-7.542	-0.435	0.000	0.000	-0.160	-1.682	-1.500	0.000	1	0.327	0.000

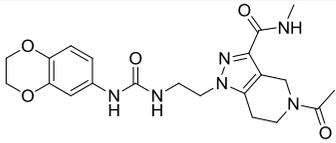
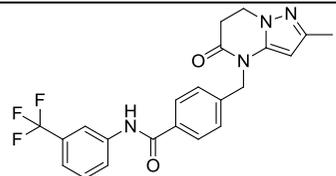
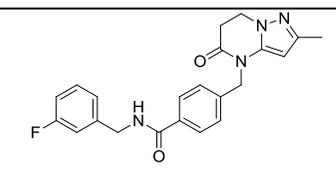
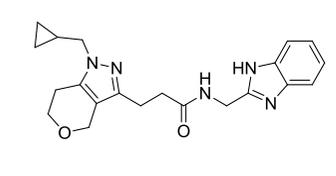
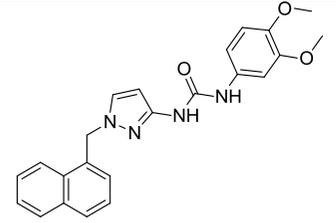
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L057-1565	18		-70.50	-11.842	-0.843	-6.852	-0.798	0.000	0.000	-1.434	-2.190	0.000	0.000	1	0.275	0.000
L282-0002	1		-83.62	-11.819	-1.978	-5.838	-0.897	0.000	-0.130	-0.730	-0.995	-1.500	0.000	1	0.250	0.000
L606-0268	11		-62.40	-11.721	-1.816	-6.951	-0.979	0.000	-0.239	0.000	-2.084	0.000	0.000	1	0.348	0.000
K292-1313	20		-90.38	-11.640	-1.233	-7.629	-0.702	0.000	0.000	-0.539	-1.786	0.000	0.000	1	0.249	0.000

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L282-0234	1		-80.27	-11.625	-1.335	-6.413	-0.754	0.000	0.000	-1.371	-1.523	-1.500	0.000	1	0.272	1.000
L610-0084	14		-64.85	-11.571	-0.876	-7.375	-0.604	0.000	0.000	-0.983	-1.938	0.000	0.000	1	0.206	0.000
SD30-0107	5		-76.03	-11.432	-1.884	-6.723	-0.689	0.000	-0.125	-0.610	-1.749	0.000	0.000	1	0.348	0.000
SD48-0344	5		-69.92	-11.388	-1.050	-6.523	-0.332	0.000	-0.275	-0.038	-1.975	-1.500	0.000	1	0.306	0.000
L282-0076	1		-88.87	-11.358	-1.898	-5.988	-0.819	0.000	-0.084	-0.765	-1.541	-1.500	0.000	1	0.235	1.000

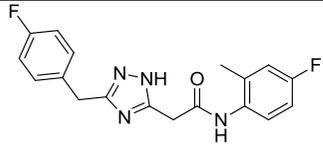
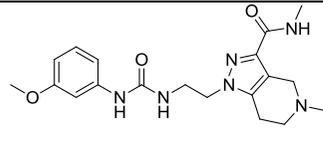
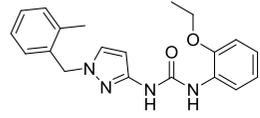
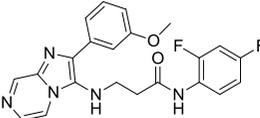
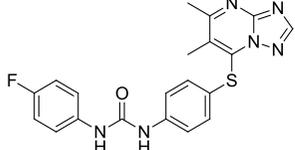
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
SD30-0091	5		-77.68	-11.170	-1.153	-6.782	-0.949	0.000	-0.025	-0.621	-1.903	0.000	0.000	1	0.262	0.000
E856-1926	16		-77.14	-11.158	-0.998	-6.396	-0.499	0.000	-0.072	-1.275	-2.151	0.000	0.000	1	0.232	0.000
E856-2128	16		-65.75	-11.022	-0.998	-6.281	-0.516	0.000	-0.192	-0.607	-2.700	0.000	0.000	1	0.272	0.000
SD48-0542	5		-53.01	-10.958	-1.247	-6.867	-0.639	0.000	-0.235	-0.398	-1.975	0.000	0.000	1	0.404	0.000
Y205-6880	15		-80.95	-10.941	-1.218	-7.598	-0.684	0.000	-0.159	0.000	-1.593	0.000	0.000	1	0.312	0.000

