

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

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Интерфейс белок-белкового взаимодействия в комплексах молекулярных клеев

Обучающийся

И.Д. Ефименко

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

канд. биол. наук Д.А. Хоченков

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

Консультант

А.Ю. Кудинов

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

Аннотация

Целью данной работы является осуществление *in silico* оценки коллекции соединений Центра медицинской химии с точки зрения возможности проявления активности молекулярного клея IKZF1-CRBN.

В литературном обзоре была освещена концепция молекулярных клеев, их взаимодействие с убиквитин протеасомной системой для целенаправленной деградации, а также описаны *in silico* подходы к их дизайну и сравнения механизмов действия MG и химерных молекул PROTAC. Большое внимание было уделено различным молекулярным клеям на основе лигандов к CRBN. В работе были рассмотрены методы синтезов MG за последние 10 лет.

В экспериментальной части была изложена методика проведения исследований. Был проведен виртуальный скрининг, который помог определить новые потенциальные молекулярные клеи.

В биологической части работы была проведена оценка влияния на жизнеспособность клеток MM, с помощью люминесцентного теста Cell TiterGlo, некоторых исследуемых соединений, а также определена их аффинность к E3-лигазе CRBN при помощи метода микромасштабного термофореза в температурном градиенте.

На основе проделанной работы можно сделать выводы о новых потенциальных молекулярных клеях. Особое внимание стоит уделить соединениям, содержащим сульфо-группу, так как им удалось полностью воспроизвести режим связывания нативного лиганда и продемонстрировать цитотоксический эффект на клеточной линии MM. Обнаруженные соединения могут использоваться в дальнейших исследованиях Центра медицинской химии.

Работа изложена на 173 страницах, содержит 34 рисунков, 11 таблиц, 6 схем, 7 формул и одно приложение.

Abstract

The title of the thesis is "Protein-protein interaction interface based on molecular glues".

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

The key issue of the thesis is the virtual screening of the combinatorial library of the connections of the Medical Center Chemistry and the search for new potential molecular glues.

The aim of the work is to carry out an *in silico* assessment of the collection of compounds of the Center for Medical Chemistry from the point of view of the possibility of the activity of the molecular glue IKZF1-CRBN.

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

Finally, we present a paper on compounds that may be new potential molecular glues.

In conclusion, we'd like to stress this work since the obtained compounds can be used in further research.

Содержание

Введение.....	7
1 Литературный обзор	9
1.1 Молекулярные клеи.....	9
1.2 Молекулярный докинг.....	24
1.3 Лиганды цереблona	37
2 Результаты и их обсуждение	47
2.1 Выбор и подготовка белковых комплексов CRBN-POI.....	47
2.2 Подготовка и аннотирование коллекции лигандов	58
2.3 Индуцированная стыковка и анализ ее результатов	59
3 Экспериментальная часть	91
3.1 Компьютерное моделирование.....	91
3.2 Биологические испытания.....	92
Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
Список используемых источников.....	95
Приложение А Результаты экспериментальных исследований.....	106

Определения, обозначения и сокращения

ОФ	оценочные функции
ABPP	профилирование белка на основе активности ферментов
AMPK	клеточная протеинкиназа, контролирующая энергетический баланс клетки
Cas9	управляемая РНК-гидом эндонуклеаза
Cbz	Бензилхлороформиат
CDI	Карбонилдиимидазол
CN	кальцеврин
CRBN	цереблон
CRISPR	локусы бактерий
CRL4	ингибитор обратного захвата дофамина
CsA	циклоспорин А
CUL	куллин
Cyp18	циклофилин 18
Cys	цистеин
DCAF15	гомолог 15 фактора ассоциации куллина и белка связывающего сайты повреждения дезоксирибонуклеиновой кислоты 1
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMF	<i>N,N</i> -диметилформаид
DOCK	программа стыковки
IKZF1	содержащий домен цинкового пальца белок Икарос связывающий дезоксирибонуклеиновую кислоту 1
IKZF3	содержащий домен цинкового пальца белок Айолоса
FF	оценочные функции основанные на силовом поле
FKBP	семейство белков, которые обладают активностью пролилизомеразы и связаны с циклофилинами по функции

FLAG	режима химиотерапии, используемого при лечении рецидивов или рефрактерного острого миелоидного лейкоза
HATU	(1- [Бис (диметиламино) метилен] -1 <i>H</i> -1,2, 3-триазоло [4,5- <i>b</i>] пиридиний 3-оксид гексафторфосфат
HTVS	разновидность скрининга, комплекс медицинских исследований
IMPDH2	фермент кодируемый геном IMPDH2
IRF4	фактор регуляции интерферона 4
LBDD	метод применяемый в случаях, когда неизвестна пространственная структура мишени
LC3	белок 1A/1B-легкой цепи, ассоциированный с микротрубочками
mHTT	мутантный белок Хантингтона
Myc	Myc-протоонкогенный белок
NFAT	семейство факторов транскрипции
OI-RD	микроскопия с разницей отражения в наклонном падении
P53	опухолевый белок p53
RMB 39	РНК-связывающий белок 39
SfA	санглифехрин А
SALL4	фактор транскрипции, кодируемый членом семейства Spalt-подобных генов
SfB	санглифехрин В
SBDD	метод, основанный на использовании данных о пространственной структуре мишени
SMM	анализ основанный на микрочипах малых молекул
TEA	триэтаноламин
THF	тетрагидрофуран

Введение

Физическая близость двух и более белков, необходимая и достаточная для возникновения белок-белковых взаимодействий (PPIs), имеет важную роль в точном временном контроле транскрипции, различных сигнальных каскадах, локализации и деградации белков, а также во многих других биохимических процессах [1]. Малые молекулы, способные индуцировать такое сближение макромолекул получили название молекулярные клеи (MG) [1].

Основная концепция MGs заключается в облегчении белок-белковых взаимодействий между двумя и более белками за счет образования комплекса между белком интереса (POI) и интерфейсом другого белка [2]. В настоящее время молекулярные клеи активно используются в качестве инструмента для направленной деградации белков [3]. Некоторые из них уже вступили в фазу клинических испытаний как противораковые агенты [3].

Убиквитин протеасомная система UPS используется для направленной деградации белков. Её суть состоит в том, что целевой субстрат подвергается процессу полиубиквितिрирования, который катализирует E3 лигаза, после чего меченый белок перемещается в протеасому для деградации. В данном контексте преимущество MG заключается в том, что они позволяют стимулировать взаимодействия лигаза-субстрат, тем самым расширяют область деградации, действия новых мишеней[4].

Стоит подчеркнуть, что параллельно концепции MG для направленной деградации белков так же используются PROTAC – гетеробифункциональные молекулы, которые способствуют возникновению близости между лигазным комплексом и белком интереса за счет наличия двух аффинных лигандов [5].

Актуальность темы исследования связана с существенным прогрессом в области рационального открытия молекулярных клеев и идентификации мишеней их воздействия [6]. Тем не менее, существующие исследования уже показали потенциальную ценность данной стратегии в лечении ряда заболеваний. Они подчеркивают необходимость дальнейшего исследования и развития данного подхода.

Цель работы: осуществление *in silico* оценку коллекции соединений Центра медицинской химии с точки зрения возможности проявления активности молекулярного клея IKZF1-CRBN.

Для достижения данной цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Отбор, подготовка тройных комплексов POI-MG-CRBN, анализ режимов связывания и белок-белковых взаимодействий;
2. Подготовка и аннотирование различных виртуальных библиотек лигандов CRBN из коллекции Центра медицинской химии;
3. Проведение индуцированного докинга подготовленных наборов в отобранные структуры; анализ его результатов;
4. Проведение оценки влияния отобранных соединений на жизнеспособность клеток MM и аффинности по отношению к E3-лигазе CRBN

1 Литературный обзор

1.1 Молекулярные клеи

Молекулярный клей представляет собой небольшую молекулу, которая способна индуцировать близость, точно контролировать различные биологические процессы, такие как передача сигнала, транскрипция, сворачивание, локализация и деградация белка. Молекулярные клеи способствуют димеризации двух белков посредством образования тройного комплекса, приводящего к разнообразным биологическим и фармакологическим функциям.

1.1.1 Использование убиквитин протеасомой системы для направленной деградации белков

Наравне с процессами синтеза, в клетках реализуется несколько механизмов расщепления белковых структур. Такие системы необходимы для уничтожения уже выполнивших свою функцию, неправильно собранных и мутантных белков, так как накопление таких структур может привести к развитию многих заболеваний, включая рак.

За селективную белковую деградацию в эукариотических клетках отвечает убиквитин протеасомная система (UPS). Процесс деструкции включает два основных этапа. На первой стадии происходит ковалентное связывание небольшого белка убиквитина с субстратом. Присоединение такого убиквитинового тега является сигналом для клетки, и на второй стадии происходит деградация белков, отмеченных Ub. Процессу убиквитинилирования предшествует активация Ub с помощью фермента E1, который связывает свободный Ub АТФ-зависимым образом. Далее активированный убиквитин присоединяется к конъюгирующему ферменту E2, который в свою очередь образует комплекс с убиквитин-лигазой E3, ответственной за распознавание субстрата. E3 катализирует

процесс переноса Ub на нужный белок. Эти три этапа повторяются несколько раз, что приводит к образованию полиубиквитиновых цепей (рисунок 1) [4]. В самом убиквитине содержится 76 аминокислот, семь из которых – остатки лизина, с помощью которых могут образовываться полиубиквитиновые цепи, которые связываются с белком для дальнейшей протеасомной деградации [7].

Полиубиквитинированный белок подвергается транслокации в коровую часть протеасомы 26S, где и начинается его деградация, причем перед ее началом за счет действия фермента убиквитин-изопептидазы убиквитин отщепляется от субстрата и может быть активирован повторно. Сама 26S протеасома является комплексом, состоящим из субъединиц 20S, выполняющей роль протеолитического ядра, и 19S, которая выполняет регуляторную функцию. 19S удаляет Ub, а также участвует в разворачивании субстрата для облегчения протеолиза. Протеасомная деградация является энергозатратным АТФ-зависимым процессом [8].

Стоит отметить, что распознавание белка для последующей деградации осуществляется либо за счет определенных изменений в структуре белка, либо по взаимодействию с деградом или какому-то отличительному повреждению [8].

В настоящее время UPS используют для направленной деградации белков. Для этого применяют концептуально две стратегии - PROTAC и молекулярные клеи. Их преимущество заключается в том, что они позволяют стимулировать неродственные взаимодействия лигаза-субстрат, тем самым расширяя область деградации, действия новых мишеней и потенциальных лекарственных средств.

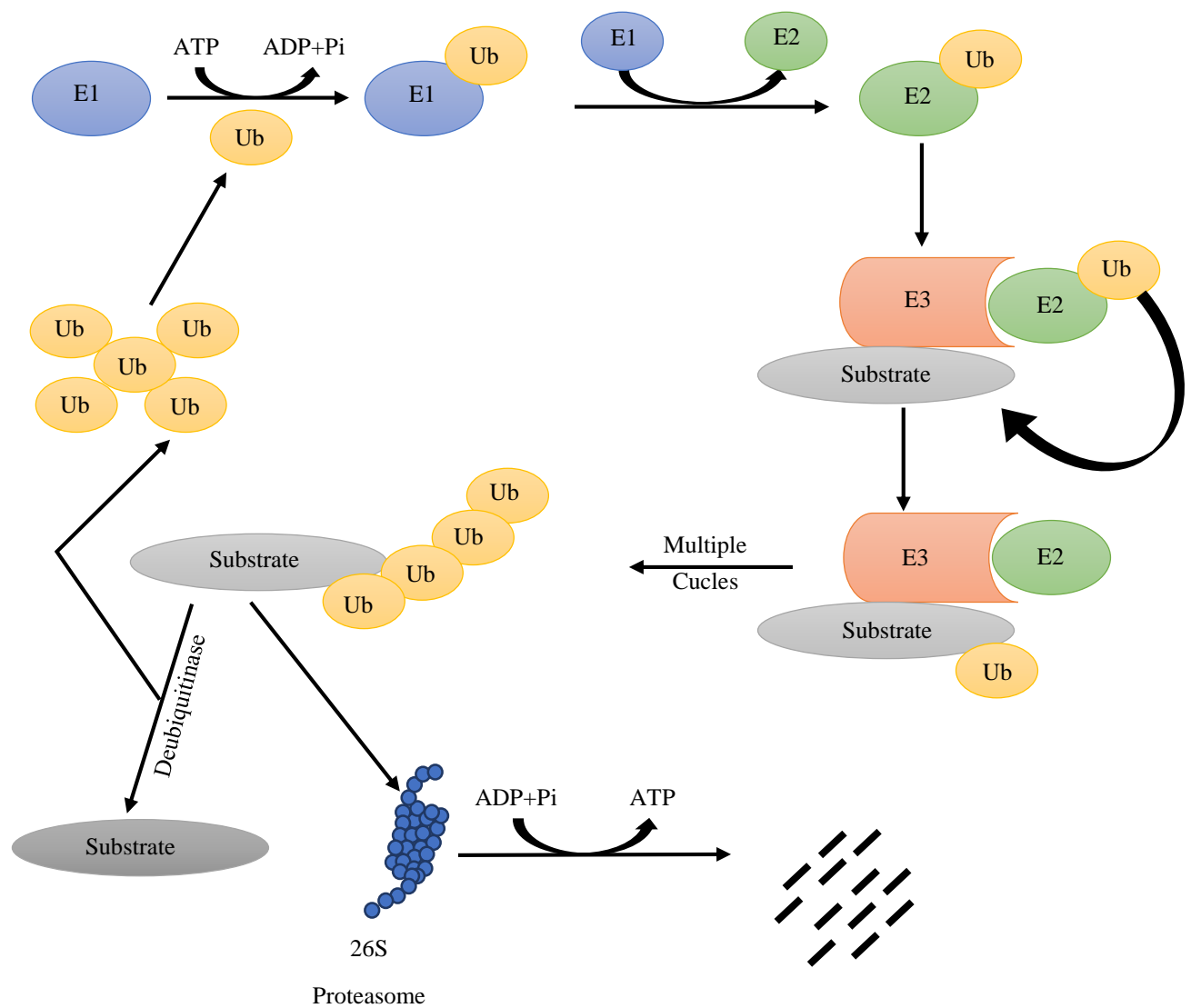


Рисунок 1 – Убиквитин-зависимый путь протеасомной деградации

1.1.2 История открытия молекулярных клеев

Как было сказано выше, молекулярные клеи способны индуцировать взаимодействие между двумя и более белками. Механизм действия молекулярных клеев заключается в связывании одного белка, в контексте теории молекулярных клеев называемого белком интереса (POI), и облегчении возникновения белок-белковых взаимодействий (PPIs) с интерфейсом другого белка [2].

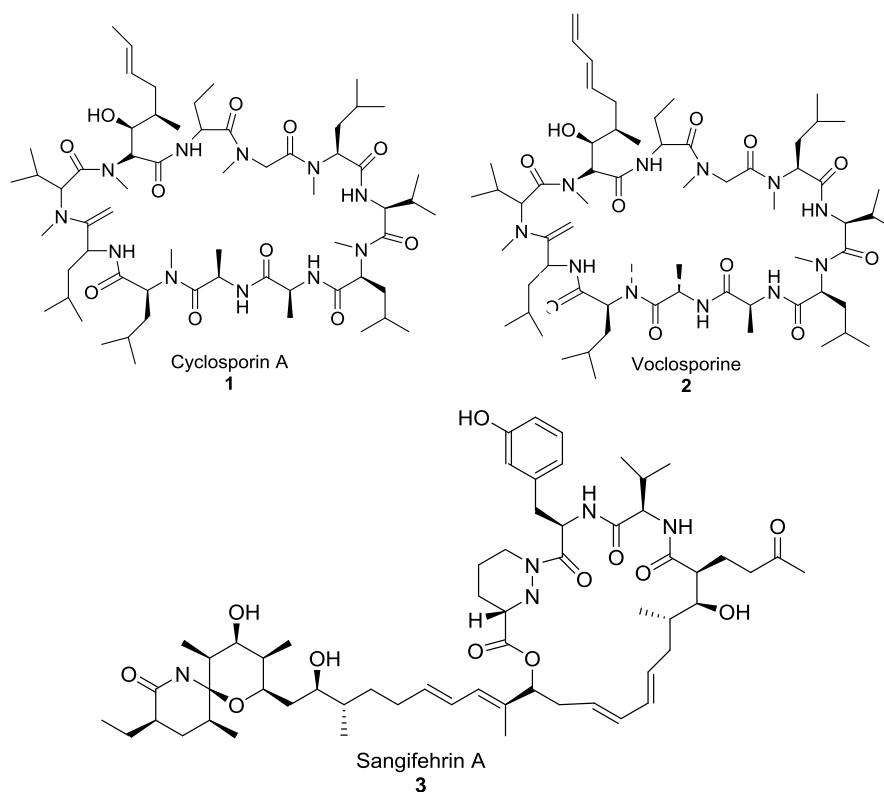
Первыми открытыми молекулярными клеями являются натуральные иммунодепрессанты макролидного строения циклоспорин А (CsA) и FK506. Они позволяют аллостерически блокировать фосфатазу В и атипичную киназу mTORC1 [9].

Циклоспорин А был впервые обнаружен благодаря скринингу антибиотиков. В 1984 году был найден цитозольный белок циклофилин 18 (Cyp 18), который являлся мишенью для CsA [10]. Открытие Cyp 18 показало, что не только CsA, но и комплекс Cyp18/CsA может связываться с кальций/кальмодулиннезависимой серин-треониновой протеинфосфатазой кальциневрин (CN), тем самым образуя тройной комплекс и блокировать иммуносупрессорную функцию кальциневрина [11]. Также обнаружили, что комплекс Cyp18/CsA может ограничивать доступ к белковым субстратам один из которых является NFAT. В свою очередь это приводило к снижению цитокинов IL-2, что способствовало уменьшению функций Т-клеток. Данная способность циклоспорина позволила использовать его как перорально доступный препарат в постоперационный период после трансплантации органов [12]. Недавно был обнаружен его модифицированный аналог Воклоспорин, который способствовал более сильному ингибированию CN и продемонстрировал лучшей метаболическую способность.

Интересным открытием стал, скрининг микробных экстрактов, которые могли бы заблокировать взаимодействие комплекса циклоспорина и циклофилина с циклоневрином. Позже были выделены такие соединения как Санглифехрин А (SfA) и Санглифехрин В (SfB) [13]. Санглифехрин А мог связываться с сайтом связывания CsA в Cyp18, образуя комплекс SfA-Cyp18, который мог блокировать пролиферацию Т-клеток не ингибируя CN, тем самым увеличивая экспрессию генов подавляющих p53 и p21.

Во время исследования также установили, что инозин-5-монофосфатдегидрогеназа 2 (IMPDH2) является клееподобным партнером по связыванию для комплекса SfA-Cyp18 [14]. Из двух синтезированных

соединений только SfA могло связываться с Cyp. Это указывало на то, что спиролактаманная часть SfA, которая отсутствовала у SfB является важной частью для связывания с IMPDH2 [15]. На рисунке 2 представлены структуры Циклоспорина А **1**, Воклоспорина **2** и Санглифехрина А **3**



1 – Циклоспорин А: 2– Воклоспорин: 3 – Санглифехрин А

Рисунок 2 – Структуры первых молекулярных клеев

Если говорить о FK506, он так же как и циклоспорин А используется в качестве перорального препарата против отторжения органов, и обладает иммуносупрессорным действием. Партнером по связыванию для FK506 и его аналога FK520 является FKBP12 [16]. Комплекс FKBP12-FK506 так же как и комплекс Cyp18/CsA ингибирует активность кальциневрина, ограничивая доступ для субстратов фосфатазы. Структура FK506 представлена на (рисунке 3).

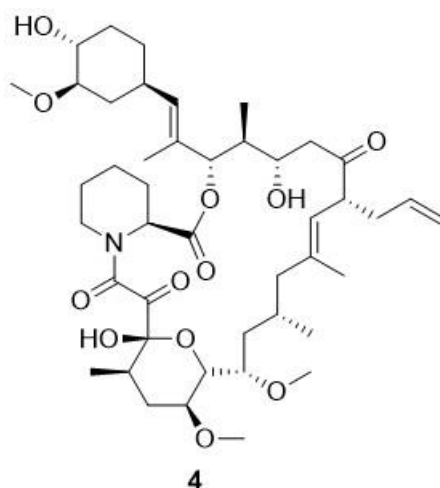


Рисунок 3 – Структура FK506 4

С обнаружения механизма действия молекулярных агентов началась активная разработка концепции молекулярных клеев для изменения течения многих биологических процессов [9].

1.1.3 Сравнение механизма действия PROTAC и молекулярных клеев

Молекулярные клеи и PROTAC как уже было отмечено ранее, используются для рекрутирования E3-лигазы и последующей деградации. Однако между такими на первый взгляд схожими стратегиями имеются довольно большие отличия, которые будут обсуждаться в данном разделе. Молекулярные клеи являются очень перспективными, но трудно поддаются поиску, так как предугадать мишень для них является непростой задачей.

Ранее было упомянуто что для направленной деградации белков так же используются PROTACs – химерные молекулы, которые способны индуцировать взаимодействие E3-лигазы и белка интереса с последующим протеолизом. Стоит отметить, что PROTACs и молекулярные клеи имеют сильные различия в строении и механизме действия, что приведено на рисунке 4 [17]. Основные различия между молекулярными клеями и PROTAC были обобщены в таблицу 1 в научной статье, посвященной

молекулярным клеям для целенаправленной деградации белков (таблица 1) [5].

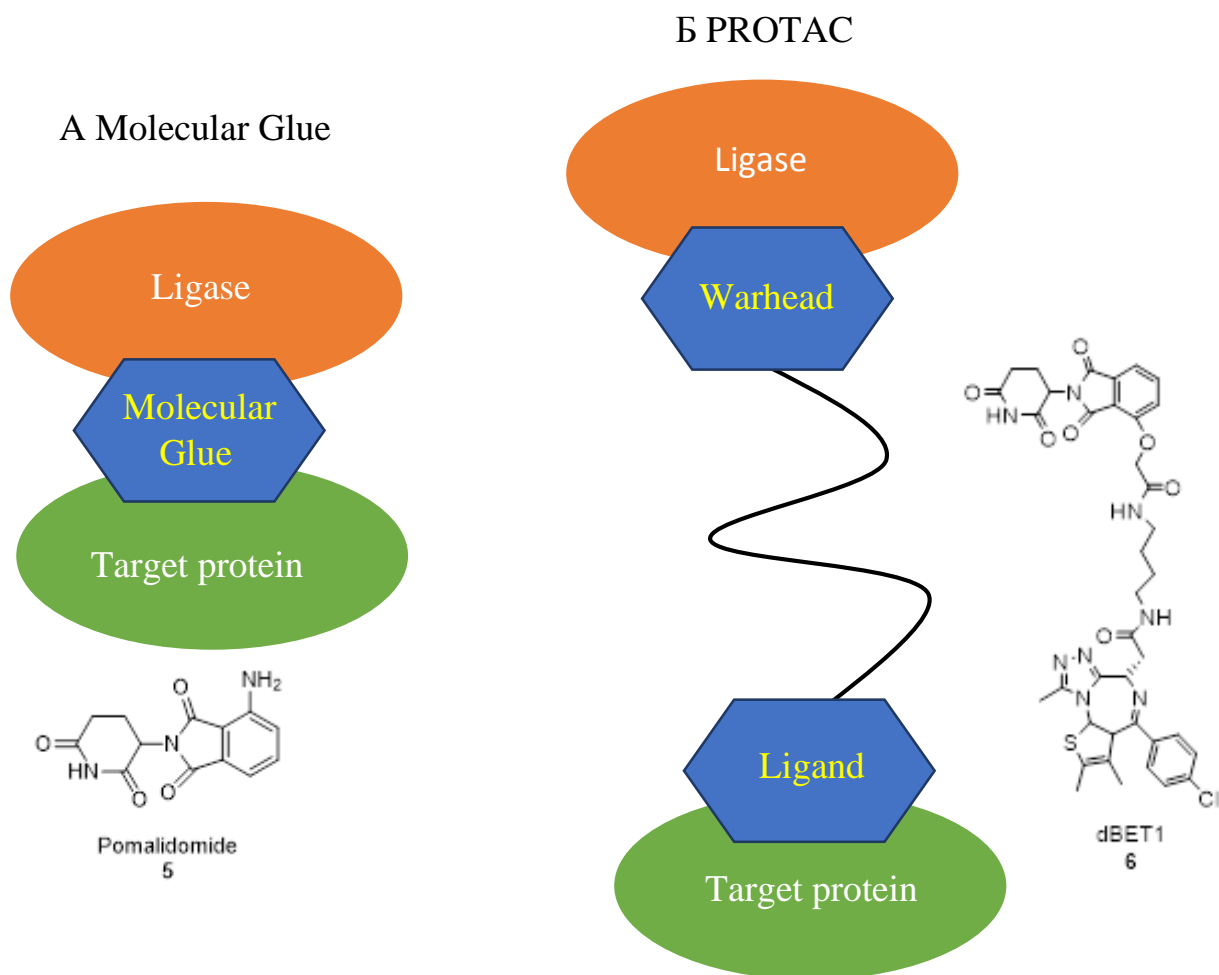


Рисунок 4 – Сравнение структуры PROTAC и молекулярных клеев

Таблица 1– Сравнение молекулярного клея и PROTAC

Характеристики	Молекулярные клеи	PROTAC
механизм действия	связывает E3 или POI, индуцируя PPI	связывает E3 и POI с помощью двух боеголовок
POI	непредсказуемы	предсказуемы
подход к дизайну	случайное открытие, реже рациональный дизайн	рациональный дизайн
характерная особенность	моновалентный агент	бивалентный агент
линкер	отсутствует	присутствует
молекулярная масса	маленькая	большая
правило пяти	соответствует	не соответствует
сайт связывания POI	не обязателен	обязателен

PROTAC состоят из двух фрагментов объединенные общим линкером. Одна из боеголовок является лигандом для POI, а другая для убиквитинлигазы E3. Механизм действия PROTAC заключается в том, что фрагмент E3-лигазы связывается с аффинным карманом на убиквитинлигазе, параллельно этому образуются взаимодействие белка мишени с его специфичным мотивом, вследствие чего возникают прочные PPI взаимодействие между POI и E3, с последующим убиквитинилированием (рисунок 5) [18].

Для деградации с участием химерной молекулы очень важно, чтобы комплекс образованный между E3 лигазой и интересующим белком POI оставался стабильным. Для этого необходимо максимальное сродство PROTAC к этим двум составляющим, чего нельзя сказать про комплекс образованный с участием молекулярного клея. Если сравнивать PROTAC и молекулярные клеи, то в этом случае они сильно разнятся, так как второй имеет сродство лишь к одному из двух звеньев тройного комплекса [19]. В основе прогнозирования молекулы PROTAC лежит рациональный дизайн, включающий нахождение точек связывания лигандов с линкером, а также их сродство с белком интереса и E3 лигазой [20].

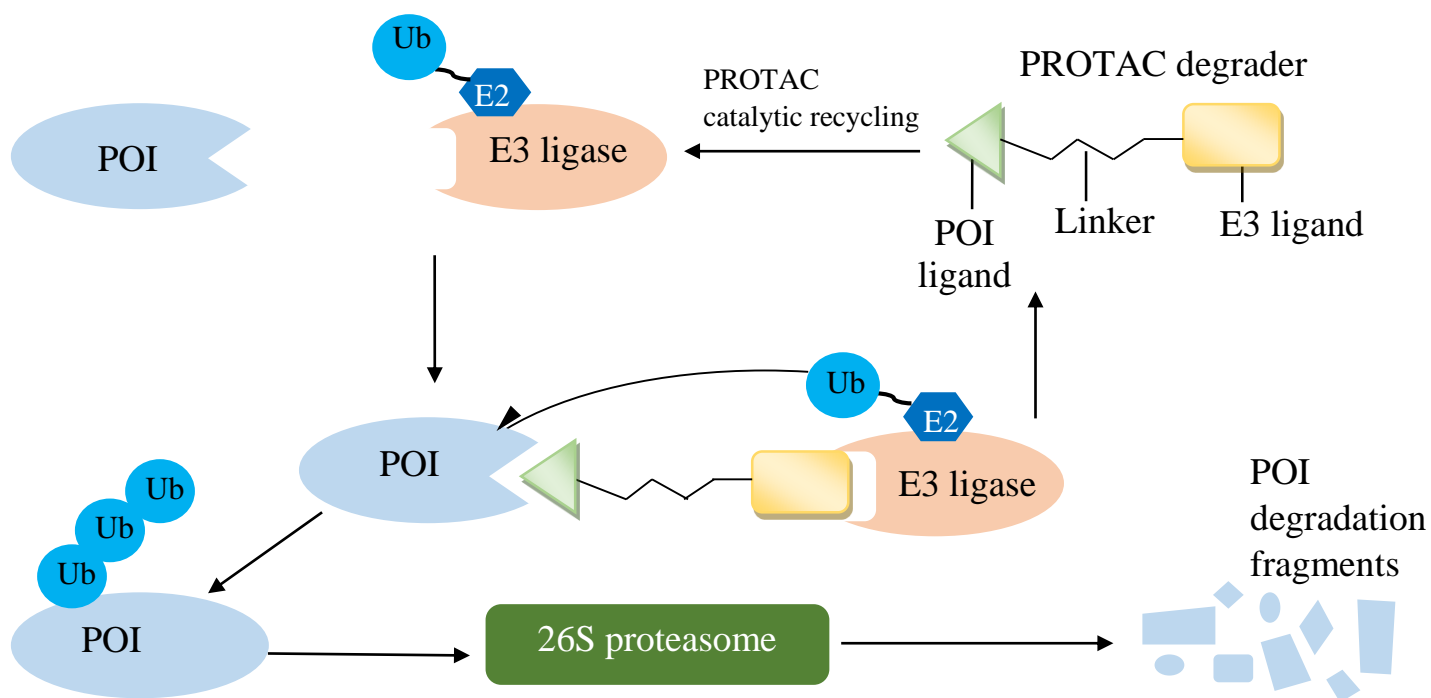


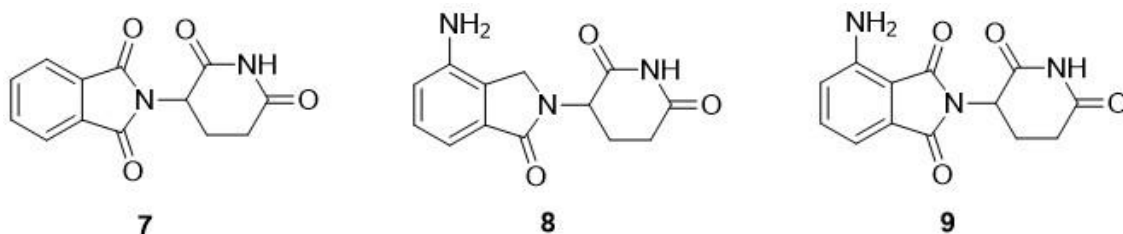
Рисунок 5 – Механизм действия PROTAC

При разработке PROTAC, мишень известна уже на ранних стадиях, что не свойственно молекулярным клеям. Предугадать заранее POI для очень трудно, как уже говорилось ранее, большинство из MG были открыты совершенно случайно

Если сравнивать различия между PROTACs и молекулярным клеем то, хотелось бы отметить, что первые обладают довольно большой молекулярной массой, из этого следует, что они не подчиняются правилу Липински. Также они имеют некоторые проблемы с биодоступностью из-за чего возникают ограничения при пероральном приеме, чего нельзя сказать про MG, который не имеет подобных минусов, что дает ему немалое преимущество по сравнению с PROTAC [19].

1.1.4 Подходы к дизайну и открытию молекулярных клеев

История открытия молекулярных клеев, опосредующих направленную деградацию за счет связывания с цереблосом берет свое начало в 50-х годах прошлого века, когда на рынок попал такой печально известный препарат, как талидомид **7**. Первоначально он позиционировался в качестве противорвотного средства для беременных женщин, однако позже была обнаружена чрезвычайная токсичность для плода, что привело к отзыву препарата [21, 22]. Однако изучение талидомида в контексте перспективного препарата продолжалось, и случайно было выяснено, что его применение может являться мощной стратегией для борьбы с лепрозной эритемой и множественной миеломой (ММ) [23]. В попытках уменьшить тератогенные свойства и увеличить анти-миелоидный эффект, были синтезированы его аналоги – помалидомид **8** [24] и леналидомид **9** [25], структуры которых приведены на рисунке 6. Однако механизм их действия оставался неясным. Из-за способности регулировать иммунный ответ данная группа веществ получило название iMiDs (иммунномодулирующие имидные препараты). Только в 2010 году научное сообщество идентифицировало CRBN как прямую мишень для талидомида [26]. В это же время был объяснен механизм анти-ММ действия талидомида и аналогов [27].



7 – Талидомид; 8 – Помалидомид; 9 – Леналидомид

Рисунок 6 – Структуры iMiDs

Случайным образом было обнаружено, что молекулярные клеи на основе талидомида способствуют взаимодействию комплекса CRL4-CRBN с факторами транскрипции Ikaros и Aiolos, которые кодируются генами IKZF1 и IKZF3, в области связывания иммуномодуляторов [28]. IKZF1 и IKZF3 являются ядерными факторами транскрипции и регулируют экспрессию многих генов, в том числе ответственных за дифференцировку и развитие Т-клеток [29]. Кроме того Ikaros и Aiolos контролируют транскрипцию IRF4 и белков семейства Мус, которые отвечают за уход клетки от апоптоза. Нарушения в работе данных ферментов ведет к развитию множественной миеломы [30]. Таким образом, IMiD-CRBN-опосредуемая деградация IKZF1 и IKZF3 является мощной терапевтической стратегией против данного заболевания [31].

На рисунке ниже приведены кристаллические структуры комплекса CRBN-помалидомид домен ZF2-IKZF1, ответственный за связывание с церебллоном (рисунок 7) [32].

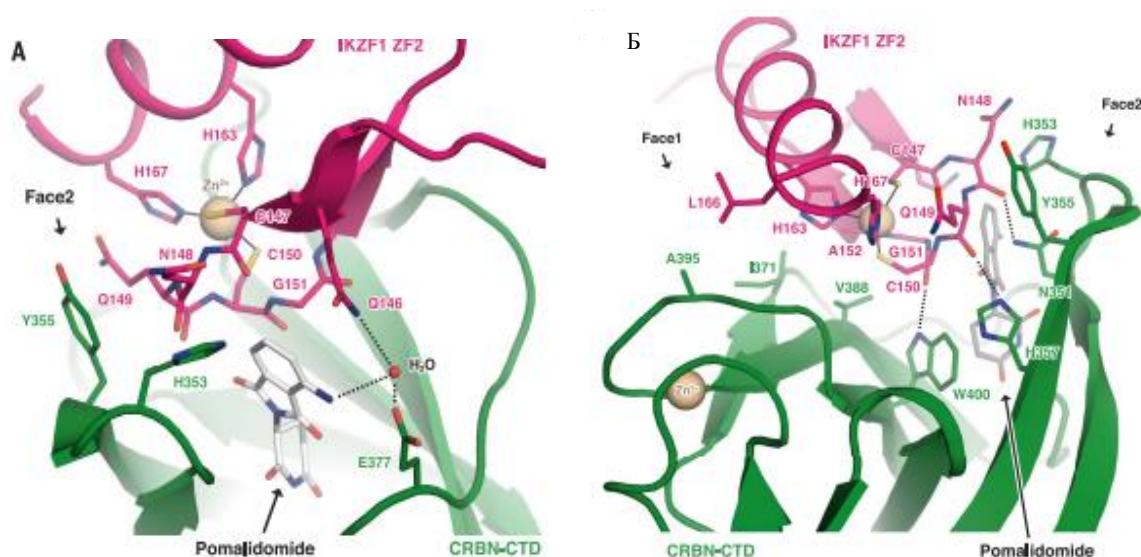


Рисунок 7 – Взаимодействие ZF2-IKZF1-CRBN. А – взаимодействие помалидомида с боковой цепью ZF2; Б – PPI между ZF2 и CRBN (PDB ID: 6H0F)

Поскольку большинство молекулярных клеев идентифицируют случайно, важно найти алгоритмы их систематического открытия и рационального дизайна. Некоторые такие подходы будут обсуждаться в данном разделе [33].

Один из подходов к открытию новых молекулярных клеев был продемонстрирован в статье посвящённой структурной основе и кинетическому пути рекрутирования RBM39 в DCAF15 с помощью арилсульфамидного молекулярного клея E782075 [34].

В своей работе в ходе фенотипического скрининга авторы обнаружили, что индисулам **10** (E782075), который принадлежит к классу арилсульфамидов, имел антипролиферативное действие против клеток лимфоидного рака. Молекулярный механизм, объясняющий сильный противоопухолевый эффект, данного соединения долгое время оставался неясным [17]. Относительно недавно было выяснено, что индисулам способен вызывать инактивацию РНК-связывающего белка 39 (RBM39). В экспериментах с очищенными рекомбинантными белками было обнаружено, что индисулам образует тройной комплекс с RBM39 и рецептором убиквитинлигазы E3 DCAF15, что в свою очередь приводило к летальному эффекту для опухолевых клеток [35]. Так же были идентифицированы еще несколько арилсульфонамидов, обладающих противоопухолевой активностью такие как LY573636 (тасисулам) **11** [36] и E7872 **12** [37]. Структуры индисулама и его аналогов продемонстрированы на рисунке 8.

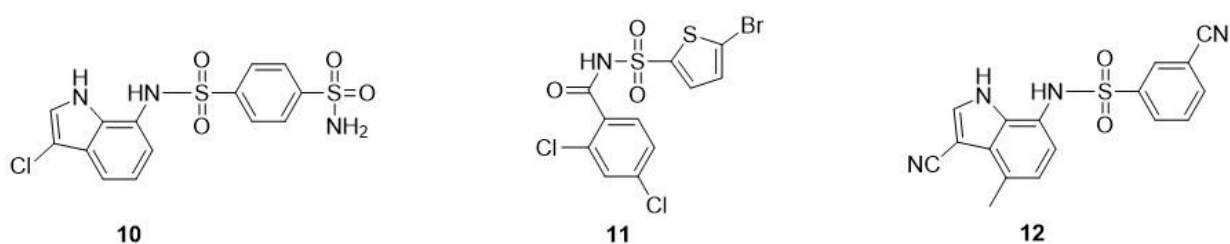


Рисунок 8 – Структура индисулама **10** , LY573636 **11** и E7872 **12**

Для своего исследования авторы использовали технологию CRISPR / Cas9, благодаря которой была проведена замена нескольких аминокислот в ядерном белке, и было выявлено, что индисулам может действовать как молекулярный клей [35].

Суть данного метода заключалась в том, что белок Cas9 ведет себя подобно молекулярным ножницам и способен разделить нити ДНК в конкретном месте. После специально разработанный фрагмент CRISPR встраивается в место разрыва, являясь комплементарной частью цепи. Далее клетка начинает восстанавливать полученное повреждение, образуя ген с нужной мутацией [38]. Мутации RBM39 не дали ему связываться с индисуламом, в следствие чего не могло произойти связывание с убиквитинлигазным комплексом CUL4-DCAF15 и это позволило белку избежать протеасомной деградации. Также было обнаружено, что аминокислотная замена в RBM39 придает ему иммунитет от токсического влияния **10** в культивируемых раковых клетках. И в присутствии индисулама, RBM39 подвергается полиубиквитинированию и может уйти в протеасомную деградацию [38].

Ещё один уникальный подход к разработке молекулярных клеев был продемонстрирован в статье, посвященной снижению мутантного белка mHTT вызывающего болезнь Хантингтона [39].

При работе авторами было выявлено, что малые молекулы способны связываться как с компонентом аутофагосом LC3, так и с mHTT и это будет способствовать деградации второго за счет аутофагии [39]. В своей работе авторы использовали анализ, основанный на микрочипах малых молекул (SMM), а также (OI-RD) микроскопию, которая позволяет за короткое время и без маркирования белков определить связывание малых молекул с ROI [35].

SMM довольно простой метод, который получил широкое применение в области анализа объемных библиотек соединений направленных на связывание с белками. Подход заключается в фиксации соединений на

стеклянной пластине, содержащей очищенную мишень. Кратковременная инкубация и последующая промывка позволяет обнаружить соединения, способные связываться с интересующим белком [40]. Исследуемые соединения закреплялись на функционализированных изоцианатом пластинах, далее пластины обрабатывались очищенными LC3, НТТ дикого типа для контроля и мутированным НТТ. На рисунке 9 представлена полная схема метода [41].

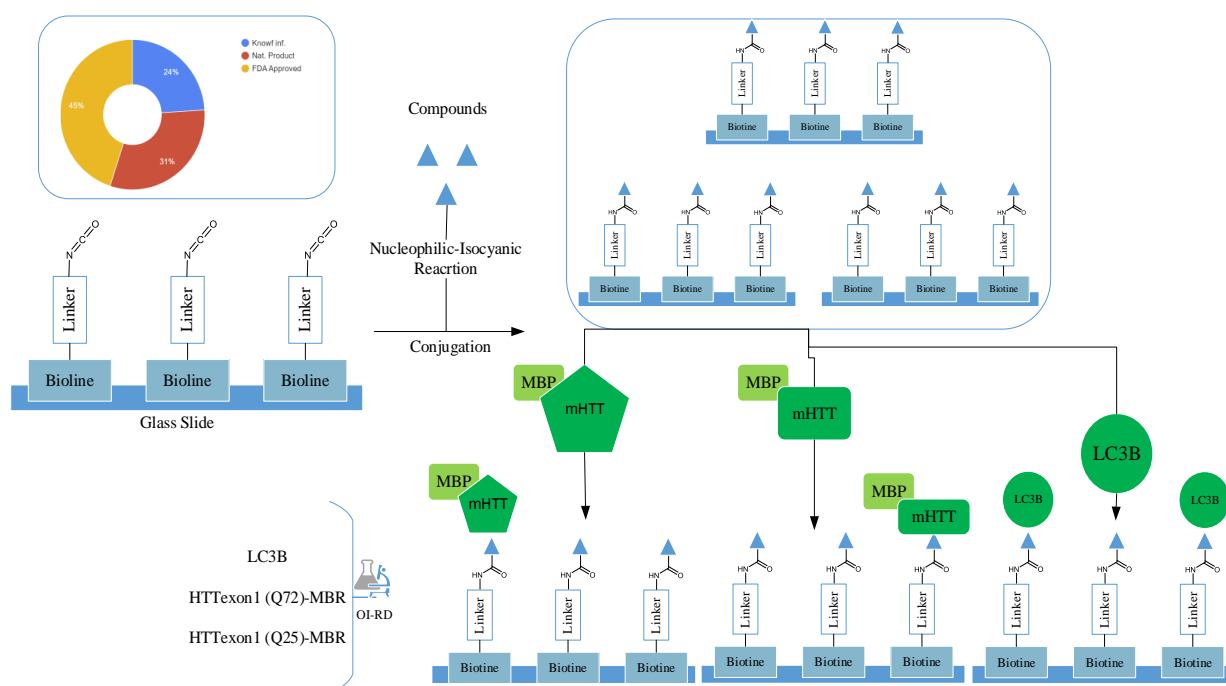


Рисунок 9 – SMM исследование на изоцианатных слайдах с использованием OI-RD микроскопии

Другой стратегией к открытию рационального дизайна молекулярных клеев продемонстрирована в работе, посвященной модуляции активности онкосупрессора p53 [42].