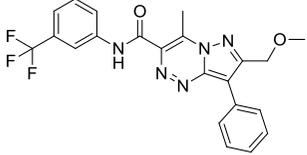
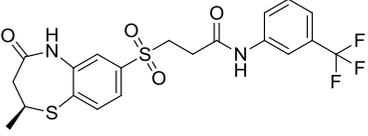
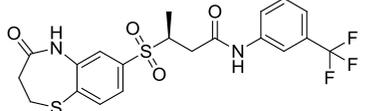
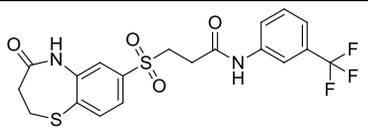
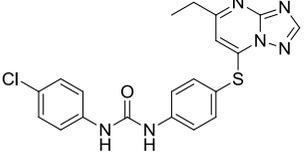
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
M628-0840	19		-66.07	-10.851	-0.512	-5.965	-0.480	0.000	-0.224	-0.622	-1.775	-1.500	0.000	1	0.227	0.000
D401-0169	10		-75.84	-10.828	-1.377	-7.322	-0.707	0.000	-0.008	-0.265	-0.950	-1.500	0.000	1	0.300	1.000
SD30-0092	5		-72.32	-10.820	-1.958	-5.466	-1.028	0.000	-0.238	-0.581	-2.012	0.000	0.000	1	0.464	0.000
J021-2395	8		-69.03	-10.692	-1.602	-4.732	-0.701	0.000	-0.232	-1.432	-0.325	0.000	-1.950	1	0.282	0.000
L282-0013	1		-80.85	-10.685	-1.546	-5.519	-0.935	0.000	-0.185	-0.928	-0.341	-1.500	0.000	1	0.269	0.000

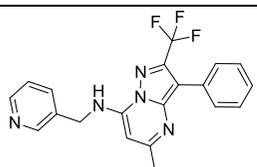
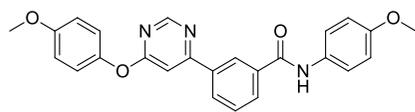
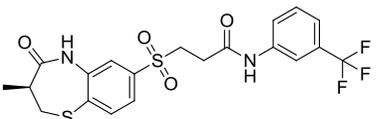
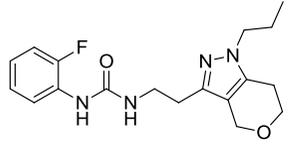
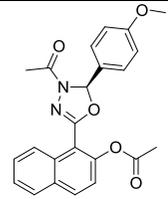
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
P496-2049	8		-58.32	-10.598	-0.966	-5.287	-0.931	0.000	-0.359	-0.982	-2.489	0.000	0.000	1	0.416	0.000
SD30-0088	5		-84.86	-10.552	-1.241	-6.517	-0.825	0.000	-0.118	-0.561	-1.635	0.000	0.000	1	0.345	0.000
Y205-1832	15		-59.81	-10.460	-1.282	-6.495	-0.663	0.000	-0.332	0.000	-1.788	-0.366	0.000	1	0.466	0.000
P349-2419	10		-52.36	-10.382	-1.050	-5.101	-0.497	0.000	-0.089	-0.955	-1.475	-1.500	0.000	1	0.284	0.000
L282-0087	1		-86.64	-10.359	-1.538	-5.763	-0.856	0.000	-0.138	-0.941	-0.874	-1.500	0.000	1	0.253	1.000

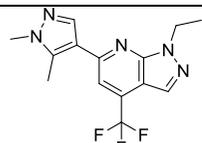
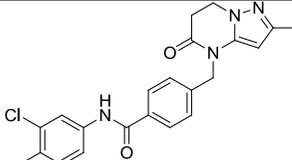
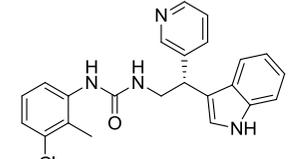
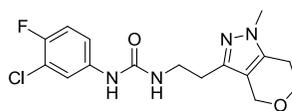
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
8020-0249	1		-60.75	-10.334	-0.948	-5.700	-0.510	0.000	-0.029	-1.435	-1.933	0.000	0.000	1	0.220	0.000
L705-1192	3		-71.25	-10.304	-1.555	-6.469	-0.790	0.000	0.000	-1.510	-1.982	-1.000	0.000	1	0.233	2.769
L705-0406	3		-74.43	-10.217	-1.529	-6.258	-0.960	0.000	0.000	-1.435	-1.995	-1.000	0.000	1	0.194	2.766
L705-0013	3		-74.78	-10.147	-1.556	-6.144	-0.939	0.000	0.000	-1.450	-2.056	-1.000	0.000	1	0.205	2.793
L282-0465	1		-82.23	-10.146	-1.216	-6.186	-0.635	0.000	-0.084	-0.597	-1.664	0.000	0.000	1	0.235	0.000