Основная идея заключалась в анализе библиотеки соединений, обладающих несколькими реакционными центрами, способными ковалентно связываться с белками. Особое внимание было выделено

аналогам поликетидам манумицина, которые обладали антипролиферативными свойствами [43].

Распознавание мишеней ковалентного связывания осуществлялось с помощью метода профилирования на основе реактивности АВРР. Его суть заключается в обработке клеток действующим веществом, их разделением, и последующим действием конкурентного цистеинреактивного зонда на основе йодацетамида. Далее после анализа LC-MS/MS были определены реактивные по отношению к Cys белка соединения [44].

В результате проделанной работы был определен активный Cys лигазы UBR7, с которым успешно мог связываться асукамицин, являющийся также одним из аналогов поликетидов манумицина. При помощи профилирования различных клеточных линий на основе анализа FLAG был выделен партнер по связыванию комплекса UBR7-асукамицин [42]. Структура тройного комплекса представлена на рисунке 10.

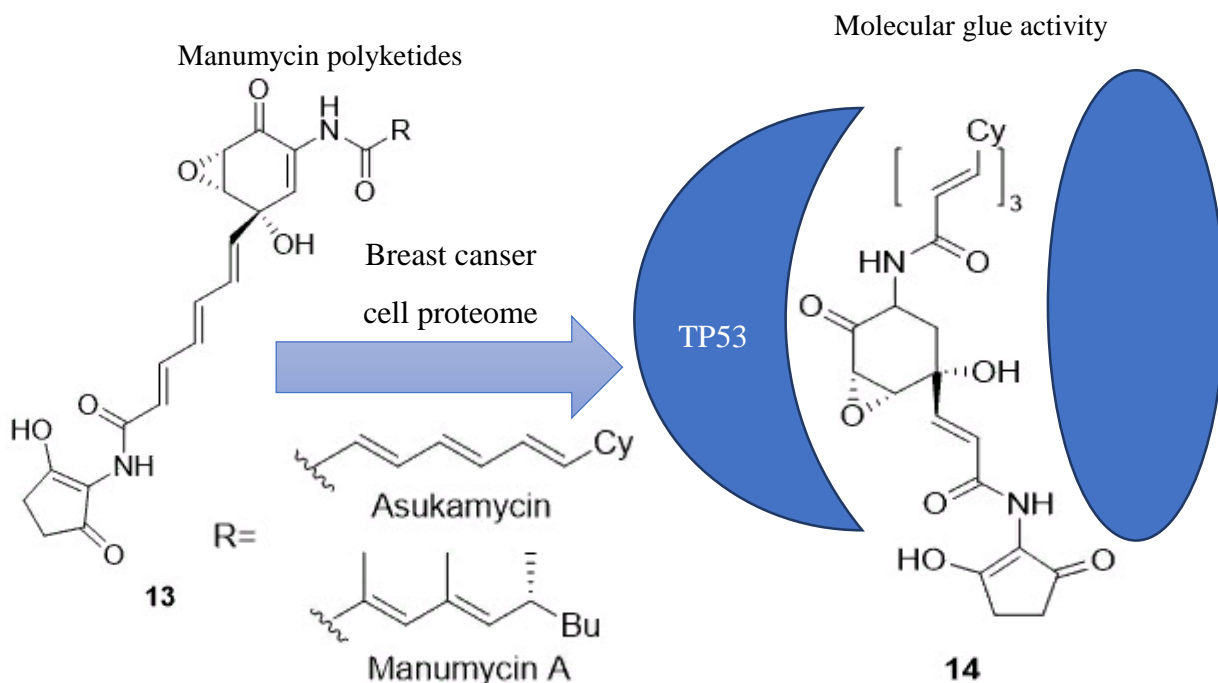


Рисунок 10 – Строение комплекса UBR7-асукамицин-TP53

Разработка рационального дизайна и открытие молекулярных клеев все еще остается актуальной проблемой нашего времени, из-за высокой специфичности действия.

1.2 Молекулярный докинг

Молекулярный докинг – это *in silico* метод молекулярного моделирования, позволяющий предсказать наиболее энергетически выгодную конформацию лиганда в сайте связывания белка. Процесс стыковки можно условно разделить на две стадии – это конформационный поиск, т. е. генерация возможных геометрий лиганда в пространстве сайта, и оценка энергии каждой из них для дальнейшего отбора лучшей с помощью оценочной функции [45]. Так же в молекулярной стыковке часто используют метод автоматизированной дизайна лекарств CADD [46], который позволяет проводить оптимизацию взаимосвязи структура-активность [47]. Методы CADD могут быть классифицированы как основанные на лигандах Ligand-based CADD (LBDD), так и основанные на структуре Receptor-based CADD (SBDD) [48].

LBDD основывается на изучении лигандов взаимодействующих с мишенью, этот метод включает в себя поиск моделирования количественной связи структура-активность (QSAR) и виртуальный скрининг на основе лигандов (LBVS) [49].

SBDD в свою очередь основан на знании структуры мишени и включает в себя *in silico* подходы такие как: виртуальный скрининг на основе структуры (SBVS) и молекулярную динамику [49].

Несмотря на неоценимый вклад в процесс разработки лекарств, молекулярная стыковка все еще далека от совершенства. В этом разделе будут представлены основные аспекты методологии молекулярного докинга.

1.2.1 Виды молекулярного докинга

В молекулярном докинге имеется ряд особенностей, которые дают возможность разделить его на несколько видов. В первую очередь нужно обратить внимание на типы взаимодействующих соединений, которые участвуют в процессе стыковки, так как это оказывает большое влияние на выбор алгоритма моделирования. Основываясь на типе взаимодействующих соединений можно выделить два вида: белок-белковый [50] и лиганд-белковый [51] молекулярный докинг.

Белок-белковый докинг дает возможность смоделировать взаимодействие нескольких белков. Данный метод подразумевает использование довольно серьезных допущений, например, пренебрежение динамической подвижностью белков, что делает некоторые результаты (полученные позы стыковки) далекими от реальности. В данном подходе отсутствуют многочисленные подходы к оптимизации, но большое внимание уделяется комплементарности структур, от которой зависит успех всего моделирования [50]. Стоит отметить, что белок-белковый докинг является важным этапом в процессе дизайна молекулярных клеев, поскольку позволяет предсказать наиболее выгодный режим связывания E3 лигазы и POI [50].

В свою очередь, лиганд-белковый докинг, как уже упоминалось ранее, дает представления о пространственном взаимодействии малых молекул в связывающих белковых карманах с учетом ковалентных или нековалентных взаимодействий [51].

Большой вклад в достоверность результатов докинга вносят допущения, основанные на подвижности лигандов и белков в момент связывания. В 1894 году Фишер предположил одно из таких ограничений, которое гласит, что специфичность фермента по отношению к его субстрату основана на том, что два компонента имеют комплементарные формы, которые идеально подходят, как «ключ в замке» (рисунок 11) [52]. В наше время подход «ключ-замок» уже не является актуальным. На смену ему

пришла концепция, в которой говорится, что при взаимодействии субстрата с ферментом последний может претерпевать конформационные изменения для достижения «индуцированного» соответствия [53].

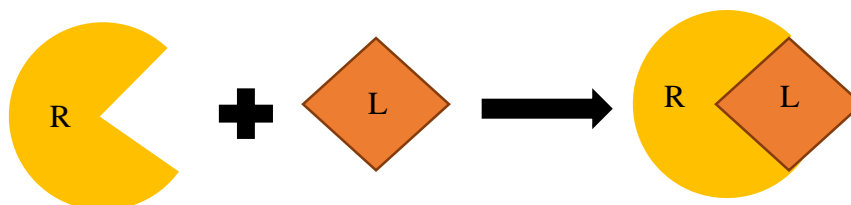


Рисунок 11 – Модель стыковки ключ-замок

С учетом «подвижности» компонентов при стыковке выделяют два вида докинга, подразумевающие использования нескольких различных подходов и вычислительных алгоритмов:

1. Жесткий докинг – данный подход подразумевает, что конформация взаимодействующих соединений будет оставаться неизменной на протяжении всего процесса докинга. Свое широкое применение жесткий докинг нашел в изучении белок-белковых комплексов [54]. Данный вид докинга требует меньших затрат и подходит для грубой оценки.

2. Гибкий докинг – учитывает не только все возможные изменения конформации лиганда в активном сайте рецептора, но и подвижность самого рецептора. Этот подход к стыковке является наиболее актуальным, но имеет ряд минусов. Так как из-за учета подвижности белка усложняются и увеличиваются вычислительные затраты на исследования молекулярной стыковки [55].

3. Можно выделить еще один вид докинга с индуцированной стыковкой Inducted-fit docking (IFD). Это вид молекулярного докинга учитывает энергию взаимодействия лиганд-рецептор, энергии деформации и сольватации, а также конформационную подвижность боковых цепей

аминокислотных остатков, что в конечном итоге отражает индуцированное соответствие структуры и конформации лиганда [56].

Наиболее востребованным в настоящее время является гибкий лиганд-белковый докинг, учитывающий все возможные подвижности как самого лиганда, так и мишени, способен обрабатывать крупную базу химических соединений. Данный вид докинга показывает результаты подбора нужных соединений с высокой скоростью и точностью, что вносит неотъемлемый вклад в разработку лекарственных препаратов.

1.2.3 Общие принципы и методология лиганд-белкового докинга

Компьютерное моделирование белок-лигандных взаимодействий имеет большое применение для механистического исследования процессов связывания, а также для разработки терапевтических вмешательств. В зависимости от точности расчета, молекулярный докинг может быть использован как для начального высокопроизводительного виртуального скрининга (HTVS) объемных библиотек, так и для более детальной стыковки. [57].

Началом для проведения молекулярного докинга служит получение целевой структуры белка. Для поиска данных структур используется база данных (PDB-protein data bank). Данная система облегчает поиск, предоставляя информацию о трёхмерных молекулах, полученных экспериментальным путем [58].

Следующим шагом является поиск сайта связывания между лигандом и рецептором. Для поиска данных сайтов связывания можно использовать специализированные программные обеспечения. Одним из которых является программа MolDock – она использует алгоритм обнаружения полостей для определения, потенциальных сайтов связывания [59].

В свою очередь для поиска структуры лиганда используется база данных PubChem [60]. При поиске необходимого лиганда важно учесть его подвижность, протонированность и распределение зарядов [61].

Завершающими этапами докинга являются проведение необходимого алгоритма поиска сайта связывания и применение оценочных функций, которые помогут проанализировать и определить место связывания лиганда и белка, с учетом степеней свободы [62].

1.2.4 Оценочные функции

Оценочные, или иначе говоря, скоринговые функции (ОФ) являются важнейшим инструментом, без которого осуществление молекулярного докинга было бы невозможно. В общем случае, ОФ представляет собой математическое выражение, позволяющее оценить энергию связывания лиганда в той или иной конформации с белковой мишенью. Каждый тип взаимодействия между лигандом и белком представляется определенным энергетическим термом, выраженном в численном виде, сумма которых и позволяет наделить ту или иную конформацию лиганда в активном сайте энергетическим статусом для дальнейшего ранжирования.

Выделяют три типа ОФ: основанные на силовых полях, эмпирические и основанные на знаниях [63,64].

ОФ основанные на силовом поле (FF) – оценивают энергию взаимодействия между рецептором и лигандом, включая электростатические взаимодействия и силы растяжения/изгиба/кручения связи. Силовое поле – это концепция, типичная для молекулярной механики, которая объединяет потенциальную энергию системы с комбинацией связанных (внутримолекулярных) и несвязанных (межмолекулярных) компонентов. В молекулярном докинге чаще учитывают несвязанные компоненты, с возможным добавлением связанных лигандов. Межмолекулярные компоненты включают как Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, описываемые потенциальной функцией Леннарда-Джонса, так и электростатический потенциал, описываемый законом Кулона [65]. Функции и параметры силового поля получают как из экспериментальных данных, так и из квантово-механических расчетов. Такой тип скоринга реализован в стыковочном алгоритме DOCK [66]. Так

как лиганды в основном не связываются ковалентно с рецептором, ОФ основанные на молекулярно-механических силовых полях характеризуют лишь электростатические и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Одним из минусов такой оценки считается то, что в ней учитывается только энтальпийная часть энергии взаимодействия, но никак не затрагивается эффект десольватации и изменение энтропии, которые участвуют в связывании лиганда с рецептором [64].

$$E = \sum_i \sum_j \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} \right), \quad (1)$$

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

A_{ij} и B_{ij} – коэффициенты отталкивания и притяжения между атомами;

q_i и q_j - атомные заряды;

ε - диэлектрическая проницаемость.

На фоне такого нюанса эмпирические оценочные функции обладают преимуществом. Они имеют компоненты, которые способны описать межмолекулярные взаимодействия наиболее простым способом. Парные межмолекулярные физические взаимодействия в данном случае отсутствуют. При данной ОФ используют (уравнение 2), которое описывает межмолекулярные взаимодействия различных типов контактов [67].

$$\Delta G_{bind} = C_0 + C_{lip} \sum L(r_{lr}) + C_{hb} \sum H(r_{AD}, \alpha_{ADH}) + C_{met} \sum M(r_{lr}) + C_{rot} N_{rot} \quad (2)$$

где C_{lip} гидрофобные взаимодействия;

$L(r_{lr})$ – гидрофобные контакты;

C_{hb} – водородные связи;

r_{AD} – расстояние между донором и акцептором;

r_{lr} – расстояние между атомами;
 α_{ADH} – угол между донором и акцептором и атомом водорода;
 C_{met} – взаимодействия с ионами металлов;
 $M(r_{lr})$ – координационные связи с ионами металлов;
 C_{rot} – изменение энтропии;
 N_{rot} – число торсионных углов.

Точность эмпирических оценочных функций сильно зависит от характера межмолекулярных взаимодействий молекулы лиганд-белок. Так как оценочная функция, используемая для изучения комплексов, в которых доминируют полярные взаимодействия, способна выдавать ложные результаты в изучении комплексов, в которых доминируют гидрофобные взаимодействия [57]. Благодаря включению различных эмпирических терминов энергии эмпирические функции оценки использовались во многих хорошо известных программах стыковки белков и лигандов, таких как FlexX [68] и Surfex [69].

Основанные на знаниях оценочные функции опираются на то, что кривые радиального распределения атомов из структур комплексов лиганд-рецептор, полученные экспериментальным путем, преобразовываются в статистический потенциал, который больше предназначен для определения положения лиганда в активном сайте, чем для оценки свободной энергии связывания [70].

$$W(r) = -k_B T \ln[g(r)], g(r) = p(r)/p^*(r) \quad (3)$$

где k_B постоянная Больцмана;

T - абсолютная температура системы;

$g(r)$ – функции распределения пары атомов белка и лиганда;

$p(r)$ – числовая плотность пары атомов белок-лиганд на расстоянии r ;

$p^*(r)$ – плотность пар в эталонном состоянии, когда межатомные взаимодействия равны нулю.

По сравнению с функциями, основанными на силовом поле и эмпирическими функциями оценки, статистические ОФ, предлагают хороший баланс между точностью и скоростью. Поскольку потенциалы в (уравнении 3) извлекаются из структур, а не из попыток воспроизвести известные сходства путем подгонки. Если учитывать то, что структурная база данных может быть большой и разнообразной то, данные оценочные функции остаются относительно надежными. Их парная характеристика также позволяет процессу оценки быть таким же быстрым, как и эмпирические функции оценки [71]

К оценочным функциям так же относятся оценочные функции программного обеспечения Glide. Функция Glide была разработана для выполнения максимально близкого поиска позиционно, ориентационного и конформационного пространства, доступного для лиганда [72]. Отправной точкой для подсчета очков является эмпирически функция ChemScore, которая описывается в (уравнение 4) [73]:

$$\Delta G_{bind} = C_0 + C_{lipo} \sum f(r_{lr}) + C_{hbond} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{metal} \sum f(r_{lm}) + C_{rotb} H_{rotb} , \quad (4)$$

где f , g и h считаются функциями, дающими полную оценку расстояния или углов, которые находятся в номинальных пределах, и частичную оценку для расстояний или углов, которые находятся вне этих пределов.

Выделяют две формы использующиеся в данной программе: GlideScore SP, используемую Standard-Precision Glide и GlideScore XP, используемый Extra-Precision Glide [73].

Эти функции используют схожие термины, но сформулированы с учетом разных целей. GlideScore SP, отражающееся в (уравнение 5) [74], представляет собой «более мягкую» функцию, которая хорошо подходит для идентификации лигандов, имеющих склонность к связыванию, даже в тех случаях, когда поза Glide имеет значительные недостатки. Эта версия направлена на минимизацию ложноотрицательных результатов и подходит для многих компаний, которые занимаются проверкой баз данных [73].

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

где E_{coul} – кулоновская энергия взаимодействия атомов;

E_{vdW} – Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия;

E_{bind} – основные дескрипторы, способствующие связыванию.

В свою очередь GlideScore XP описанную в (уравнение 6) [74], представляет собой более сложную функцию, которая не терпит стыковку, нарушающую установленные принципы физической химии, например, заряженные и сильно полярные группы в полной мере должны подвергаться воздействию растворителя. Эта версия GlideScore лучше подходит для минимизации ложных срабатываний и может быть полезна при оптимизации лидов или других исследованиях, в которых экспериментально рассматривается только ограниченное количество соединений, и каждое идентифицированное с помощью вычислений соединение должно высокого качества [73],

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

где E_{coul} – кулоновская энергия взаимодействия атомов;

E_{vdW} – Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия;

E_{bind} – основные дескрипторы, способствующие связыванию;

E_{penalty} – дескрипторы, которые препятствуют связыванию.

Достоинством этих функций стало то, что обе учитывают как Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, так и вклад энергии Кулоновского взаимодействия между лигандом и рецептором. Также в данных функциях была учтена и модель сольватации так, как заряженные группы требуют очень тщательной оценки их доступа к растворителю. Кроме того, молекулы воды могут быть захвачены лигандом в гидрофобных карманах, что также является неблагоприятной ситуацией.

Таким образом, можно сказать, что оценочные функции вносят огромный вклад в работу молекулярной стыковки. Они дают повысить точность теоретически предсказанной пространственной структуры комплекса белок–лиганд. С продвижением данных о межмолекулярных взаимодействиях подход к оценке молекулярной стыковки становится более востребованным благодаря развитию системоспецифичных критериев.

1.2.5 *In silico* подходы к дизайну молекулярных клеев

Растущий исследовательский интерес к соединениям молекулярного клея быстро расширяет ассортимент лигаз Е3, молекулярных клеев, их неосустратов и связанных с ними заболеваний, особенно для деградации ранее не поддающихся лечению белков. Молекулярные клеи были обнаружены благодаря случайности, скринингу химической библиотеки и рациональному дизайну. Исследование механизма действия, взаимосвязи структура–активность и взаимодействие белок–молекулярный клей первоначально обнаруженных молекулярных клеев заложили основу для их оптимизации с использованием структурно-ориентированного дизайна лекарств (SBDD) [75].

SBDD обеспечивает специфический, эффективный и быстрый процесс обнаружения и оптимизации соединений. Были обнаружены высокоэффективные и селективные молекулярные клеи со стратегиями SBDD, такими как кристаллизация, моделирование *in silico*, компьютерный анализ стыковки, рационально разработанные конструкции химической

библиотеки, биохимический скрининг, фенотипический скрининг и анализ взаимосвязи структуры и активности [75].

Достижения в разработке молекулярного клея, основанного на талидомиде, дали толчок для расширения новых открытий MG, E3-лигаз и их мишеней. Усилия в разработке новых рациональных стратегий открытия молекулярных клеев привели к возникновению многообещающих подходов, основанных на высокопроизводительных скринингах химической библиотеки. Это привело к идентифицированию четырех новых молекулярных клеев, dCeMM1–4, путем скрининга библиотеки состоящей из 2000 цитотоксических / цитостатических малых молекул на наличие соединений с E3-зависимой антипролиферативной активностью [76].

В другом рациональном подходе была исследована и подвержена скринингу библиотека из 350 000 химических соединений. Был проведен анализ с использованием связывания на основе флуоресцентной поляризации для выявления веществ, которые усиливают PPI онкогенного фактора транскрипции β -катенина и его лигазы E3, SCF β -TrCP. Два соединения, NRX-252114 и NRX-252262, были разработаны с использованием SBDD из четырех первоначально идентифицированных соединений первого поколения с консервативным 6-трифторметилпиридоном, связанным с химическим каркасом из биариламида [77].

В следующем подходе критический анализ базы данных использовался для выявления корреляций между цитотоксичностью химической библиотеки из 4518 малых молекул и уровнями мРНК 499 компонентов лигазы E3 против 518 линий раковых клеток человека. Эта стратегия привела к открытию CR8 **15** (рисунок 12), которое разрушает циклин K, действуя как молекулярный клей (рисунок 13), стабилизирующий комплекс CDK12–циклин K и DDB1 [78].

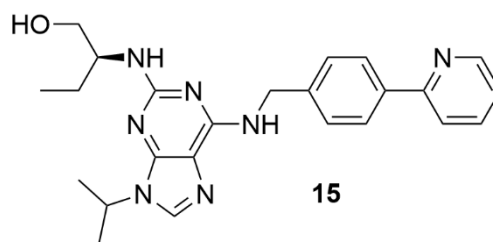


Рисунок 12 – Структура CR8

Успехи, достигнутые с использованием структурной оптимизации лекарств для разработки аналогов на основе талидомида с пониженной тератогенностью, повышенной эффективностью и лучшей целевой специфичностью [79], привели к успешной разработке новых перспективных терапевтических средств, которые в настоящее время находятся на стадии от доклинической стадии до клинической стадии II фазы: СС-122 **16** [80], СС-220 **17** [81], СС-90009 **18** [82].

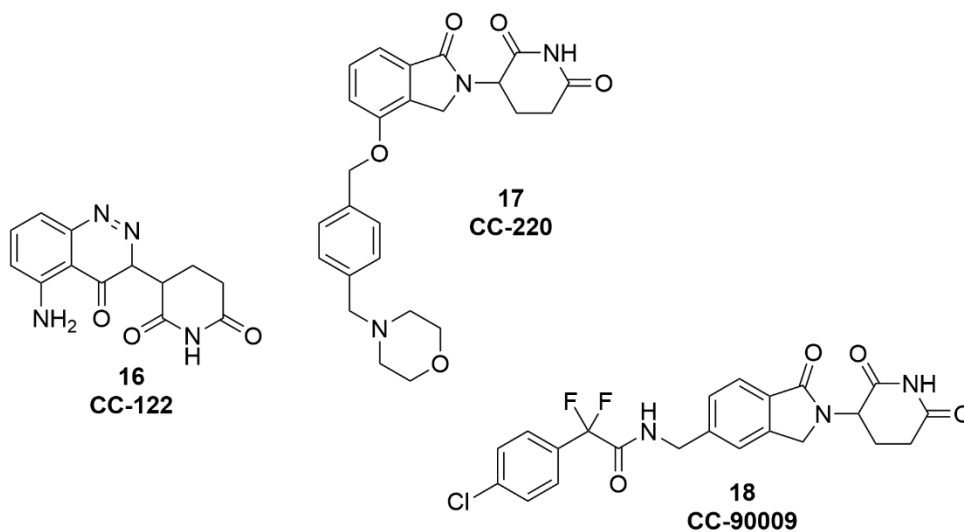


Рисунок 13 – Структуры молекулярных клеев

С помощью комбинации кристаллизации и мутационного анализа было раскрыто понимание взаимодействия CRBN с талидомидом и его аналогами. Эти исследования показали, как основная структура фармакофора, консервативное глутаримидное кольцо, связывается с CRBN (рисунок 14). Он занимает гидрофобную связующую полость между двумя

β листами CRBN, а карбонилы в положениях C2 и C6 и амид в положении N1 образуют водородные связи с CRBN. Положения C3–C5 находятся в ван-дер-ваальсовом контакте с гидрофобным карманом триптофана. Положения C4–C6 на фталоильном кольце обращены к растворителю, а различия в структурных особенностях C4–C6 влияют как на неосубстратную специфичность, так и на эффективность. Эта работа послужила основой для SBDD, связанного с молекулярным клеем [83].

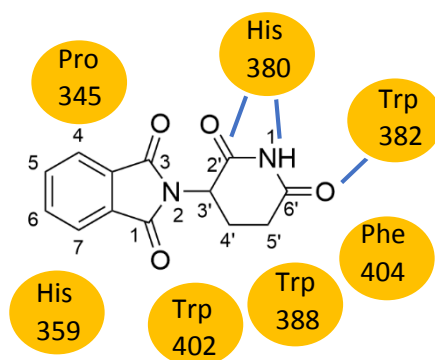


Рисунок 14 – Связывание глутаримидного кольца с CRBN

В распознавании субстратов E3-лигазой, принимают участие дегроны, которые необходимы для взаимодействия с субстратными рецепторами убиквитинлигаз [84]. Белки цинкового пальца IKZF1 и IKZF3 являются факторами транскрипции при MM. После идентификации одного сгиба цинкового пальца Cys2-His2 (C2H2) в качестве минимально достаточного дегрона, необходимого для деградации IKZF1 / IKZF3, весь протеом цинкового пальца подвергают скринингу на предмет мишеней для деградации, опосредованной аналогом талидомида. При помощи компьютерного анализа *in silico* docking было обнаружено приблизительно 50-150 кандидатов на роль цинковых пальцев, связывающие CRBN [32].

Новые мишени, представляющие терапевтический интерес, могут быть дополнительно изучены для определения оптимальных аналогов молекулярного клея на основе талидомида, которые стабилизируют CRBN с помощью представляющих интерес неосубстратов. Источники данных

веществ потенциально можно было бы искать среди существующих специализированных коллекций химических библиотек или путем создания новых специально разработанных химических библиотек с поддержкой *in silico*, адаптированных для химической осуществимости и пространственного разнообразия в новом пространстве CRBN-неосустрат связывающей полости с физико–химическими дескрипторами, которые лежат в пространстве свойств, подобных лекарственным средствам [32].

Одним из сильных подходов к идентификации новых клеев является SciFinder-n. Представляет собой поиск новых соединений основанный на скрининге перспективных библиотечных соединений в соответствии с правилами Липински и связанные со структурой свойства, такие как дескриптор липофильности ($\log P$), молекулярная масса (MW), площадь полярной поверхности (PSA), доноры Н-связей (HBD) и акцепторы Н-связей (HBA), подтверждающие, что физико-химические дескрипторы лежат в пространстве химических свойств, подобных лекарственным средствам, до создания библиотеки. Также можно изучить коммерческую доступность и детали реакционного синтеза. Таким образом, SciFinder-n, по-видимому, является мощным ресурсом для разработки специализированных химических библиотек потенциальных молекулярных клеев, опосредующих РР1 субъединиц лигазы E3, и новых перспективных мишеней [75].

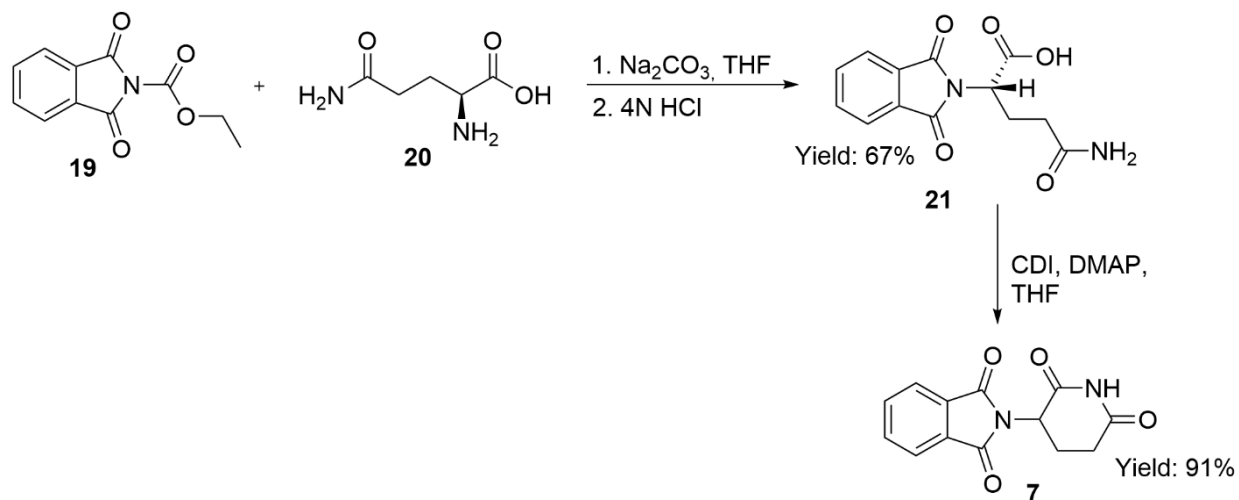
1.3 Лиганды цереблona

Изначально одноименный ген, кодирующий cereblone, рецептор субстрата для комплекса CRL4, ассоциировали с умственной отсталостью [85]. Также было известно, что CRBN, находящийся в комплексе с другими компонентами лигазы, способен регулировать функции ионных каналов [86], подавляя индукцию синтеза АТФ, связываясь с АМПК [87], и отвечая за отрицательную регуляцию CD4⁺ клеток [88], являясь посредником для IMiD агентов в процессах иммуномодуляции и подавления ангиогенеза.

Путь открытия лигандов, связывающихся с данной лигазой, начинается с открытия талидомида. В этом разделе будут подробно рассмотрены как талидомид, так и его аналоги, а также различные подходы к синтезу молекулярных клеев на основе лигандов цереблona.

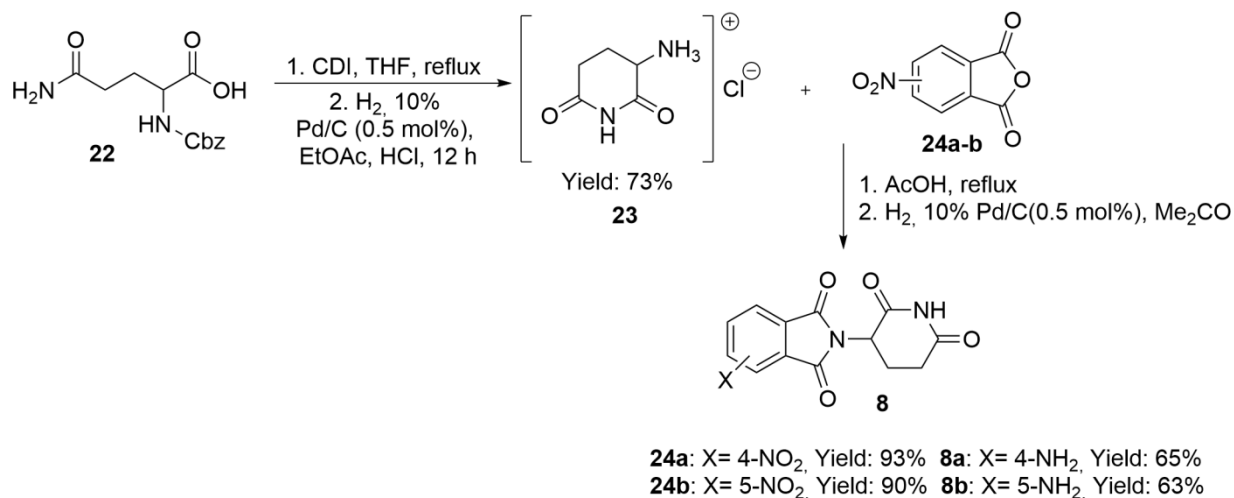
1.3.1 Талидомид и его аналоги

Как уже говорилось ранее, талидомид является лигандом специфически связывающимся с CRBN, и способным оказывать цитотоксический эффект на множественную миелому. Чуть позднее были выявлены его первые аналоги леналидомид и помалидомид, которые обладали аналогичным действием. Говоря о получении непосредственно самого талидомида, то его синтез приведен в работе [89] (схема 1). В данном подходе глутамин был выбран вместо изоглутаминa из-за стоимости и потребности в рацемическом материале. *N*-фталоил-*L*-глутамин **21** был получен по стандартной методике с использованием *N*-карбэтоксифталимида **19**. Обработка *L*-глутаминa Na₂CO₃ в воде с последующим добавлением *N*-карбэтоксифталимида после обработки давала выход **21** равный 67 %. Использование **19** позволяет получить хирально чистый продукт в виде **21** соединения. Далее происходит циклизация **21** в присутствии CDI в THF. На этом этапе происходит рацемизация продукта. В качестве растворителя использовали THF, поскольку талидомид обладает низкой растворимостью в ТГФ, а имидазол, побочный продукт CDI, растворим в THF. Смесь **21** и CDI в присутствии каталитического количества DMAP в THF нагревают до кипения в течение 15-18 ч выход продукта **7** составил 91 % [89].



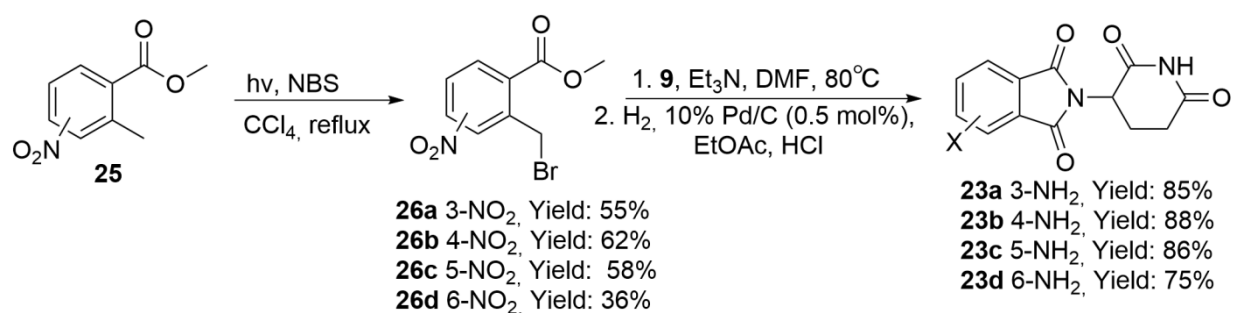
Один из последних аналогов помалидомид, в котором замена изоиндолиноном фталоильного кольца повысила стабильность и биодоступности молекулы, был получен путем конденсации (схема 2). Аминозамещенный аналог талидомида получали путем конденсации 3-аминопиперидин-2,6-диона гидрохлорида соединение **23**. Соединение **23** в свою очередь получали в две стадии из коммерчески доступного Cbz-*L*-глутамина **22**. В начале **22** обрабатывали CDI при обратном кипячении в THF, что позволило получить продукт **23** с выходом 73%. Защитная группа Cbz легко удалялась гидрогенолизом в присутствии 10% Pd/C в смеси (EtOAc/4N) и HCl. Гидрохлорид **23** использовали непосредственно в реакции конденсации ангидрида без очистки. Обработка **23** 3- или 4-нитрофталевыми ангидридами в уксусной кислоте позволила получить 4- и 5-нитрозамещенные аналоги талидомида **24a** и **24b**, соответственно, с хорошими выходами. Нитрогруппы **24a** и **24b** восстанавливали гидрированием с 10% Pd/C, чтобы получить желаемый 4- и 5-аминозамещенный аналог талидомида **8a** и **8b**, соответственно [90].

Схема 2



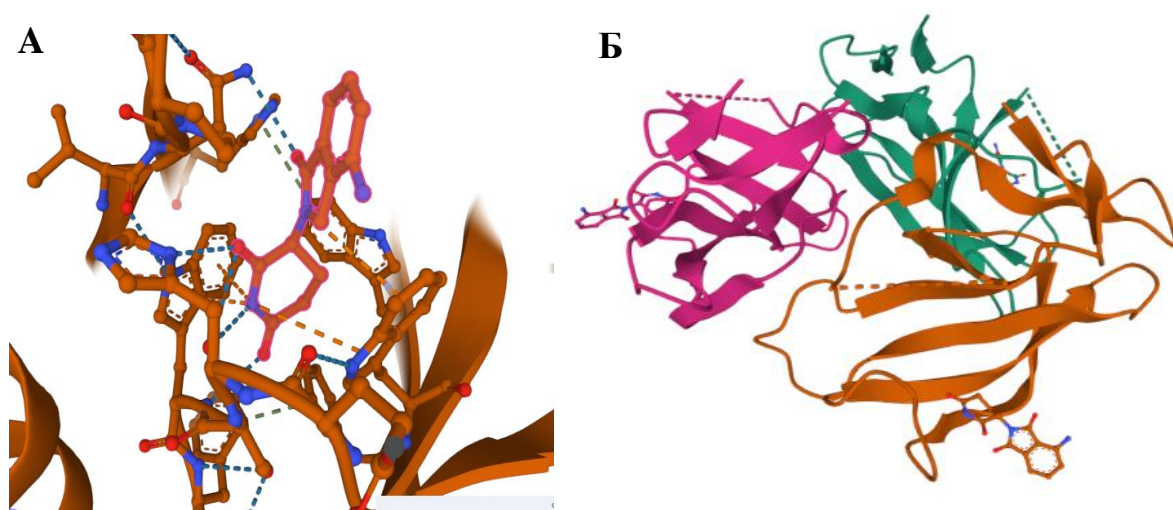
Леналидомид можно получить в трех стадийном синтезе (схема 3). На первой стадии метил-2-метилбензоат **25** бромруют NBS при кипячении в тетрахлорметане, далее полученное соединение **26** обрабатывают, ранее полученным соединением **23** в присутствии Et₃N и DMF, с последующим восстановлением нитрогруппы водородом и палладием на угле с получением итогового соединения **9** [91].

Схема 3



Стоит отметить, что IMiDs также имеют схожий режим связывания (рисунок 15), ориентированный на глутаримидное кольцо в гидрофобной

области, позволяющие выгодно образовать водородные связи между пипиридиндионовыми карбонилами и остатками His 380, Trp382; глутаримидный азот, неподеленная пара которого делокализована между карбонильными электронами, также способен образовывать связь с His 380. Изоиндолиновая система во всех случаях ориентирована в полость, доступную для растворителя [83].



А – леналидомид в активном сайте CRBN (PDB ID: 4CI2);
Б – помалидомид в активном сайте CRBN (PDB ID: 4TZU)

Рисунок 15 – Модели связывания и структуры IMiDs

Связывание IMiDs вызывает конформационные изменения на поверхности CRBN, приводя к связыванию ряда других белков называемых неосубстратами [91], которыми являются факторы Ikaros и Aiolos (IKZF1 и IKZF3) [28].

Помимо факторов транскрипции IKZF, молекулярные клеи на основе талидомида могут опосредовать протеосомальную деградацию еще и такой мишени, как казеинкиназа SK1 α , также вовлеченной в процессы прогрессии множественной миеломы и миелодиспластического синдрома [92].

Недавно было установлено, что тератогенность талидомида и его аналогов обуславливается специфическим связыванием CRL4-CRBN

эмбрионального фактора транскрипции SALL4, деградация которого влечет за собой нарушения в процессах развития плода [92].

Авадомид (CC-122) – аналог талидомида, о котором впервые было сообщено в работе [80], демонстрирует превосходящие леналидомид по скорости уровня CRBN-зависимой деградации IKZF1 и IKZF3. Структура **16 MG** представлена на (рисунке 13). CC-122 обеспечивает удовлетворительную деградацию IKZF1,3 уже через час при обработке 10 μ M линий В-клеточной лимфомы; более того, гораздо большая популяция клеток была обнаружена в состоянии позднего апоптоза по сравнению с леналидомидом в цитометрическом анализе [80]. Выполненное компьютерное моделирование указывает на абсолютную идентичность глутаримидного мотива обоих соединений в IMiD-связывающем сайте CRL4-CRBN.

Позже было заявлено о создании ибердомида (CC-220) – также способного уменьшить уровни IKZF1 и IKZF3 в клетке MM лучше, чем помалидомид и леналидомид [93].

В частности, была показана уверенная деградация Ikaros в помалидомид-резистентных клетках. Также CC-220 опосредует CRBN-зависимую деградацию ZFP91-ZNF содержащего белка, подавляющего апоптоз и стимулирующего рост опухолевых клеток при MM [94,95]. Структура CC-220 **17** приведена ранее на (рисунке13).

1.3.2 Подходы к синтезу молекулярных клеев на основе лигандов cereblona

Один из молекулярных клеев основанный на лигандах cereblona считается CC-90009, который представляет собой препарат, модулирующий CRBN, обладающий антипролиферативной и проапоптотической активностью в отношении острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Эффективность CC-90009 против ОМЛ достигается за счет деградации GSPT1 (переход от фазы G1 к фазе S1) и в настоящее время находится в

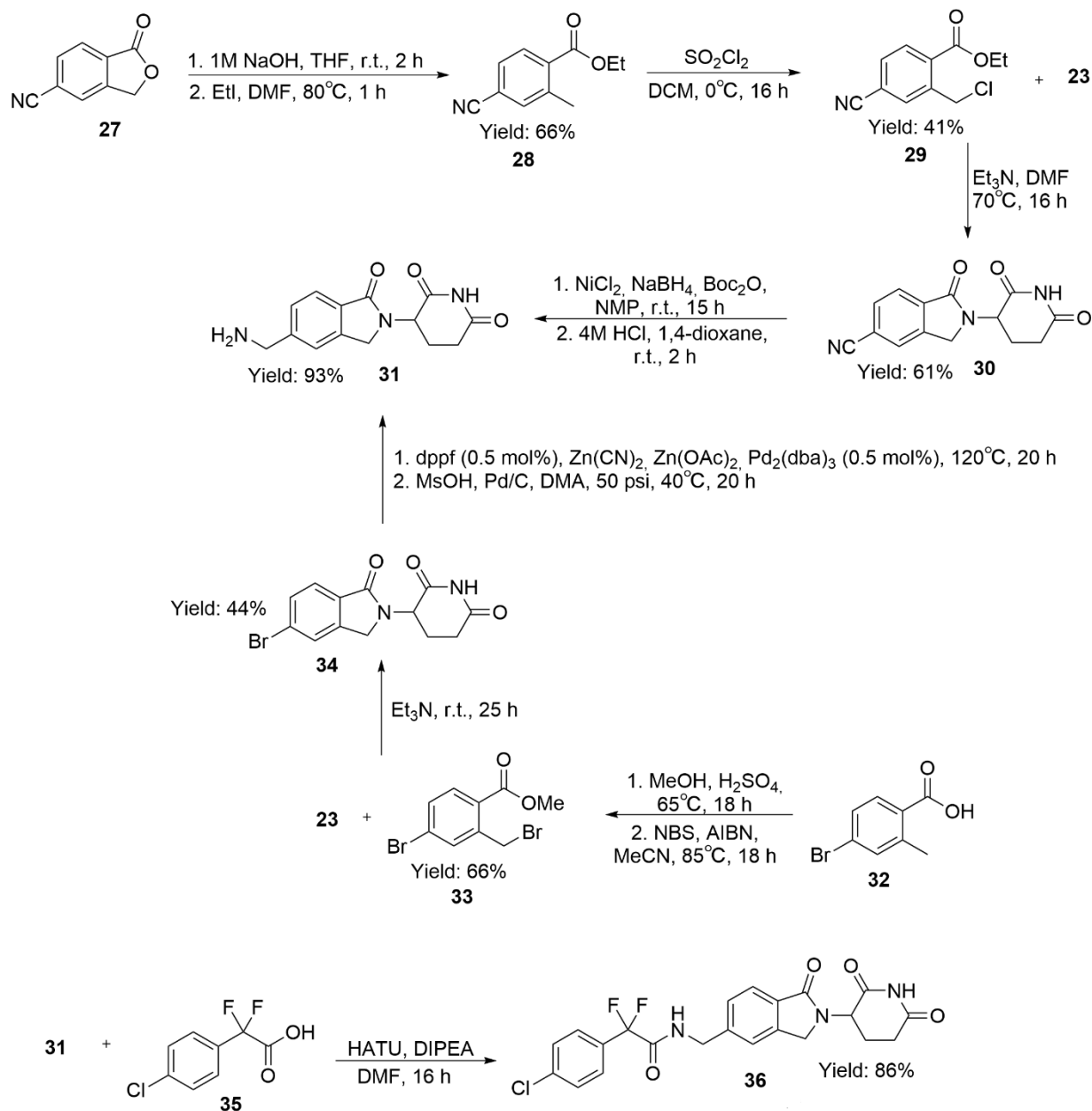
фазе 1 клинических испытаний для лечения рецидивирующего / рефрактерного острого миелоидного лейкоза [82].