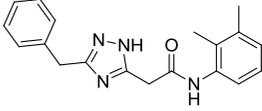
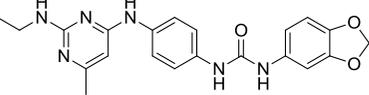
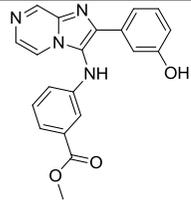
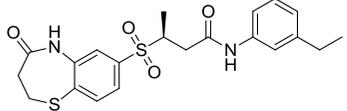
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
D724-0709	10		-45.29	-10.136	-0.690	-5.429	-0.293	0.000	-0.222	-1.020	-1.960	-0.750	0.000	1	0.227	0.000
L534-0066	16		-65.96	-10.112	-0.933	-7.018	-0.374	0.000	-0.075	-0.400	-1.592	0.000	0.000	1	0.279	0.000
L705-2371	3		-76.61	-10.063	-1.002	-6.989	-0.562	0.000	0.000	-1.600	-1.447	-1.500	0.000	1	0.233	2.804
SA55-4102	5		-70.82	-10.055	-0.998	-5.702	-0.578	0.000	-0.345	-0.393	-2.447	0.000	0.000	1	0.407	0.000
G642-6351	1		-60.20	-9.925	-0.554	-5.698	-0.320	0.000	-0.152	-0.655	-2.700	0.000	0.000	1	0.154	0.000

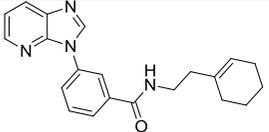
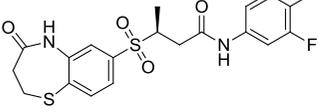
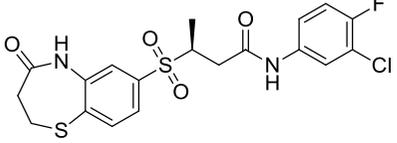
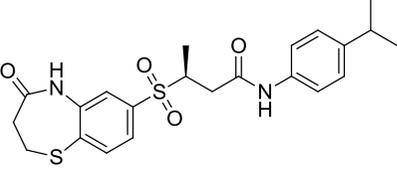
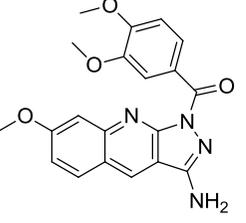
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Y504-8080	7		-45.52	-9.868	-0.797	-3.939	-0.399	0.000	-0.469	-1.246	-1.600	-1.500	0.000	1	0.083	0.000
E856-1982	16		-68.20	-9.840	-0.944	-6.493	-0.430	0.000	-0.137	-0.213	-1.875	0.000	0.000	1	0.252	0.000
G715-1190	13		-46.02	-9.756	-0.536	-6.576	-0.728	0.000	-0.150	0.000	-2.126	0.000	0.000	1	0.360	0.000
D126-0182	17		-53.42	-9.749	-0.743	-6.169	-0.399	0.000	-0.182	-0.236	-2.288	0.000	0.000	1	0.268	0.000
SA55-0664	5		-73.03	-9.736	-1.115	-5.161	-0.955	0.000	-0.324	-0.376	-2.135	0.000	0.000	1	0.329	0.000