Синтез СС-90009 (схема 4) начинается с получения 2-(4-хлорфенил)-2,2-дифторуксусная кислоты **31**, которую можно синтезировать двумя альтернативными путями. Первый начинается с этерификации по Фишеру 4-бром-2-метилбензойной кислоты **32** с последующим радикальным бромированием толилметильной группы. Образование бициклического лактама осуществляли с использованием 3-аминопиперидин-2,6-диона **23** в качестве нуклеофила для замещения бромидов с последующей конденсацией с участием сложного эфира **33** с образованием лактама **34**. Аминометильный радикал был получен путем введения цианида в арилбромид, с последующим восстановлением и получением соединения **31** [96].

Второй вариант заключается в том, что сначала раскрывают цикл в лактоне **27**, с последующим нуклеофильным замещением и получением продукта **28**. Далее селективно хлорируют метильную группу с получением **29**. Также как и в первом варианте в качестве нуклеофила используется **23** соединением для получения бициклического лактама **30**. Путем дальнейшего восстановления нитрила была получена **31** кислота. Этот альтернативный путь обеспечивает маршрут, который оказался удобным при использовании синтеза в больших масштабах, и позволяет избежать использования палладия [96].

После получения соединения **31** его вводят в реакцию с 2-(4-хлорфенил)-2,2-дифторуксусной кислотой **35**, в присутствии DMF и HATU, с последующим добавлением DIPEA, получая готовый продукт 2-(4-хлорфенил)-*N*-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)оксоизоиндолин-5-ил)метил)-2,2 дифторацетамид **36** (СС-90009) с выходом 86% [96].

Схема 4

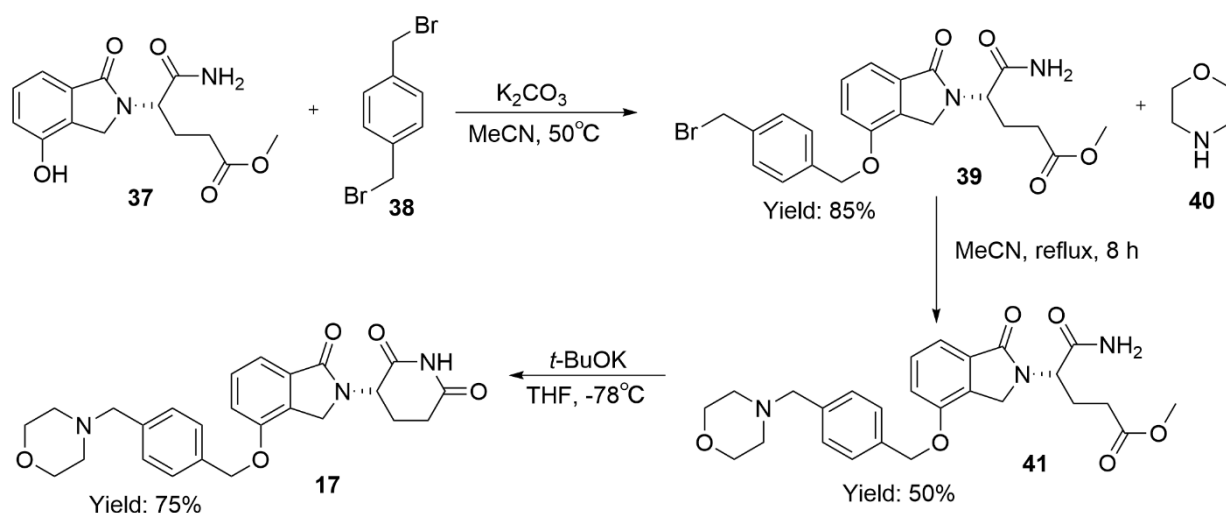


Выше упомянутый ибердомид (СС-220), синтезировали начиная с алкилирования по атому кислорода оптически чистого (*S*)-3-(4-гидрокси-1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона **37**, в роли алкилирующего агента выступал 1,4-бис(бромметил)бензол **38** в присутствии карбоната калия для получения **39**. Реакция нуклеофильного замещения бромида **39** с морфолином **40** дала продукт **41**. Последующая циклизация **41** под действием *t*-BuOK при -78°C продолжалась с

получением непосредственно самого СС-220 **17** с выходом 82% при чистоте (ВЭЖХ) 98.5% (схема 5) [81].

Конфигурация соединения **37** основывалась на коммерчески доступном, (*S*)-гидрохлоридметил-4,5-диамино-5-оксопентаноате. Конфигурация и хиральная чистота **39** и **41** не измерялись. Однако хиральная чистота соединения **17** была определена как превышающая 99%. Таким образом, конфигурация соединения **17** была выбрана в качестве *S*-изомера. Соединение **17** являлось хирально стабильным *in vivo* [81].

Схема 5

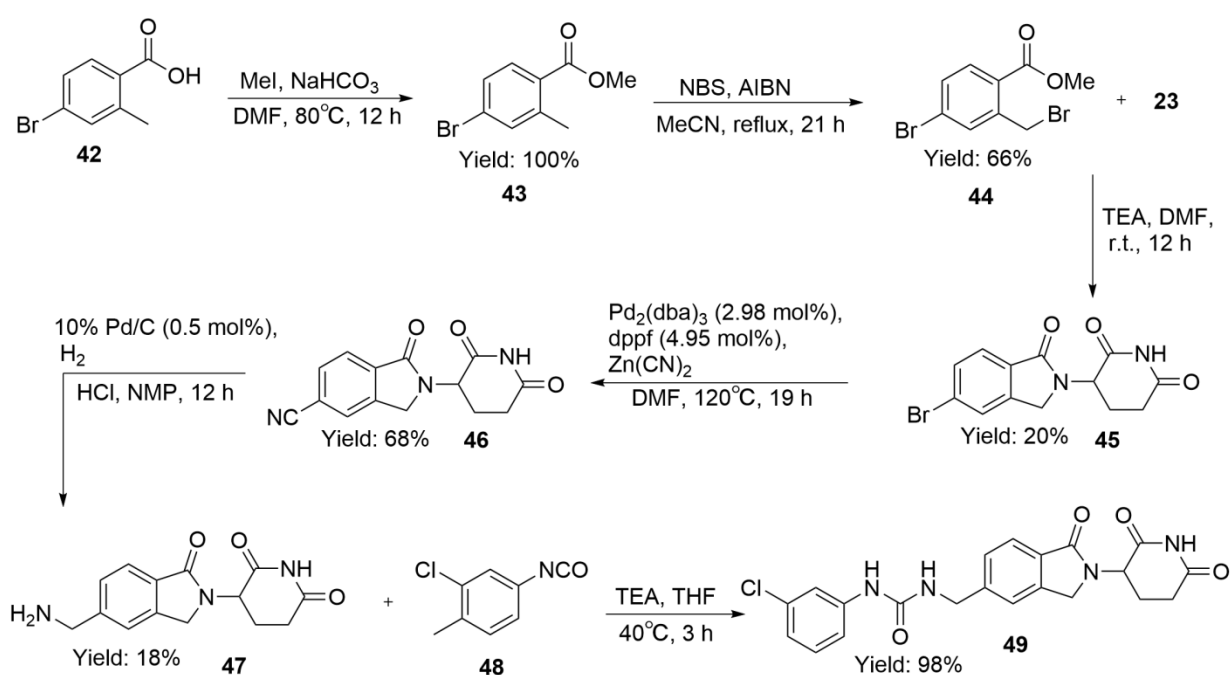


Соединение СС-885 было обнаружено как способное ингибировать клеточный рост в исследованиях на большом количестве раковых клеточных линий, также упомянутый MG демонстрировал уверенную антипролиферативную активность на клетках острого миелоидного лейкоза [97]. Недавно было обнаружено также о CRBN-зависимой деградации циклин зависимой киназы CDK4 при действии СС-885 [98].

Синтез СС-885 представлен в работе [98] (схема 6). Вначале проводят реакцию нуклеофильного замещения для получения метилового эфира 4-бром-2-метилбензойной кислоты **43**. Для этого смешивали 4-бром-2-метилбензойной кислоту **42**, йодометан и бикарбонат натрия в DMF,

нагревая до 80°C при перемешивании в течение ночи. Затем **43** селективно пробромировали против двойной связи с получением сложного метилового эфира 4-бром-2-бромметилбензойной кислоты **44** с выходом 66%. Следующим шагом была циклизация, в которой смесь **44** и **23** в DMF обрабатывали по каплям с триэтиламиноном для получения 3-(5-бром-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил)-пиперидин-2,6-дион **45** в виде серого твердого вещества с выходом 20%. **46** получали путем нуклеофильного замещения брома на цианогруппу в бис(дифенилфосфино)ферроцене, трис(дибензилиденацетоне)дипалладия и цианиде цинка в DMF при нагревании до 120°C и перемешивании в течение 19 часов. Далее **46** восстанавливали в Pd/C, концентрированной соляной кислоте и *N*-метилпирролидоне с получением соли 3-(5-аминометил-1-оксо-1,3-дигидро-изоиндол-2-ил)-пиперидин-2,6-дион гидрохлорида **47** с выходом 18%. На последней стадии проводили ацилирование по атому азота в присутствии TEA и THF, нагревая смесь до 40°C, с получением **49** (СС-885) и выход продукта составил 60% [98].

Схема 6



2 Результаты и их обсуждение

Молекулярные клеи являются новой и интересной стратегией в контексте направленного протеолиза. Их особенность заключается в способности облегчать и индуцировать белок-белковые взаимодействия за счет изменения конформации интерфейса партнера по связыванию. Использование лигандов к различным E3-лигазам, обладающих активностью молекулярных клеев, опосредует образование тройного комплекса с белком интереса, что в свою очередь способствует его протеасомной деградации [2-3].

Интерес к упомянутой ранее стратегии обусловлен ее потенциалом как мощной терапевтической стратегии для лечения многих заболеваний в контексте воздействия на «неуловимый» протеом. В настоящее время она активно разрабатывается и исследуется [5].

Цель данной работы – осуществить *in silico* оценку коллекции соединений Центра медицинской химии с точки зрения возможности проявления активности молекулярного клея IKZF1-CRBN.

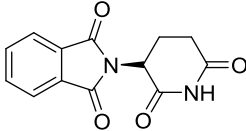
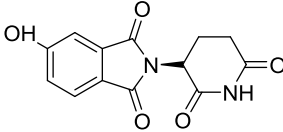
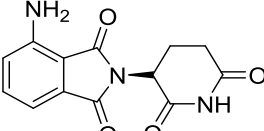
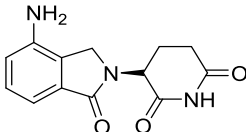
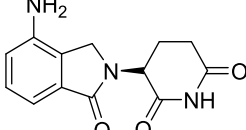
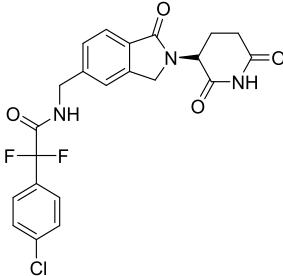
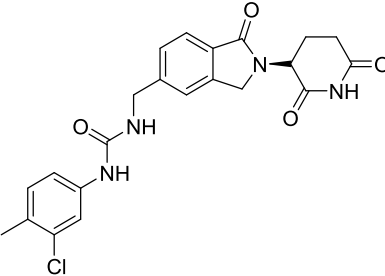
Для достижения поставленной цели на первом этапе нам было необходимо провести отбор, подготовку и анализ белковых комплексов E3 лигазы CRBN с деградатором IKZF1, а затем осуществить индуцированный докинг трех различных библиотек аналогов талидомида, на основании результатов которого и попытаться идентифицировать те соединения, которые потенциально могут являться молекулярными клеями и быть использованы для деградации фактора транскрипции Ikaros.

2.1 Выбор и подготовка белковых комплексов CRBN-POI

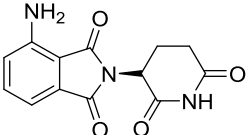
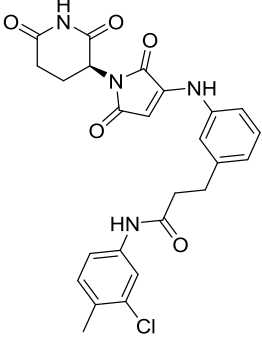
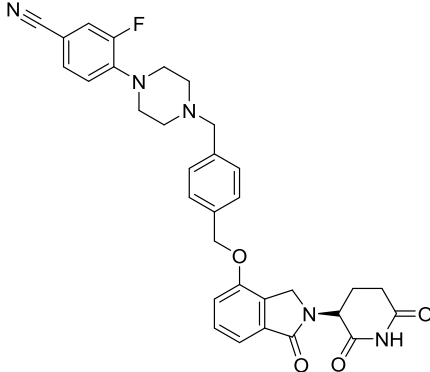
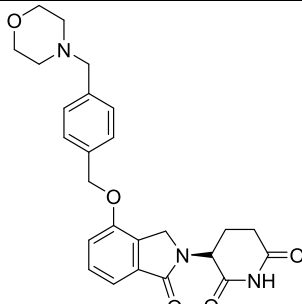
На сегодняшний день в Protein Data Bank [99] депонировано множество белковых комплексов, включающих убиквитинлигазу CRBN. Часть из них не была включена в нашу выборку, так как не содержала

структур мишеней интереса или представляла собой тройные комплексы POI-PROTAC-CRBN, не подходящих для моделирования в рамках данной работы. Найденные нами комплексы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Комплексы CRBN-дегрон, содержащие молекулярные клеи

PDB ID	Дегрон	Разрешение, Å	Структура лиганда
7BQU	SALL4	1.90	
7BQV	SALL4	1.80	
6H0F	IKZF1	3.25	
5FQD	CK1a	2.45	
6UML	SALL4	3.58	
6XK9	GSPT1	3.64	
5HXB	GSPT1	3.60	

Продолжение таблицы 2

6H0G	ZNF692	4.25	
h7LPS	IKZF2	3.78	
8D7Z	IKZF1	3.10	
8D80	IKZF1	3.60	

Мы обратили внимание на комплексы 6H0F [32], 8D7Z и 8D80 [100], обладающие разрешением 3.25, 3.10 и 3.60 Å, соответственно, и содержащие комплексы DDB1-CRBN-**IKZF1**(ZF1). Выбранные структуры включают различные по размеру молекулярные клеи и смогут обеспечить нужное разнообразие форм и геометрий активных сайтов.

Данные комплексы были загружены и подготовлены с помощью панели подготовки белка Protein Preparation Wizard [101]: добавлены

водороды и отсутствующие боковые цепи, уточнены порядки связей и состояния протонирования [102]; молекулы воды, любые гетероатомы (кроме лигандов) и цепь DDB1 удалены. Атомы цинка в CRBN и IKZF1 были сохранены. Первоначально мы провели жесткий (с точки зрения белка) докинг для проверки правильности подготовки структур и точности используемой оценочной функции Glide [73] относительно способности правильно моделировать связывание в сайте, образованном IKZF1 и CRBN. С помощью инструмента Receptor Grid Generation были определены области стыковки, затем структуры нативных лигандов были удалены из структур комплексов, а модуль Ligand Docking использовался для проведения докинга в режиме повышенной точности Glide XP [103] с учетом подвижности лиганда. В таблице 3 представлены результаты стыковки:

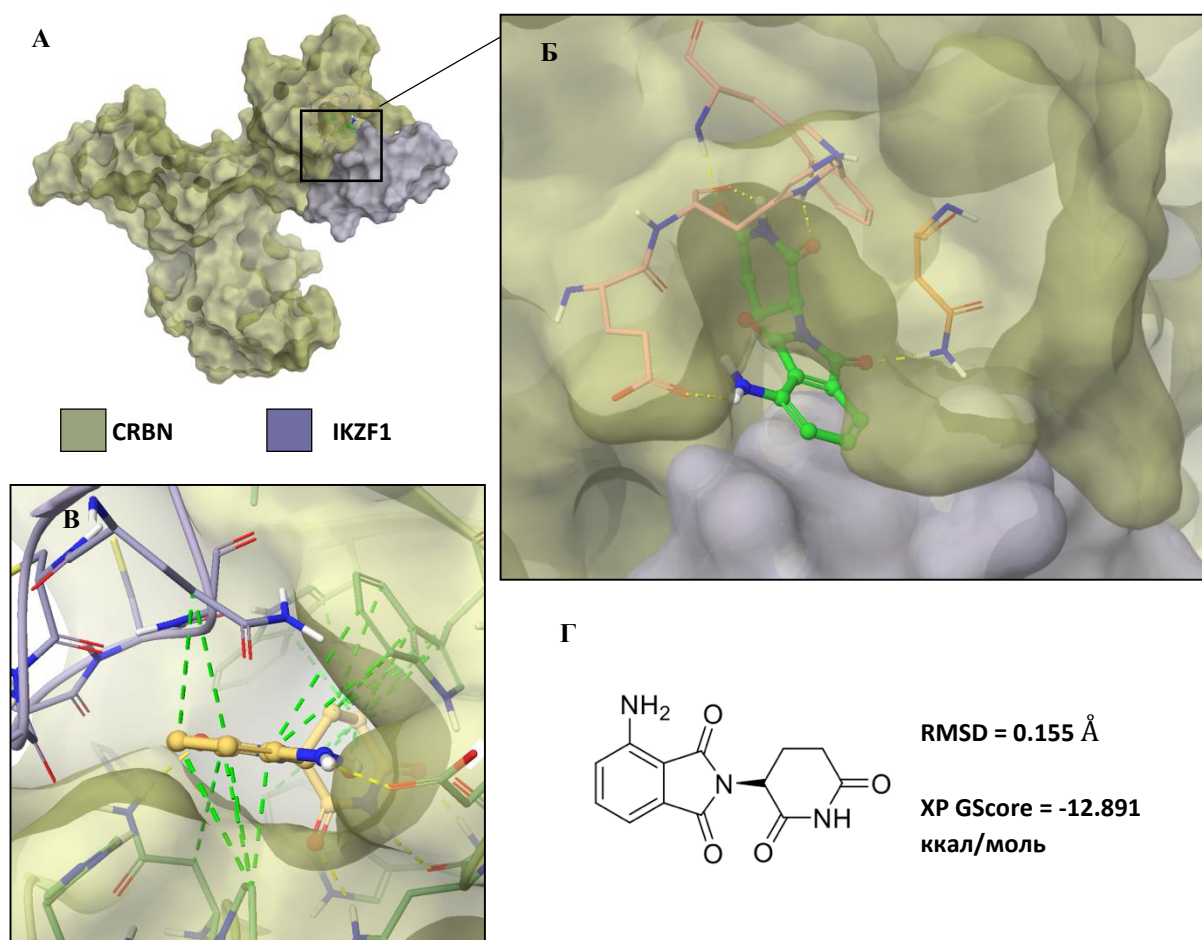
Таблица 3 – Результаты нативного докинга

PDB ID	XP GScore, ккал/моль	RMSD, Å
6H0F	-12.891	0.155
8D7Z	-6.231	3.506
8D80	-9.254	2.364

Мерой качества подготовки структур и валидности оценочной функции является среднеквадратичное отклонения атомных координат между кристаллической конформацией лиганда и позой, полученной при стыковке. К сожалению, у нас не получилось воспроизвести геометрию связывания клея в 8D7Z, соответственно, данный комплекс был отброшен.

Структура 6H0F содержит хорошо известный помалидомид 8 в качестве нативного лиганда. Глутаримидное кольцо образует водородные связи с остатками His378 и Trp380 в глубине сайта, карбонил фталимидного фрагмента взаимодействует с Asn351, аминогруппа – с Glu377. Образование связей между помалидомидом и IKZF1 не наблюдается. Попытка визуализировать локальные гидрофобные взаимодействия показывает, что

большая их часть опосредуется CRBN (лишь небольшая – Gln146 Ikaros) (рисунок 16).



А – Структура комплекса IKZF1(фиолетовый)-CRBN(зеленый); Б – режим связывания помалидомида **8** в активном сайта CRBN; В – визуализация гидрофобных взаимодействий помалидомида с аминокислотами сайта; Г – структура нативного лиганда и значения RMSD, XP GScore

Рисунок 16 – связывание помалидомида **8** в активном сайте CRBN; желтый пунктир – водородные связи; зеленый пунктир – гидрофобные взаимодействия

Количественное описание интерфейса белок-белковых взаимодействий представлено в таблице ниже. Как можно увидеть, большая часть из пар (37 всего) взаимодействующих остатков отличается высокой степенью комплементарности, а средний параметр buried SASA, описывающий долю доступной для растворителя площади поверхности,

которая оказывается скрыта из-а взаимодействия с остатком партнера, составляющий для CRBN 61.81% и для IKZF1 – 64.016% показывает, что большая часть поверхности взаимодействий стабилизирована термодинамически (таблица 4).

Таблица 4 - Количественное описание интерфейса взаимодействия CRBN-IKZF1(6H0F)

Взаимодействующие остатки		Дистанция, Å	Комплементарность поверхности	CRBN Buried SASA, %	IKZF1 Buried SASA, %
CRBN	IKZF1				
Trp 400	Cys 150	1.9	0.84	66.6	92.2
Arg 373	Gly 141	2.1	0.76	33.8	21.6
His 357	Gln 149	2.3	0.83	67.2	63.5
Asn 351	Asn 148	2.0	0.85	52.3	54.2
Trp 400	Gln 149	3.6	0.84	66.6	63.5
His 397	His 167	2.5	0.87	82.6	39.1
His 397	Cys 150	2.8	0.84	82.6	92.2
His 397	Leu 166	3.9	0.83	82.6	58.8
His 397	His 163	2.9	0.61	82.6	80.9
Ser 396	Leu 166	2.9	0.84	72.2	58.8
Ala 395	Leu 166	3.2	0.78	38.3	58.8
Cys 394	Leu 166	2.6	0.88	20.3	58.8

Продолжение таблицы 4

Gln 390	His 163	3.0	0.32	49.0	80.9
Val 388	Ala 152	2.2	0.80	99.3	100.0
Val 388	Cys 150	2.7	0.82	99.3	92.2
Val 388	His 163	3.3	0.59	99.3	80.9
Val 388	Gly 151	3.2	0.83	99.3	69.8
Trp 386	Gly 151	2.7	0.85	63.5	69.8
Trp 386	Ala 152	4.0	0.83	63.5	100.0
Trp 386	Cys 150	4.0	0.85	63.5	92.2
Trp 386	Ser 153	3.9	0.77	63.5	43.4
Arg 373	Arg 143	2.5	0.72	33.8	47.5
Arg 373	Glu 142	2.6	0.78	33.8	11.0
Gly 372	Arg 143	2.9	0.60	61.8	47.5
Gly 372	Ser 153	3.2	0.59	61.8	43.4
Ile 371	Phe 154	2.7	0.76	70.3	54.2
Ile 371	Ala 152	2.4	0.75	70.3	100.0
Ile 371	Ser 153	3.2	0.70	70.3	43.4
Ile 371	Arg 143	2.7	0.70	70.3	47.5
Hie 357	Cys 150	3.9	0.82	67.2	92.2
Tyr 355	Gln 149	2.8	0.86	36.8	63.5
Tyr 355	Asn 148	2.6	0.87	36.8	54.2
His 353	Asn 148	2.6	0.89	33.3	54.2
Asn 351	Gln 149	2.6	0.84	52.3	63.5
Asn 351	Cys 150	3.4	0.83	52.3	92.2
Gln 325	Gly 169	2.7	0.00	24.5	44.3

Более того, между белками возникает 4 водородные связи:
 Arg373(CRBN)-Gly138(IKZF1), Trp400(CRBN)-Cys150(IKZF1),
 His357(CRBN)-Gln149(IKZF1), Asn351(CRBN)-Asn148(IKZF1) (рисунок 17).

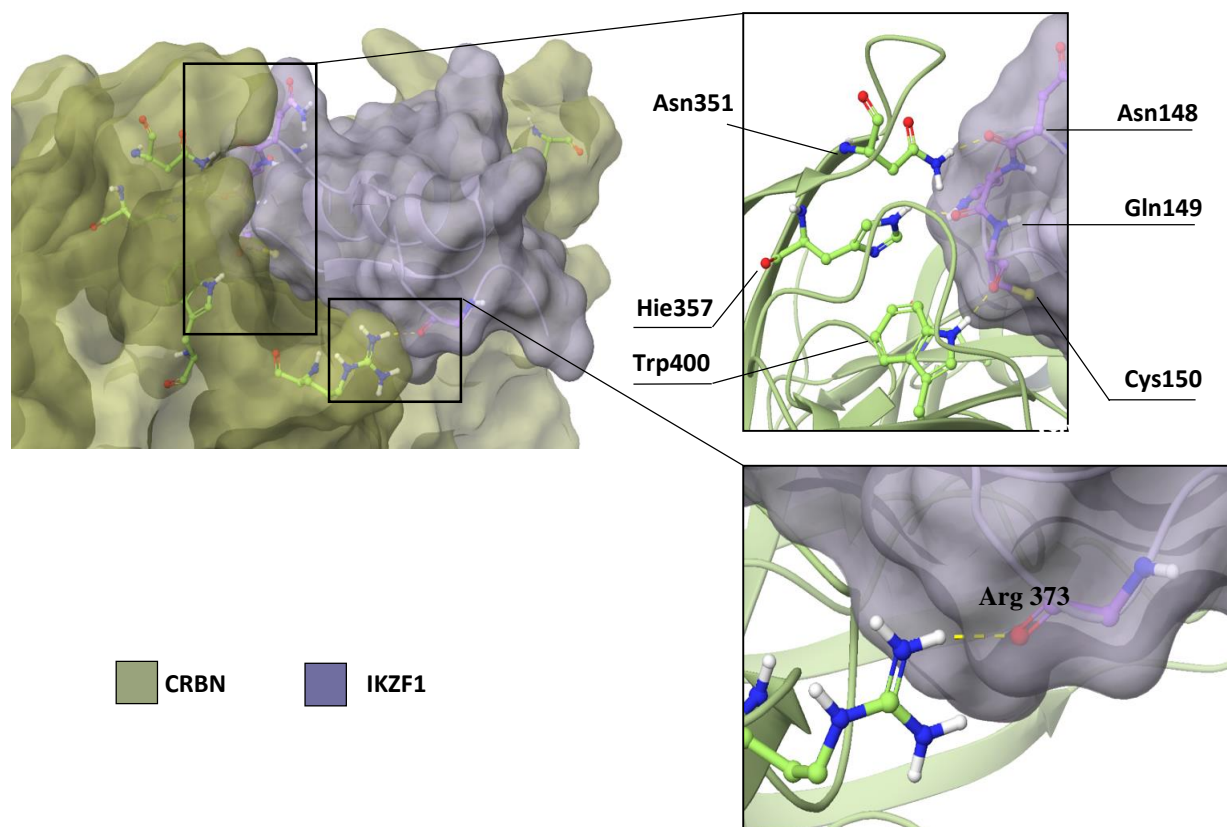
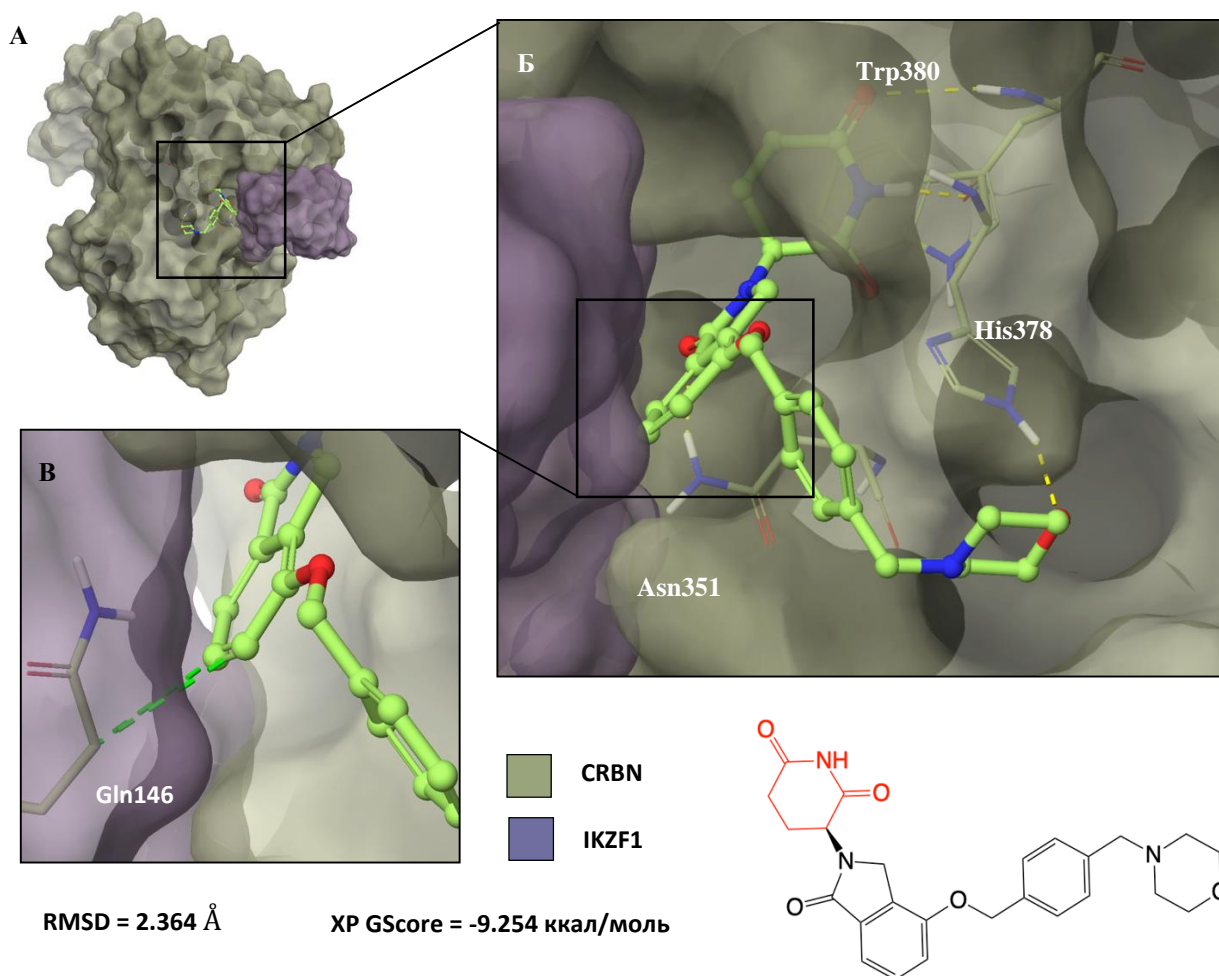


Рисунок 17 – Водородные связи в интерфейсе взаимодействий CRBN-IKZF1 бНОФ; желтый пунктир – водородные связи

Ибердомид **17**, содержащийся в комплексе 8D80, демонстрирует тот же режим связывания глутаримида, что и помалидомид **8** в бНОФ. Оксibenзильная группа выходит из IMiD-связывающего сайта и образует одиночное локальное гидрофобное взаимодействие фенильного кольца с остатком Gln146 (как и в предыдущем комплексе) фактора транскрипции Ikaros. *N*-метилморфолин ориентируется вдоль поверхности CRBN, где имеет место быть водородная связь с His378 цереблona (рисунок 18).



А – Структура комплекса IKZF1(фиолетовый)-CRBN(зеленый); Б – режим связывания ибердомида **17** в активном сайте CRBN; В – визуализация гидрофобных взаимодействий ибердомида с аминокислотами сайта; Г – структура нативного лиганда и значения RMSD, XP GScore.

Рисунок 18 – связывание ибердомида **17** в активном сайте CRBN; желтый пунктир – водородные связи; зеленый пунктир – гидрофобные взаимодействия

Интерфейс белок-белкового взаимодействия в комплексе представлен 34 остатками. Средняя степень комплементарности поверхностей аминокислотных пар ниже, чем в комплексе помалидомида (48.88% против 75.39%), при том что значения усредненной buried SASA (69.83% - CRBN, 68.52% - IKZF1) сопоставимы со значениями для структуры 6H0F (см. выше). Имеют место быть 3 водородные связи: Tyr355(CRBN)-

Gln149(IKZF1), Trp400(CRBN)-Cys150(IKZF1), Asn351(CRBN)-Asn148(IKZF1) (таблица 5).

Таблица 5 - Количественное описание интерфейса взаимодействия CRBN-IKZF1 (8D80)

CRBN	IKZF1	Дистанция, Å	Комплементарность поверхности	CRBN Buried SASA, %	IKZF1 Buried SASA, %
Tyr 355	Gln 149	1.8	0.87	53.2	57.1
Trp 400	Cys 150	2.1	0.31	90.2	93.6
Asn 351	Asn 148	1.9	0.41	96.7	57.7
Asn 351	Gln 149	3.5	0.44	96.7	57.1
Asn 351	Cys 150	3.3	0.33	96.7	93.6
His 353	Gln 146	3.2	0.26	56.7	43.2
His 353	Asn 148	2.6	0.63	56.7	57.7
Tyr 355	Asn 148	2.4	0.84	53.2	57.7
His 357	Gln 149	2.6	0.48	51.8	57.1
His 357	Cys 150	3.2	0.37	51.8	93.6
Ile 371	Phe 154	3.2	0.03	31.1	61.9
Gly 372	Arg 143	3.7	0.56	28.7	64.3
Gly 372	Ser 153	3.6	0.14	28.7	76.8
Arg 373	Gly 141	2.1	0.88	41.0	20.1
Arg 373	Arg 143	2.5	0.92	41.0	64.3
Trp 386	Gln 146	3.1	0.02	93.6	43.2
Trp 386	Cys 150	4.0	0.31	93.6	93.6
Trp 386	Gly 151	2.6	0.08	93.6	100.0
Val 388	Cys 150	3.8	0.63	95.4	93.6
Val 388	Gly 151	2.9	0.40	95.4	100.0
Val 388	Ala 152	2.1	0.63	95.4	93.5
Val 388	Ser 153	3.1	0.37	95.4	76.8
Gln 390	His 163	3.3	0.71	63.7	90.9
Gln 390	Leu 166	3.5	0.73	63.7	55.1
Cys 394	Leu 166	3.4	0.00	20.1	55.1
Ala 395	Arg 162	3.3	0.00	54.2	17.2
Ala 395	Leu 166	2.5	0.85	54.2	55.1
Ser 396	Leu 166	2.8	0.80	48.1	55.1
His 397	Cys 150	2.1	0.68	88.7	93.6

Продолжение таблицы 5

His 397	Ala 152	2.8	0.68	88.7	93.5
His 397	His 163	2.2	0.76	88.7	90.9
His 397	Leu 166	3.7	0.79	88.7	55.1
His 397	His 167	3.2	0.63	88.7	11.6
Trp 400	Gly 151	3.5	0.08	90.2	100.0

Связи триптофаном цереблona с цистеином Икароса, а также остатками аспаргиновых кислот образуются также, как и в 6H0F, а взаимодействие с Gln149 IKZF1 образует не His357, а Tyr155 (рисунок 19).

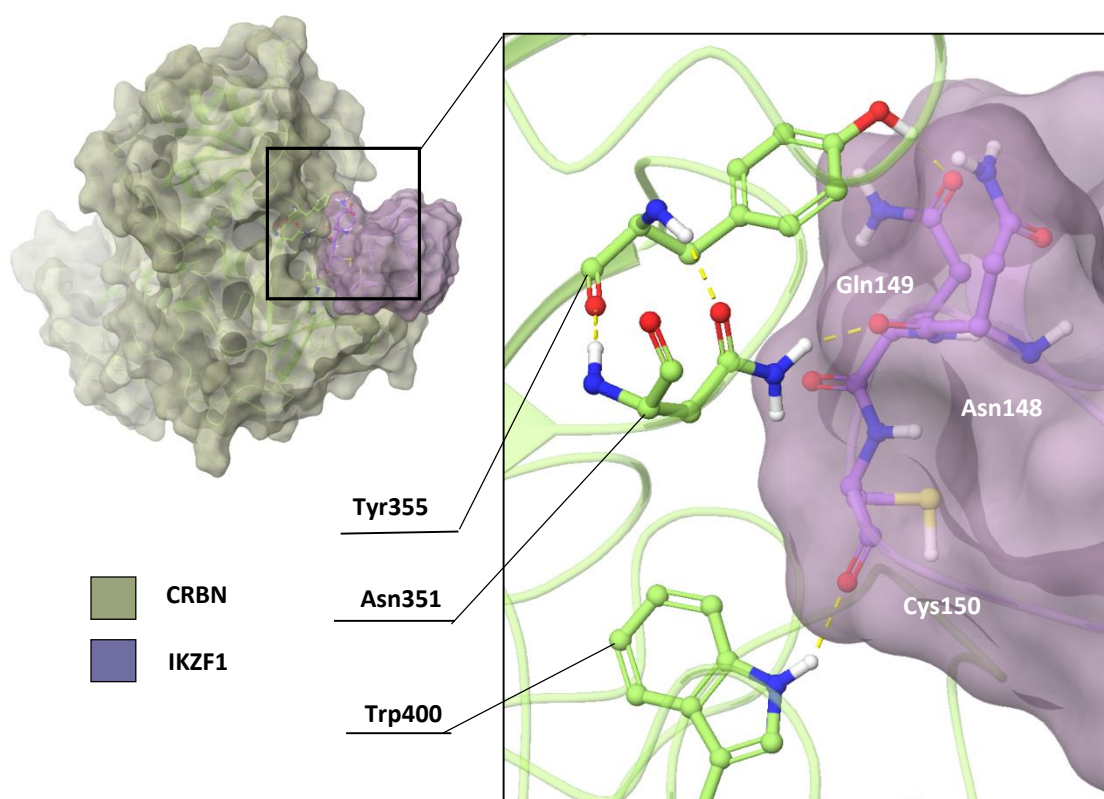
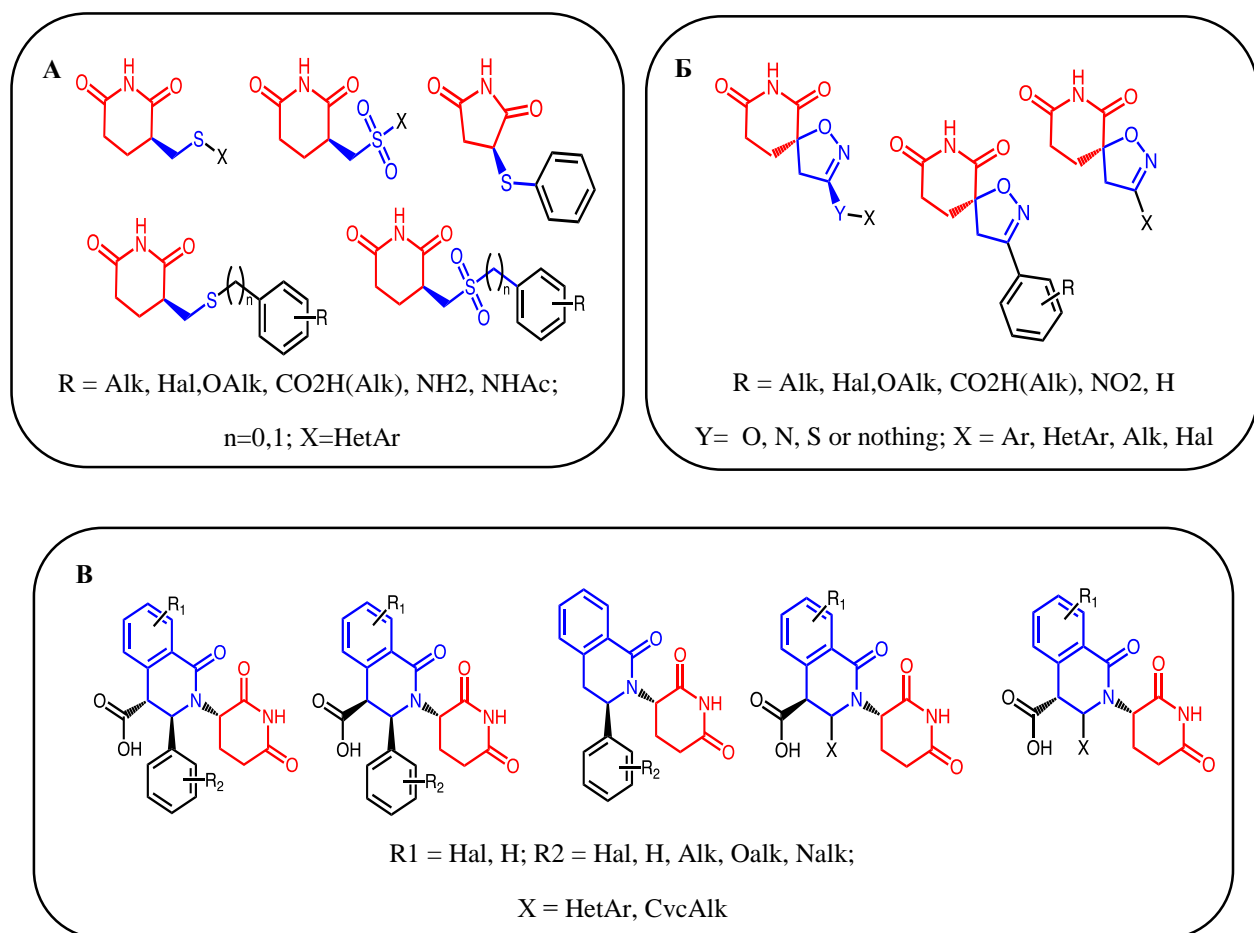