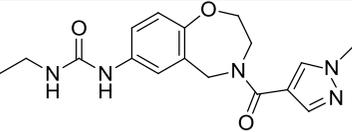
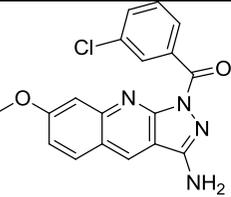
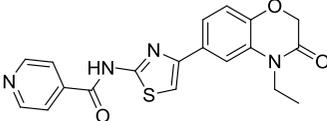
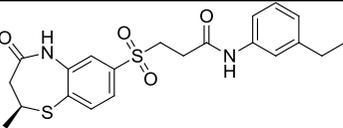
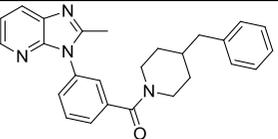
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
P496-1807	8		-49.14	-9.718	-0.966	-5.383	-0.942	0.000	-0.432	-0.261	-2.200	0.000	0.000	1	0.468	0.000
P184-0141	15		-40.90	-9.624	-0.897	-4.693	-0.376	0.000	-0.500	-0.302	-1.546	-1.500	0.000	1	0.189	0.000
D577-0132	1		-77.70	-9.621	-1.105	-6.735	-0.780	0.000	-0.145	-0.583	-0.579	0.000	0.000	1	0.306	0.000
D401-0776	10		-53.74	-9.613	-1.027	-5.073	-0.357	0.000	-0.299	-0.615	-0.996	-1.500	0.000	1	0.253	0.000
L705-0536	3		-74.55	-9.520	-1.555	-6.516	-0.934	0.000	-0.058	-0.482	-1.969	-1.000	0.000	1	0.228	2.766

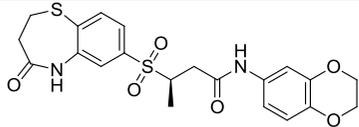
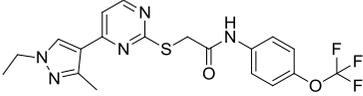
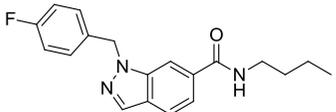
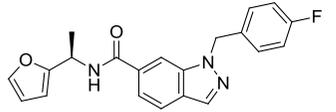
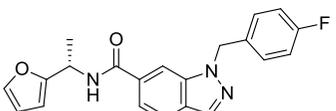
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
E760-5049	7		-56.09	-9.506	-0.363	-5.557	-0.499	0.000	-0.345	-0.549	-2.531	0.000	0.000	1	0.339	0.000
L705-0549	3		-73.48	-9.487	-1.558	-6.253	-0.955	0.000	-0.045	-0.840	-1.930	-1.000	0.000	1	0.224	2.868
L705-0553	3		-77.21	-9.394	-1.361	-6.305	-0.879	0.000	0.000	-0.872	-1.908	-1.000	0.000	1	0.165	2.766
L705-0535	3		-72.11	-9.389	-1.531	-6.768	-1.093	0.000	-0.011	-0.403	-1.604	-1.000	0.000	1	0.215	2.806
C594-0040	14		-47.59	-9.353	-0.791	-5.411	-0.554	0.115	-0.239	-0.313	-2.275	0.000	0.000	1	0.116	0.000

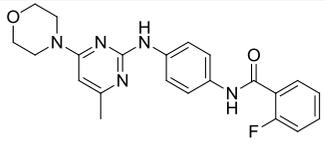
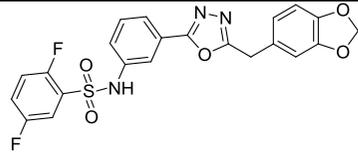
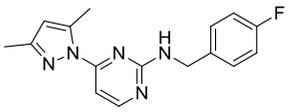
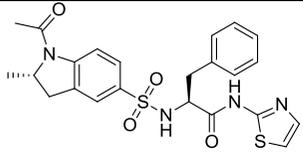
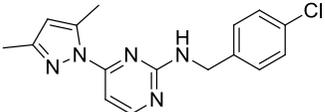
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
S555-0957	-		-46.48	-9.288	-1.076	-4.267	-0.458	0.000	-0.355	-0.201	-1.775	-1.500	0.000	1	0.345	0.000
C594-0007	14		-47.19	-9.225	-0.768	-5.116	-0.560	0.000	-0.324	-0.314	-2.275	0.000	0.000	1	0.131	0.000
D437-0357	-		-69.33	-9.194	-0.910	-5.394	-0.643	0.000	-0.232	-0.326	-1.917	0.000	0.000	1	0.230	0.000
L705-1322	3		-71.04	-9.171	-1.544	-6.725	-0.736	0.000	-0.058	-0.532	-1.595	-1.000	0.000	1	0.273	2.746
E760-5361	7		-47.13	-9.113	-0.178	-6.370	-0.119	0.327	-0.132	-0.360	-2.533	0.000	0.000	1	0.251	0.000