Рисунок 19 – Водородные связи в интерфейсе взаимодействий CRBN-ИКZF1 6H0F; желтый пунктир – водородные связи

2.2 Подготовка и аннотирование коллекции лигандов

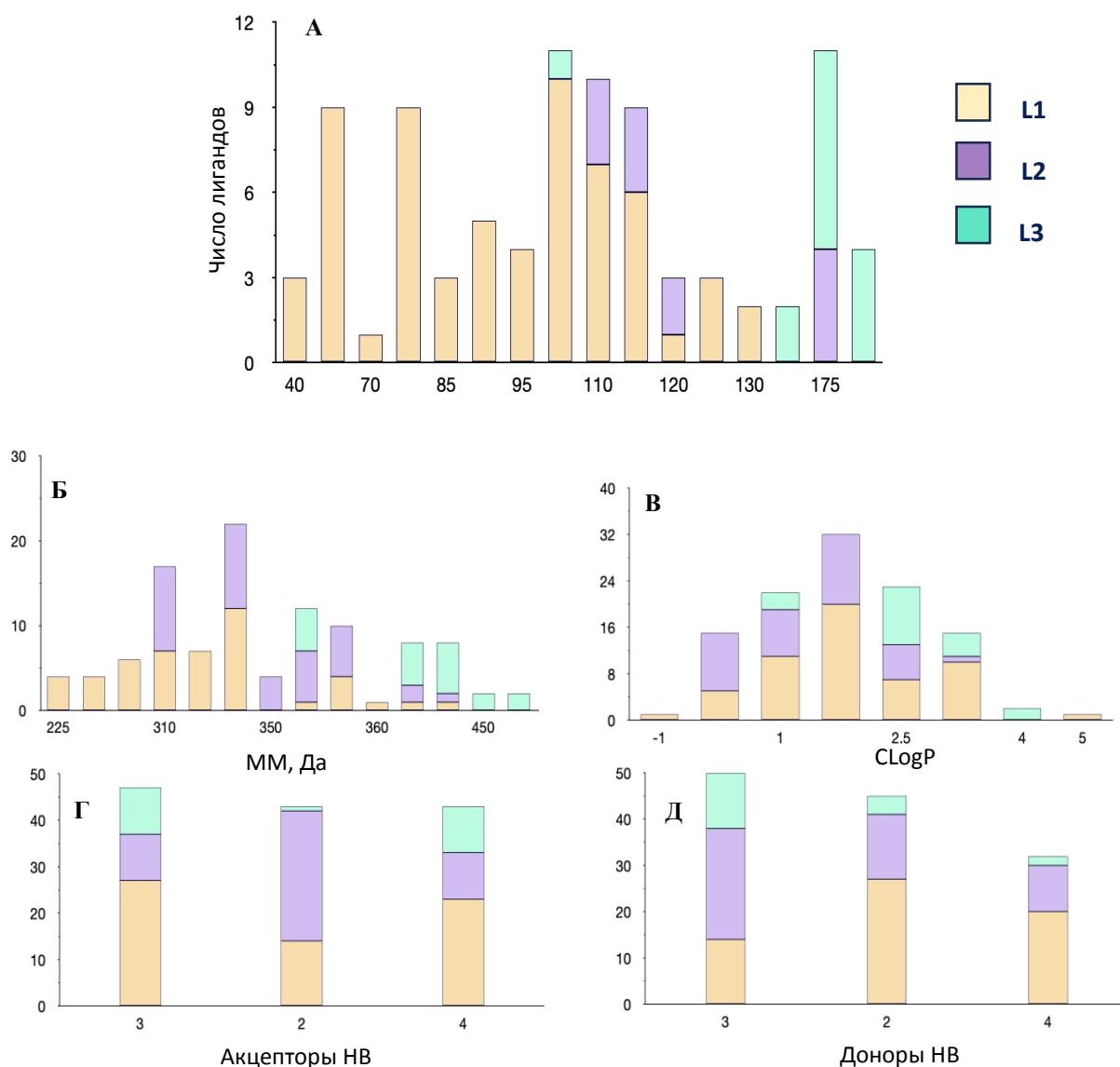
На рисунках 20-21 представлены структуры различных лигандов CRBN из коллекции Центра медицинской химии и их свойства, все соединения содержат схожий цереблон-связывающий мотив: глутаримидное (пиперидин-2,6-дионовое) или пирролидин-2,6-дионовое ядро. Библиотека L1 (62 соединения) в основном представлена различными Ar/HetAr-замещенными сульфидами и сульфонами, L2 (48 соединений) – дигидрооксазолсодержащими спироциклами, L3 (19 соединений) – дигидроизохинолинон-глутаримидными аналогами IMiDs.



А – Структуры соединений библиотеки L1; Б – Структуры соединений библиотеки L2;

В – Структуры соединений библиотеки L3

Рисунок 20 – Структуры соединений библиотек



А – площадь полярной поверхности, Å²; Б – молекулярная масса, Да; В – вычисленный LogP; Г – число акцепторов водородной, Д – связи число доноров водородной связи

Рисунок 21 – Диаграммы распределения их свойств

2.3 Индуцированная стыковка и анализ ее результатов

Подготовленные библиотеки соединений были объединены в один набор и подвергнуты индуцированному докингу с помощью модуля InductedFitDocking [104], в качестве рецептора нами были выбраны, как уже упоминалось ранее, комплексы CRBN-IKZF1 6H0F и 8D80. Нативные лиганды также подвергались процедуре IFD. Был выбран протокол с

использованием функции Glide XP GScore в качестве средства оценки поз связывания при расчете IFDScore.

Обобщенно рабочий процесс индуцированной стыковки представлен на рисунке 22. До запуска докинга опционально может быть выполнена минимизация структуры рецептора.

Первоначально боковые цепи некоторых аминокислот на расстоянии до 5 Å от центра сайта удаляются (*англ.* Trimming sidechain), после чего осуществляется начальный докинг лиганда с использованием смягченного потенциала (параметр масштабирования Ван-дер-Ваальсовых радиусов) с сохранением до 80 поз; процесс предсказания геометрии боковых цепей Prime [105] восстанавливает и уточняет структуру белка с учетом состыкованного лиганда, после чего позы сортируются согласно энергиям Prime и отбирается 20 лучших, для которых выполняется повторная стыковка Glide с расчетом значения IFD Score, являющегося суммой оценки второго докинга Glide и 5% свободной энергии Prime, определенной на этапе уточнения [56].

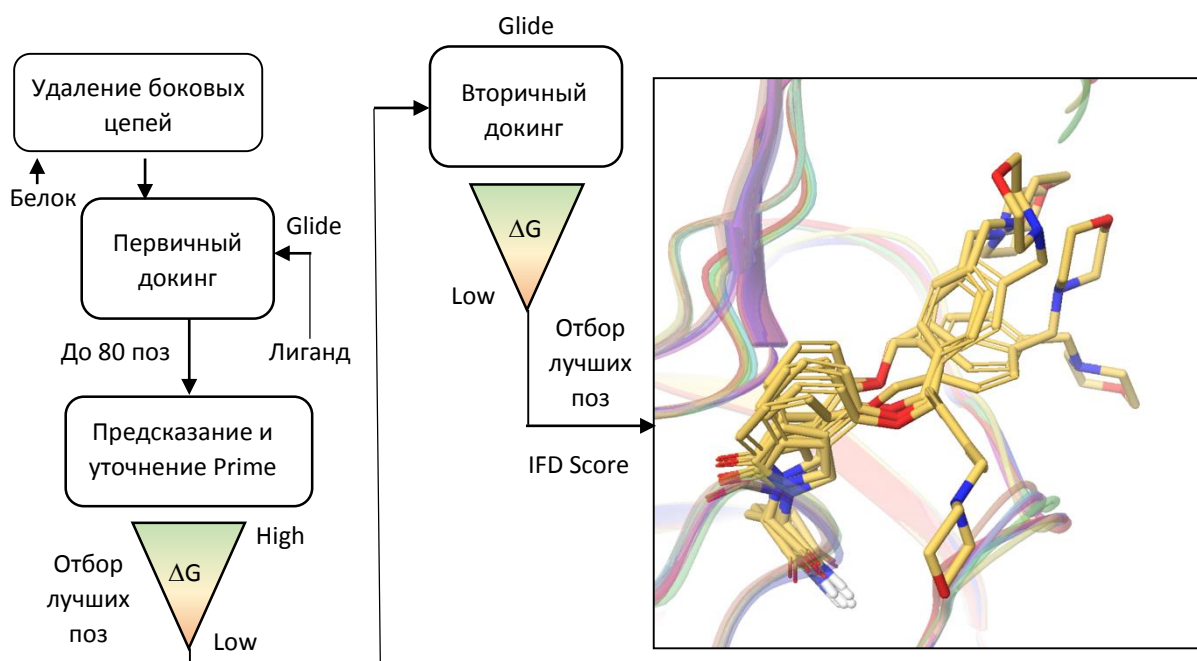


Рисунок 22 – Рабочий процесс Schrodinger IFD

2.3.1 Результаты индуцированной стыковки в комплекс 6H0F

Результаты индуцированной стыковки в комплекс CRBN-IKZF1 6H0F, представлены в таблице ниже (Таблица 2). Таблица А.1 в приложении А содержит информацию о каждой позе для каждого соединения коллекции (Таблица А.1). Таблица 2 содержит данные только для лучших по значению IFD Score поз.

Таблица 6 – Результаты IFD для комплекса 6H0F

Номер соединения	Число поз		Параметры лучшей позы	
			IFD Score, ккал/моль	XP GScore, ккал/моль
L1-SSS-060	15	-852.48	-9.612	
L1-SSS-064	13	-852.47	-9.916	
L1-SSS-061	18	-852.34	-9.115	
L1-SSS-039	17	-852.07	-9.985	
L1-SSS-043	14	-852.03	-9.626	
L1-SSS-008	18	-851.89	-9.477	
L1-SSS-037	14	-851.23	-9.372	
L1-SSS-007	14	-850.47	-9.224	
L1-SSS-051	13	-849.33	-8.108	
L1-SSS-009	16	-849.20	-9.638	
L1-SSS-057	11	-848.65	-10.170	
L1-SSS-065	15	-848.44	-9.706	
L1-SSS-001	8	-848.38	-9.712	
L1-SSS-029	15	-848.21	-9.594	
L1-SSS-047	18	-848.16	-10.161	
L1-SSS-021	16	-848.12	-10.344	
L1-SSS-027	15	-847.90	-9.670	
L1-SSS-025	15	-847.87	-9.863	
L1-SSS-058	20	-847.81	-10.626	
L1-SSS-049	12	-847.74	-10.535	
L1-SSS-034	18	-847.73	-9.774	
L1-SSS-053	17	-847.67	-9.673	
L2-DVD-000881	3	-847.67	-9.088	

Продолжение таблицы 6

L1-SSS-024	15	-847.55	-9.805
L1-SSS-054	14	-847.40	-9.648
L1-SSS-020	15	-847.35	-10.427
L1-SSS-050	18	-847.31	-9.838
L1-SSS-063	18	-847.29	-11.496
L1-SSS-030	6	-847.27	-9.216
L2-DVD-000877	6	-847.27	-9.216
помалидомид	4	-847.23	-9.778
L1-SSS-045	15	-847.13	-10.830
L1-SSS-017	15	-847.03	-10.299
L2-DVD-000888	2	-846.96	-10.427
L1-SSS-003	14	-846.91	-10.298
L2-DVD-000883	7	-846.79	-8.175
L1-SSS-015	14	-846.79	-10.066
L1-SSS-046	18	-846.77	-10.753
L2-145	13	-846.77	-9.125
L2-118	12	-846.75	-9.714
L1-SSS-035	9	-846.68	-9.182
L1-SSS-028	8	-846.62	-11.071
L2-DVD-000885	14	-846.61	-8.750
L1-SSS-004	14	-846.60	-9.720
L1-SSS-019	14	-846.49	-9.941
L1-SSS-011	11	-846.46	-9.914
L1-SSS-016	16	-846.44	-9.552
L1-SSS-052	17	-846.38	-8.904
L1-SSS-026	15	-846.30	-9.970
L1-SSS-018	9	-846.28	-9.844
L2-086	2	-846.24	-8.547
L1-SSS-067	17	-846.23	-10.368
L1-SSS-002	16	-846.14	-9.723
L2-DVD-000882	5	-846.12	-8.146
L1-SSS-012	18	-846.08	-10.391
L1-SSS-006	8	-846.07	-8.898
L1-SSS-005	13	-845.97	-9.683

Продолжение таблицы 6

L2-DVD-000887	10	-845.95	-8.677
L1-SSS-010	18	-845.93	-8.859
L1-SSS-022	18	-845.71	-9.852
L1-SSS-033	11	-845.67	-8.873
L1-SSS-014	15	-845.66	-9.750
L2-DVD-000894	10	-845.49	-8.802
L2-147	16	-845.31	-8.540
L2-DVD-000886	5	-845.25	-9.088
L2-DVD-000891	10	-845.25	-9.700
L2-115	8	-845.17	-10.475
L2-DVD-000880	5	-845.07	-7.960
L1-SSS-048	14	-844.91	-9.758
L2-DVD-000879	17	-844.90	-8.980
L1-SSS-055	12	-844.72	-8.503
L2-DVD-000893	14	-844.70	-9.375
L2-DVD-000874	11	-844.68	-8.278
L2-DVD-000884	14	-844.65	-7.131
L2-DVD-000892	13	-844.63	-9.010
L2-144	7	-844.38	-8.370
L2-DVD-000875	9	-844.20	-7.030
L1-SSS-066	12	-843.98	-8.758
L2-DVD-000878	12	-843.94	-6.983
L2-DVD-000896	15	-843.85	-8.159
L2-DVD-000876	14	-843.71	-7.311
L1-SSS-056	8	-842.82	-5.625
L2-DVD-000889	17	-842.57	-7.014
L2-DVD-000890	17	-842.33	-7.518
L3-ZJB-9	1	-841.56	-6.734
L3-ZJB-12	1	-840.91	6.489
L3-ZJB-8	2	-840.83	-6.431

При сортировке результатов стыковки по значению IFD Score, можно увидеть, что внушительная часть лигандов ранжируется выше помалидомида. Не все из них демонстрируют GScore лучше нативного,

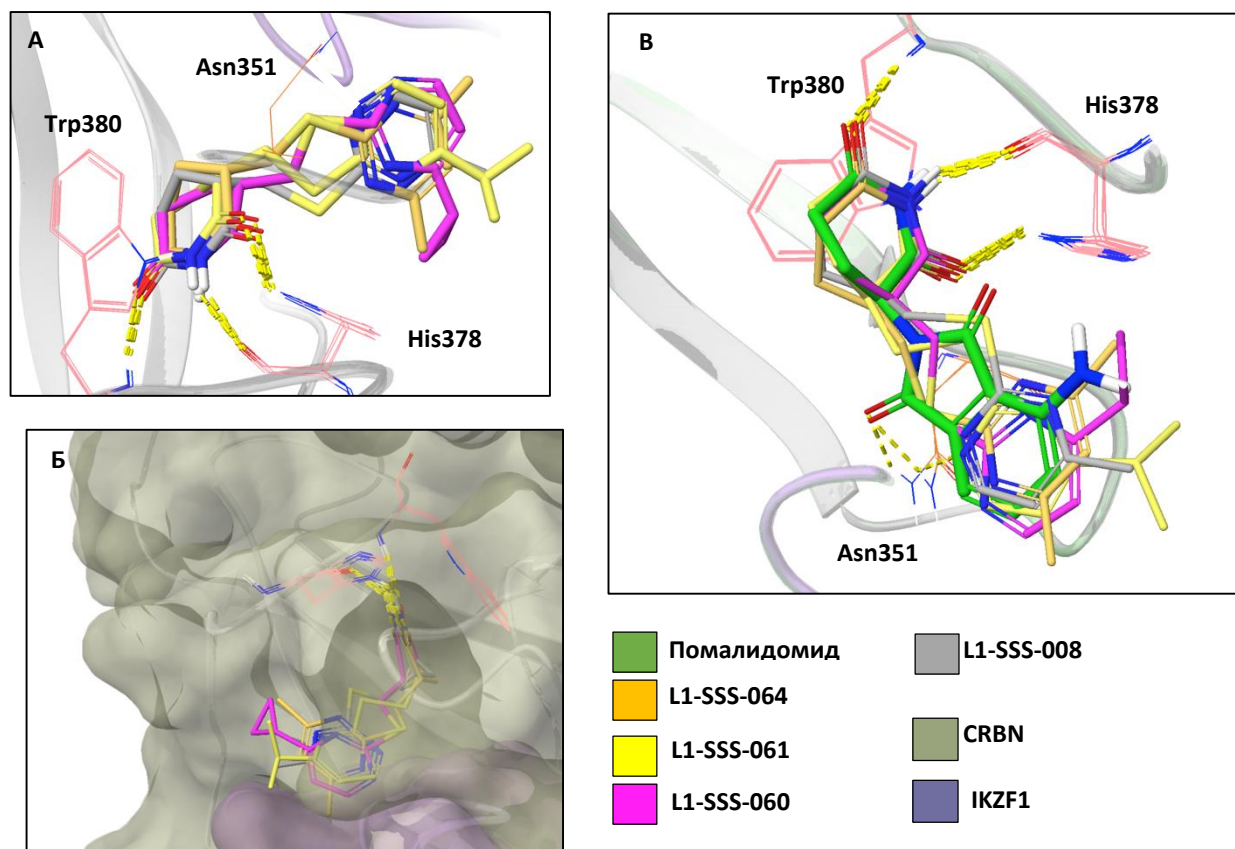
однако, тем не менее, соединения, имеющие худшую оценку (диапазон XP GScore от -5 до -7 ккал/моль) занимают позиции в нижней части списка (таблица 6).

Среди соединений, позы для которых были найдены алгоритмом Glide при первичном докинге, большую часть составляют представители библиотеки L1 (кроме обсуждаемых ниже особенностей режимов связывания причиной этому может быть самый большой размер библиотеки – 62 структуры): 56 лигандов; для L2 – 28 из 48, для L3 – всего 3 из 19 соединений.

Верхние строчки занимают соединения, содержащие с одной стороны метилсульфидный/сульфоновый мотив, с другой стороны – гетероциклы (пиримидин или пиридин) в качестве ароматического фрагмента. В лучших позах всегда сохраняется схожий режим ориентации в активном сайте. Наложение структур лигандов на рисунке ниже и помалидомида показывает, что положение как глутаримидного кольца, так и ароматического фрагмента сохраняется (рисунок 23). Кроме того, можно обратить внимание, что и геометрия белка в ходе процедуры IFD изменилась незначительно. Ни одному из представленных ниже сульфидов не удастся образовать водородную связь с остатком Asn351, что отражается на значении дескриптора XP PhobEn, кодирующего вклад этого типа взаимодействий в общее значение скоринга. Продолжая говорить о дескрипторах XP, нельзя не отметить парную водородную связь с остатком His378 (дескриптор XP PhobEnPairHB), образованную в глубине сайта. Все структуры, включая нативный помалидомид, также штрафуются алгоритмом оценки за ориентацию неполярных радикалов гетероцикла напротив полярных остатков IKZF1 (штраф XP Penalties) (рисунок 23).

Лиганды по прежнему не образуют взаимодействий с остатками фактора транскрипции; столь низкие значения IFD Score можно объяснить стабилизацией белок-белковых взаимодействий за счет возникновения новой водородной связи: Arg373(CRBN)-Gly141(IKZF1). Кроме того,

увеличивается показатель средней комплиментарности поверхностей и экранирования SASA остатков (таблица 7).



А, Б – наложение структур соединений L1-SSS-008, -060, -061 и -064 в связывающих конформациях в сайте, образованном IKZF1-CRBN; В - наложение структур соединений L1-SSS-008, -060, -061, -064 и помалидомида в связывающих конформациях в сайте, образованном IKZF1-CRBN.