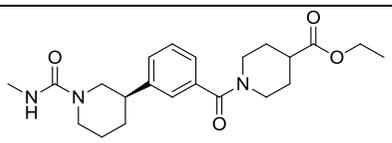
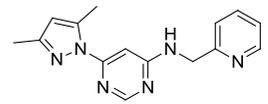
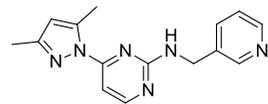
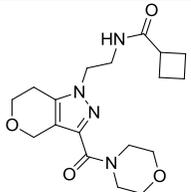
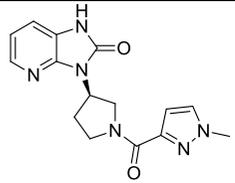
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
L705-0544	3		-69.47	-8.998	-0.974	-6.432	-0.948	0.000	0.000	-0.579	-1.986	-1.000	0.000	1	0.161	2.759
C618-0605	14		-65.08	-8.900	-0.342	-5.117	-0.370	0.000	-0.162	-1.142	-1.975	0.000	0.000	1	0.209	0.000
Y503-1558	-		-62.24	-8.848	-0.541	-5.081	-0.942	0.000	-0.042	-1.255	-1.300	0.000	0.000	1	0.313	0.000
G339-1044	15		-47.17	-8.837	-0.925	-5.104	-0.424	0.000	-0.415	0.000	-2.424	0.000	0.000	1	0.455	0.000
G339-1060	15		-54.23	-8.811	-0.350	-6.334	-0.135	0.000	-0.289	-0.326	-1.689	0.000	0.000	1	0.312	0.000
G339-1060	15		-54.45	-8.717	-0.350	-6.141	-0.045	0.000	-0.289	-0.333	-1.871	0.000	0.000	1	0.312	0.000

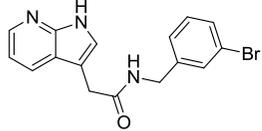
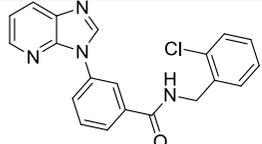
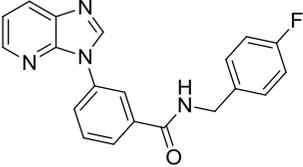
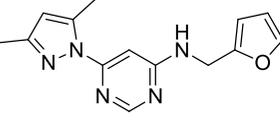
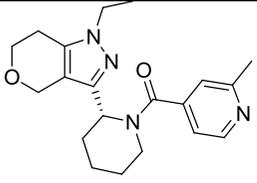
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
G869-0647	16		-65.78	-8.643	-0.568	-6.708	-0.462	0.000	-0.142	-0.645	-0.423	0.000	0.000	1	0.305	0.000
L603-0441	3		-63.50	-8.554	0.000	-6.394	-0.214	0.000	0.000	-1.161	-1.018	0.000	0.000	1	0.234	0.000
P592-0447	6		-45.46	-8.427	-0.445	-4.836	-0.028	0.000	-0.500	-0.704	-0.769	-1.500	0.000	1	0.356	0.000
E570-2684	3		-18.45	-8.374	-0.405	-4.771	-0.478	0.000	0.000	-0.903	-1.341	-0.698	0.000	1	0.222	0.000
P592-0452	6		-51.24	-8.281	-0.583	-4.544	-0.050	0.000	-0.454	-0.677	-0.796	-1.500	0.000	1	0.323	0.000

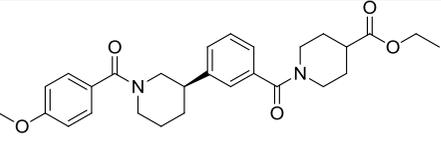
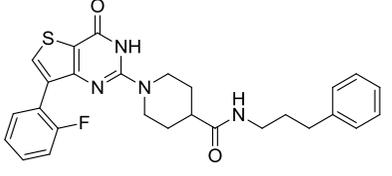
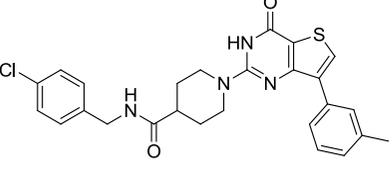
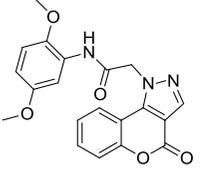
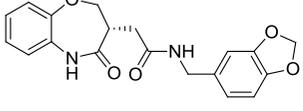
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F926-1791	19		-47.87	-8.274	-0.134	-5.957	-0.069	0.165	-0.162	-0.454	-1.976	0.000	0.000	1	0.313	0.000
P774-4284	6		-49.36	-8.117	-0.590	-4.613	-0.046	0.000	-0.500	-0.712	-0.550	-1.500	0.000	1	0.394	0.000
P592-0475	6		-46.13	-8.081	-0.675	-4.216	-0.052	0.000	-0.500	-0.682	-0.850	-1.500	0.000	1	0.394	0.000
SD31-0132	5		-32.35	-7.989	-1.035	-5.250	-0.180	0.000	-0.292	-0.557	-1.551	-0.500	0.000	1	0.376	1.000
S606-0855	19		-44.14	-7.926	-0.700	-3.781	-0.360	0.000	-0.459	-0.851	-1.570	0.000	-1.950	1	0.245	1.500

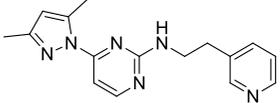
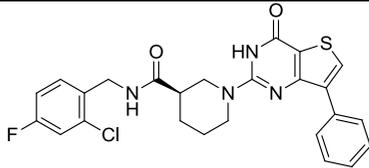
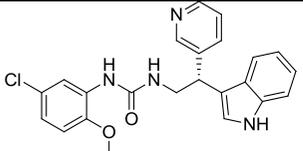
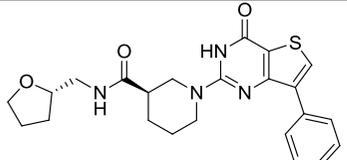
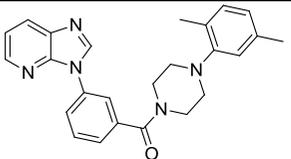
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
M508-0654	-		-48.09	-7.918	-0.827	-5.103	-0.377	0.000	-0.353	-0.365	-1.100	0.000	0.000	1	0.206	0.000
E760-4921	7		-60.95	-7.604	-0.350	-5.026	-0.307	0.000	-0.291	-0.656	-1.225	0.000	0.000	1	0.250	0.000
E760-5022	7		-60.86	-7.563	-0.350	-4.847	-0.336	0.000	-0.345	-0.633	-1.323	0.000	0.000	1	0.272	0.000
P774-4295	6		-47.33	-7.464	-0.408	-4.350	0.056	0.000	-0.500	-0.721	-0.550	-1.413	0.000	1	0.422	0.000
S892-0815	5		-27.70	-7.401	-0.266	-5.322	0.185	0.000	-0.319	-0.349	-1.525	0.000	0.000	1	0.196	0.000

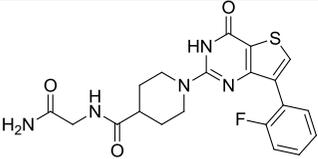
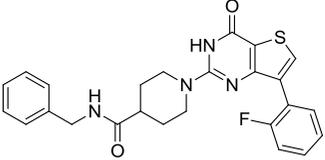
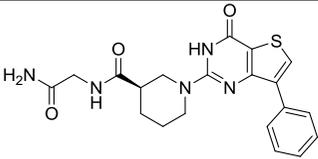
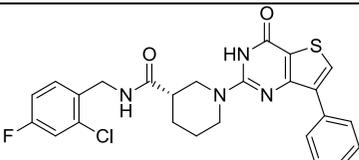
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
F925-0583	20		-60.93	-7.360	-0.352	-5.795	-0.170	0.853	0.000	-0.533	-1.628	0.000	0.000	1	0.265	0.000
Z250-1124	4		-74.15	-7.116	-0.926	-7.117	-0.592	0.000	0.000	-0.578	-1.235	0.000	0.000	1	0.254	3.079
Z250-2585	4		-60.38	-6.973	-0.998	-7.185	-0.524	0.000	0.000	-0.291	-1.244	0.000	0.000	1	0.180	3.089
C434-0074	14		-49.20	-6.914	-0.255	-4.569	-0.310	0.000	-0.235	-0.348	-1.369	0.000	0.000	1	0.173	0.000
L831-0075	3		-59.17	-6.790	-0.990	-5.006	-0.343	0.000	-0.319	-0.568	-1.948	0.000	0.000	1	0.196	2.189

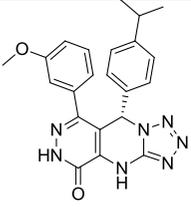
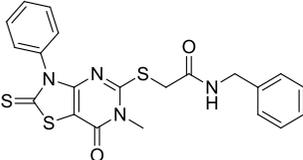
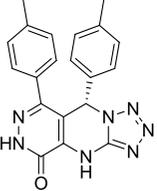
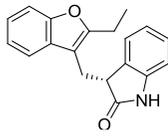
Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
P592-0478	6		-49.49	-6.743	-0.281	-4.862	0.014	0.000	-0.500	-0.671	-0.550	-0.254	0.000	1	0.362	0.000
Z250-1306	4		-53.46	-6.734	-0.580	-5.429	-0.486	0.000	0.000	-0.265	-2.600	-0.761	0.000	1	0.177	3.211
G715-1174	13		-50.46	-6.625	-0.212	-4.806	-0.285	0.000	-0.097	-0.262	-1.297	0.000	0.000	1	0.335	0.000
Z250-1343	4		-45.60	-6.622	-0.700	-4.872	-0.572	0.000	-0.038	-0.287	-2.500	-1.000	0.000	1	0.222	3.124
E760-4966	7		-65.75	-6.188	-0.084	-5.010	-0.365	0.000	-0.128	-0.741	-1.059	0.000	0.000	1	0.200	1.000

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Z250-1127	4		-53.56	-6.187	-1.235	-4.255	-0.737	0.086	-0.068	-0.329	-2.181	-0.805	0.000	1	0.231	3.107
Z250-1102	4		-60.20	-6.029	-0.281	-6.967	-0.257	0.000	0.000	-0.313	-1.471	0.000	0.000	1	0.202	3.057
Z250-1322	4		-53.06	-6.008	-0.924	-4.552	-0.698	0.000	-0.128	-0.456	-2.534	-0.187	0.000	1	0.249	3.222
Z250-1306	4		-62.37	-5.944	-0.119	-5.882	-0.355	0.000	0.000	-0.293	-2.575	0.000	0.000	1	0.177	3.104

Продолжение таблицы А

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
D402-0137	12		-38.23	-5.080	-0.218	-5.356	0.080	0.000	-0.115	-0.313	-2.252	0.000	0.000	1	0.098	2.997
F143-0019	20		-31.53	-4.788	-0.776	-5.720	-0.229	0.000	0.000	-0.713	0.000	0.000	0.000	1	0.250	2.400
D188-0034	12		-34.55	-4.398	0.000	-4.788	-0.004	0.000	-0.262	-0.344	-2.143	0.000	0.000	1	0.120	3.023
D330-0151	9		-42.74	-4.295	-0.222	-4.749	-0.118	0.000	-0.500	-0.213	-2.700	0.000	0.000	1	0.184	4.023
Z250-1288	4		-52.23	-2.767	-0.350	-4.908	-0.477	0.000	0.000	-0.286	0.000	0.000	0.000	1	0.246	3.007

Приложение Б

Результат *in vitro* исследования библиотеки коммерческих соединений

Таблица Б – Результат МТТ-теста

Код соединения	НСТ 116	SW837	SW948
	% ВЫЖИВШИХ КЛЕТОК		
1	2	3	4
8020-0249	97	100	105
C434-0074	94	107	110
C594-0007	8	18	17
C594-0040	95	109	102
C618-0605	87	100	108
D358-0936	82	93	102
D401-0169	89	106	96
D401-0776	82	109	95
D437-0357	48	37	7
D577-0132	0	0	0
D724-0709	104	117	102
E760-4921	117	112	104
E760-4966	100	101	108
E760-5022	112	126	112
E856-1926	89	91	95
E856-1982	90	93	99
E856-2128	95	88	109
F072-0646	114	106	112
F279-0188	129	105	107
F279-0268	119	109	91
F873-0467	111	117	111
F873-0471	110	117	112
F873-0473	107	119	111
F873-0477	86	104	98
F873-0480	89	89	77
F873-0481	112	108	112
F873-0485	117	123	106
F873-0488	114	108	108
F873-0489	115	117	112
F873-0492	111	118	101
F873-0497	93	103	102
F873-0498	81	103	83
F873-0499	101	105	101

Продолжение таблицы Б

1	2	3	4
F873-0500	115	120	110
F873-0504	115	109	107
F873-0513	115	117	110
F873-0519	107	91	93
F873-0528	110	101	113
F925-0583	99	112	107
F926-1791	89	94	95
G069-0814	106	95	106
G339-1044	104	117	89
G339-1060	114	108	94
G642-6351	7	32	92
G715-1158	121	106	109
G715-1174	117	111	115
G715-1190	97	108	102
G856-2311	84	92	92
G869-0647	45	17	-3
J021-2395	107	124	109
K292-1240	105	102	118
K292-1313	68	127	94
L057-1565	46	53	1
L114-0409	95	147	104
L281-0113	82	104	101
L282-0002	16	24	0
L282-0013	77	54	29
L282-0025	55	50	3
L282-0034	59	54	9
L282-0051	56	54	3
L282-0070	70	60	1
L282-0076	0	68	6
L282-0087	93	105	106
L282-0089	70	97	89
L282-0103	14	48	34
L282-0109	0	0	0
L282-0111	0	53	3
L282-0124	35	73	61
L282-0138	73	89	86
L282-0148	101	105	116
L282-0149	34	75	56
L282-0151	56	78	80

Продолжение таблицы Б

1	2	3	4
L282-0156	59	64	77
L282-0160	84	84	94
L282-0164	4	82	24
L282-0172	4	62	51
L282-0175	0	54	19
L282-0176	0	54	31
L282-0182	45	75	74
L282-0186	54	88	86
L282-0192	6	80	34
L282-0196	0	22	0
L282-0204	60	74	64
L282-0208	66	75	90
L282-0210	37	68	70
L282-0227	9	30	0
L282-0234	75	69	76
L282-0236	5	22	0
L282-0240	38	81	53
L282-0242	65	68	79
L282-0244	0	30	0
L282-0247	9	36	24
L282-0248	0	25	0
L282-0253	5	31	0
L282-0254	12	24	0
L282-0255	4	25	0
L282-0264	12	44	0
L282-0268	0	27	0
L282-0269	10	30	0
L282-0465	5	19	0
L282-0488	1	24	0
L282-0514	0	19	0
L282-0537	61	74	94
L282-0543	33	88	69
L282-0549	0	52	26
L282-0556	37	65	73
L282-0561	0	51	56
L282-0562	41	60	53
L282-0571	0	58	60
L282-0583	8	47	68
L282-0587	63	63	92
L282-0590	28	55	18

Продолжение таблицы Б

1	2	3	4
L282-0692	-2	25	-5
L282-0696	42	60	53
L282-0703	80	78	75
L439-0154	45	38	-8
L534-0066	103	102	105
L603-0441	121	93	107
L606-0268	100	151	129
L606-0429	81	87	43
L610-0084	103	109	98
L705-0013	101	87	112
L705-0406	78	78	98
L705-0535	90	84	99
L705-0536	106	82	99
L705-0544	108	95	111
L705-0549	102	88	106
L705-0553	65	87	86
L705-1192	94	105	99
L705-1322	112	110	106
L705-2371	93	82	96
L712-0522	126	101	113
L831-0075	121	106	110
M406-1275	85	151	105
M508-0654	110	99	103
M628-840	93	111	90
M976-0091	77	131	114
M976-0252	98	129	111
P184-0141	121	104	111
P349-2419	123	93	113
P496-1807	118	101	113
P496-2013	118	94	113
P496-2049	107	97	106
P774-4284	93	94	98
S555-0957	97	103	104
S892-0815	116	94	116
SA55-0664	119	106	113
SA55-4102	126	107	116
SD30-0088	122	105	122
SD30-0091	125	105	117
SD30-0107	111	101	115
SD31-0132	88	104	100

Продолжение таблицы Б

SD31-0200	97	93	108
SD48-0344	113	94	107
SD48-0416	119	101	116
SD48-0542	123	104	121
T226-1299	117	94	115
Y205-1832	88	85	99
Y205-6880	85	79	89
Y503-1558	84	92	87
Z250-1102	82	130	128
Z250-1124	97	137	141
Z250-1127	119	104	122
Z250-1288	116	143	133
Z250-1306	103	174	136
Z250-1322	121	98	122
Z250-1343	87	96	101
Z250-2585	64	121	124
D126-0182	96	88	110
D188-0034	110	93	119
D402-0137	105	95	113
E570-2684	123	101	108
E760-5049	119	93	112
E760-5361	90	73	28
F143-0019	93	99	120