Рисунок 23 – Режимы связывания соединений L1-SSS-008, -060, -061 и -064 в сайте, образованном IKZF1-CRBN; желтый пунктир – водородная связь

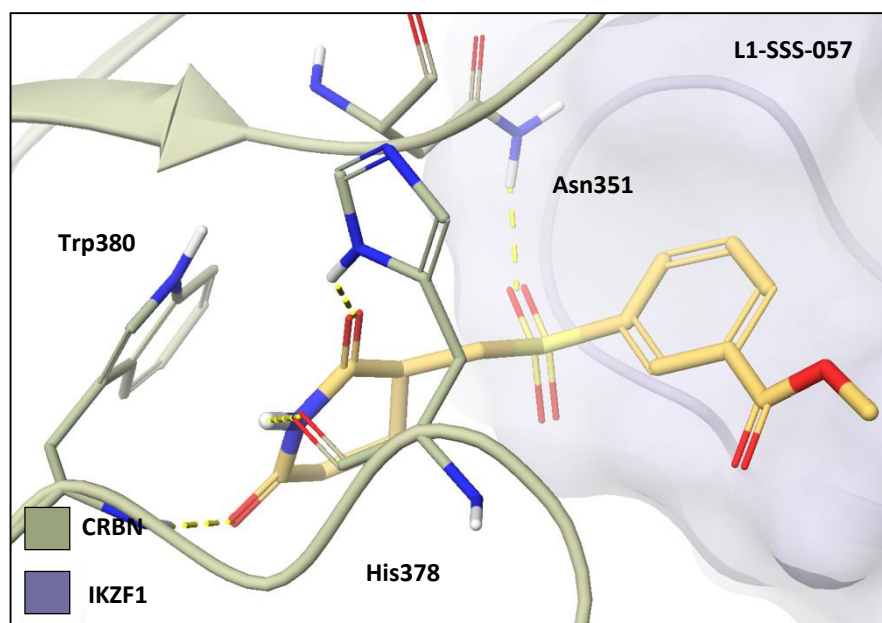
Таблица 7 - Количественное описание интерфейса взаимодействия CRBN-IKZF1 (6H0F) по результатам IFD

Код соединения	IFD Score, ккал/моль	Средняя комплементарность поверхности	Среднее значение CRBN Buried SASA, %	Среднее значение IKZF1 Buried SASA, %
L1-SSS-060	-852.48	85.23	69.010	70.43
L1-SSS-064	-852.47	85.20	66.21	67.15

Продолжение таблицы 7

L1-SSS-061	-852.34	85.19	68.83	67.30
Помалидомид	-847.23	75.39	61.81	64.016

Среди сульфоновых лигандов, ранжируемых выше помалидомида, также часто встречаются пиридин/пиримидин содержащие производные. Важным отличием от сульфидов является образование водородной связи между Asn351 и карбонилем SO₂-группы – факт наличия такого дополнительного взаимодействия находит свое отражение в значении дескриптора XP HBond. Как сульфоновые, так и сульфидные соединения, содержащие этилбензоатную группировку в качестве ароматического фрагмента оказываются лучше помалидомида как по значению IFD Score, так и XP GScore – L1-SSS_057 - один из таких примеров (рисунок 24):



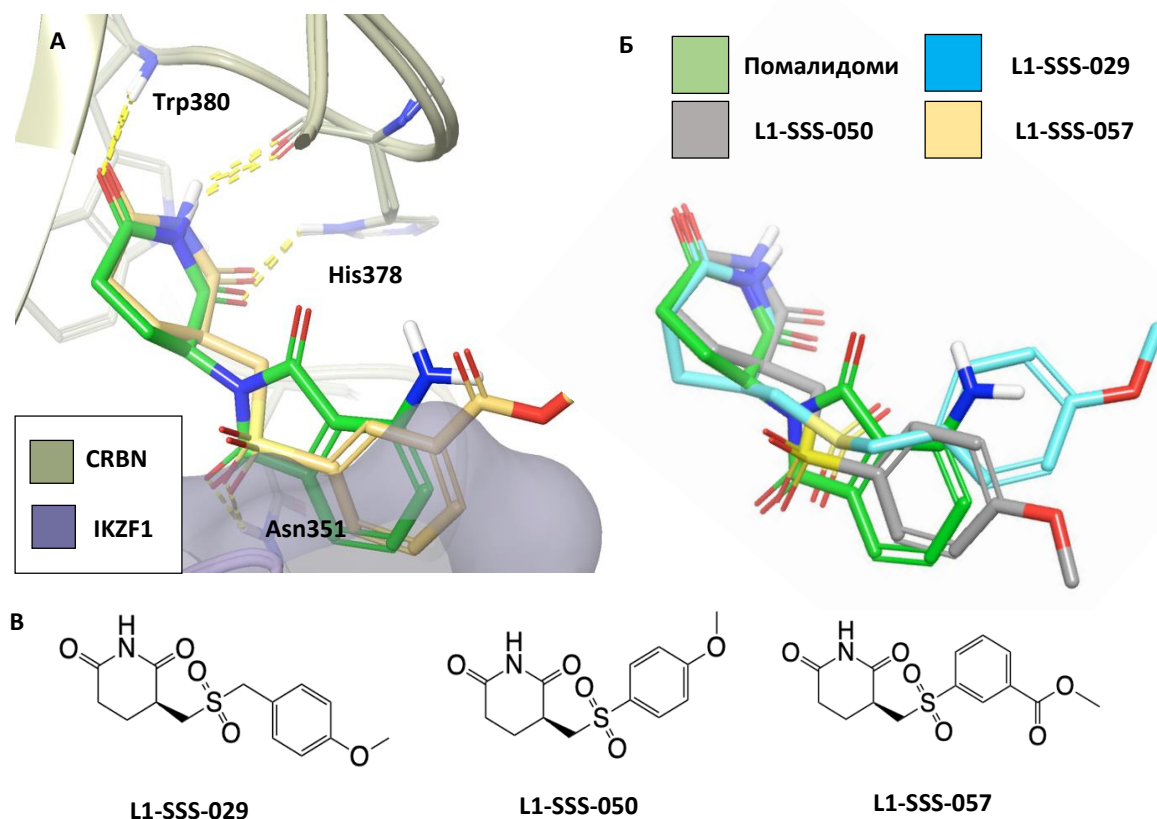
XP GScore = -10.17 ккал/моль

IFD Score = -848.65 ккал/моль

Рисунок 24 – Режим связывания соединения L1-SSS-057 в сайте, образованном IKZF1-CRBN; желтый пунктир – водородные связи

Уже на данном этапе анализа результатов можно сказать, что лиганды, содержащие сульфо-группу, вероятно, будут активнее сульфидов,

т.к. первым удастся полностью воспроизвести режим связывания помалидомида (что отлично видно на примере описанного выше L1-SSS-057). На рисунке 25 представлено еще несколько соединений, показывающих сходную с нативным лигандом геометрию: L1-SSS-029 (XP GScore = -9.59 ккал/моль, IFD Score = -848.21 ккал/моль) и L1-SSS-050 (XP GScore = -9.84 ккал/моль, IFD Score = -847.31 ккал/моль) (рисунок 25).

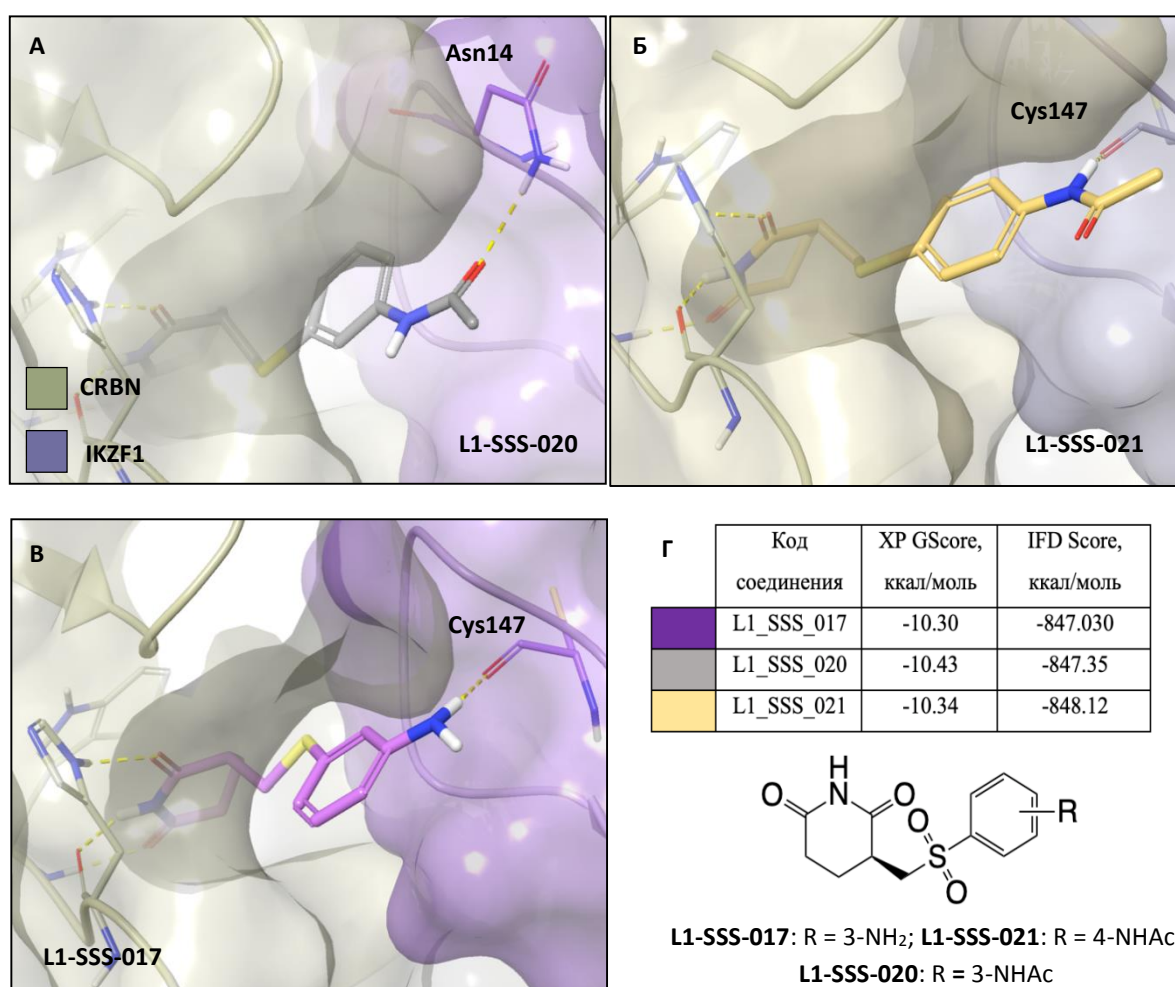


А – Наложение L1-SSS-057 и помалидомида в сайте, образованном IKZF1-CRBN;
 Б – наложение L1-SSS-050 и L1-SSS-029 с помалидомидом в связывающих конформациях; В – химические структуры описанных соединений.

Рисунок 25 – Наложения сульфоновых лигандов L1 и помалидомида в связывающих конформациях

Среди библиотеки L1 интересные режимы связывания демонстрируют соединения, содержащие амино- или ацетамидную группу в ароматическом ядре – L1-SSS-020 (XP GScore = -10.43 ккал/моль, IFD Score = -847.35 ккал/моль), L1-SSS-021 (XP GScore = -10.34 ккал/моль, IFD Score = -848.12 ккал/моль) и L1-SSS-017 (XP GScore = -10.30 ккал/моль, IFD Score = -

847.03 ккал/моль). Все они, как можно увидеть, имеют высочайшие значения скоринга XP, однако только L1-SSS-021 ранжируется выше помалидомида в рейтинге IFD Score. Примечательно то, что данные лиганды демонстрируют наличие дополнительных взаимодействий с остатками IKZF1 за счет заместителей в фенольном кольце. Ацетамидная группа L1-SSS-021 в пара положении образует водородную связь с Cys147 (IKZF1), с которым также связывается аминный протон L1_SSS_017, а L1-SSS-020 (за счет того же ацетамида, но в мета положении) с Asn148(IKZF1) (рисунок 26).



А – связывание соединения L1-SSS-020 в сайте, образованном CRBN-IKZF1; Б – связывание соединения L1-SSS-021 в сайте, образованном CRBN-IKZF1; В – связывание соединения L1-SSS-017 в сайте, образованном CRBN-IKZF1; Г – значения скоринга указанных соединений и их структуры

Рисунок 26 – режимы связывания соединений L1-SSS -020, -021 и -017 в сайте, образованном CRBN-IKZF1; желтый пунктир – водородная связь

Среди библиотеки L2 выше всех ранжируются сульфид/сульфонамид содержащие лиганды (L2-DVD-000887, L2-DVD-000881, L2-DVD-000885), режимы их связывания не сильно отличаются от описанных выше.

Другие же представители второй библиотеки – изооксазол содержащие спироциклы явно требуют дальнейшего обсуждения. Все они занимают строчки в рейтинге IFD ниже помалидомида, однако L2-118 и L2-145 показывают сопоставимые значения XP GScore. Эти структуры демонстрируют образование связи с Asn351, но не His378 (рисунок 27).

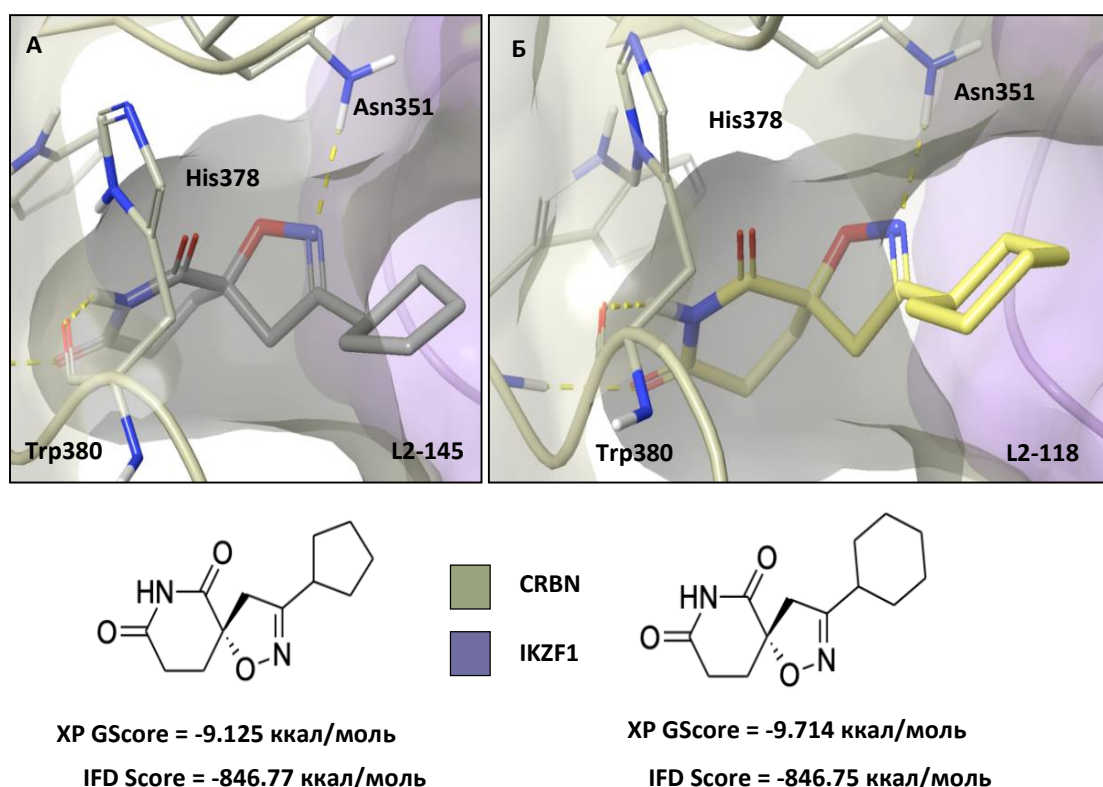
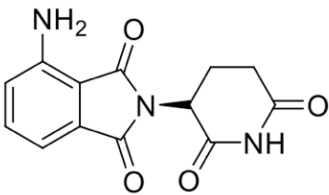
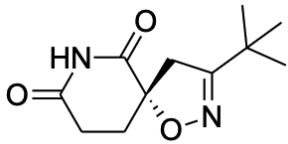
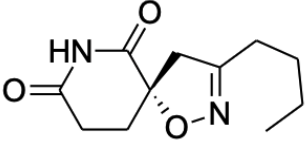
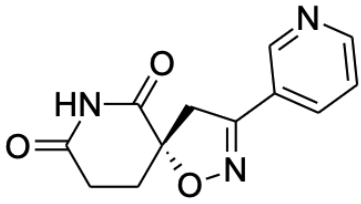


Рисунок 27 – Связывание представителей изооксазол содержащих спироциклических лигандов L2-118 и L2-145 в сайте, образованном IKZF1-CRBN; желтый пунктир – водородная связь

Еще один подобный лиганд – L2-115, структура которого включает нафталин, отличается отличным XP GScore = -10.475 ккал/моль, но IFD Score > 845 ккал/моль оставляет желать лучшего. Остальные представители спироциклической группы L2, содержащие алифатические ациклические или гетероциклические заместители в изооксазольном ядре, занимают

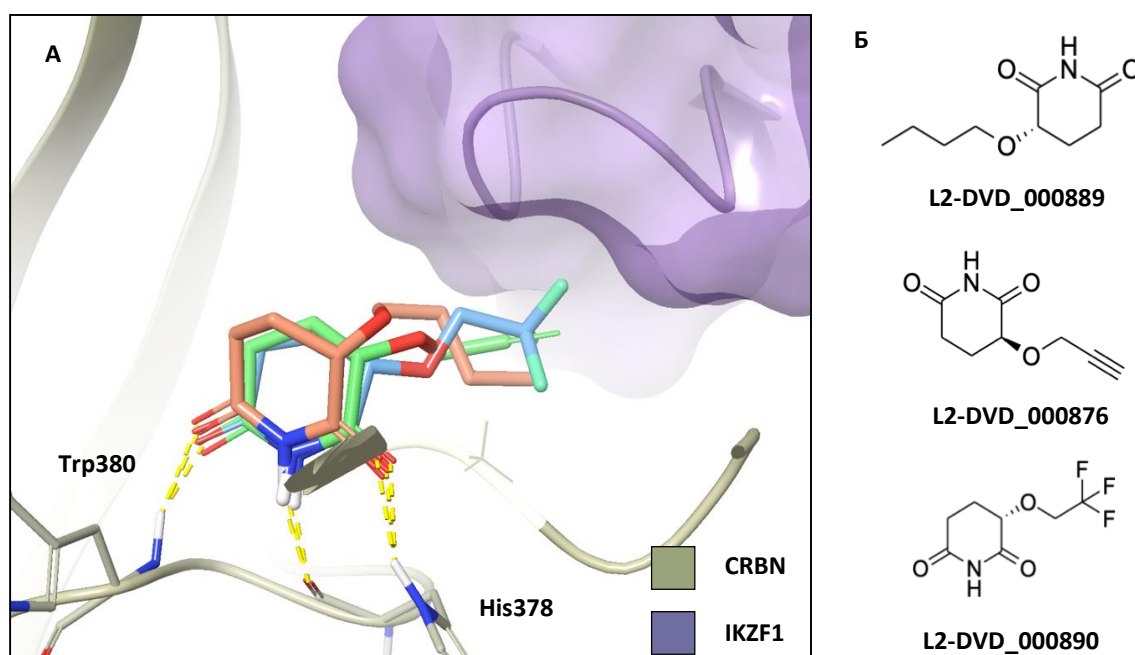
самые низкие строчки рейтинга (Таблица 8), постепенно теряя вклады водородных связей (XP HBond) и липофильной составляющей (XP LipophilicEvdW (XP LipEvdW) в энергию связывания – примеры таких соединений – L2-144, L2-147, L2-086 (таблица 8).

Таблица 8 – Комплексы занимающие низшие позиции по результатам IFD

Структура	Код соединения	XP GScore, ккал/моль	IFD Score, ккал/моль	XP HBond, ккал/моль	XP LipEvdW, ккал/моль
		-9.778	-847.23	-1.831	-4.874
	L2-144	-8.370	-844.38	-1.211	-3.925
	L2-147	-8.540	-845.31	-1.104	-4.133
	L2-086	-8.547	-846.24	-1.782	-4.643

Ну и наконец, завершая обсуждения результатов IF-стыковки в комплекс помалидомида бНОФ, отметим, что аутсайдерами являются все представители L3, а также те соединения, которые не содержат ароматических фрагментов, способных оккупировать полость, образованную взаимодействующими белками. Примерами таких

соединений, являются L2-DVD_000876, L2-DVD_000889, L2-DVD_000890 (рисунок 28).



В

Код соединения	XP GScore, ккал/моль	IFD Score, ккал/моль
L2_DVD_000890	-7.518	-842.33
L2_DVD_000876	-7.311	-842.57
L2_DVD_000889	-7.014	-843.71

А, Б, В – режимы связывания некоторых соединений-аутсайдеров в сайте IKZF1-CRBN, их структуры и значения скоринга, соответственно

Рисунок 28 – Связывание некоторых соединений-аутсайдеров в сайте IKZF1-CRBN; желтый пунктир – водородные связи

2.2.1 Результаты индуцированной стыковки в комплекс 8D80

Как уже говорилось ранее, нами также была проведена индуцированная стыковка в комплекс, содержащий ибердомид 8D80. В таблице 9 приведены значения скоринга только для лучших поз каждого из соединений (значения для всех поз – Приложение А, таблица А.2).

Таблица 9 – Результаты IFD для комплекса 8D80

Номер соединения	Число поз	Параметры лучшей позы	
		IFD Score, ккал/моль	XP GScore, ккал/моль
L1-SSS-060	11	-8.761	-821.01
L1-SSS-061	4	-8.152	-820.34
L1-SSS-008	11	-8.101	-818.04
L1-SSS-039	5	-9.299	-818.63
L1-SSS-043	2	-8.020	-818.46
L1-SSS-064	1	-8.217	-817.84
L1-SSS-007	5	-7.812	-817.79
L1-SSS-049	4	-9.904	-817.17
Ибердомид	5	-9.252	-817.13
L1-SSS-035	5	-9.249	-816.72
L1-SSS-037	1	-7.362	-816.87
L1-SSS-047	13	-8.969	-816.84
L1-SSS-034	15	-9.343	-816.69
L1-SSS-057	4	-9.156	-816.68
L1-SSS-050	8	-9.266	-816.57
L1-SSS-021	14	-9.036	-816.23
L1-SSS-020	12	-8.924	-816.47
L1-SSS-058	12	-9.273	-816.43
L1-SSS-051	3	-7.896	-816.41
L1-SSS-033	13	-9.736	-816.20
L1-SSS-046	12	-8.917	-816.14
L1-SSS-029	10	-8.846	-816.06
L1-SSS-052	16	-8.880	-816.06
L2-DVD-000893	11	-9.557	-816.06
L1-SSS-063	14	-9.212	-815.81
L1-SSS-028	19	-9.403	-815.22
L1-SSS-065	17	-7.867	-815.43
L1-SSS-009	15	-7.946	-815.19

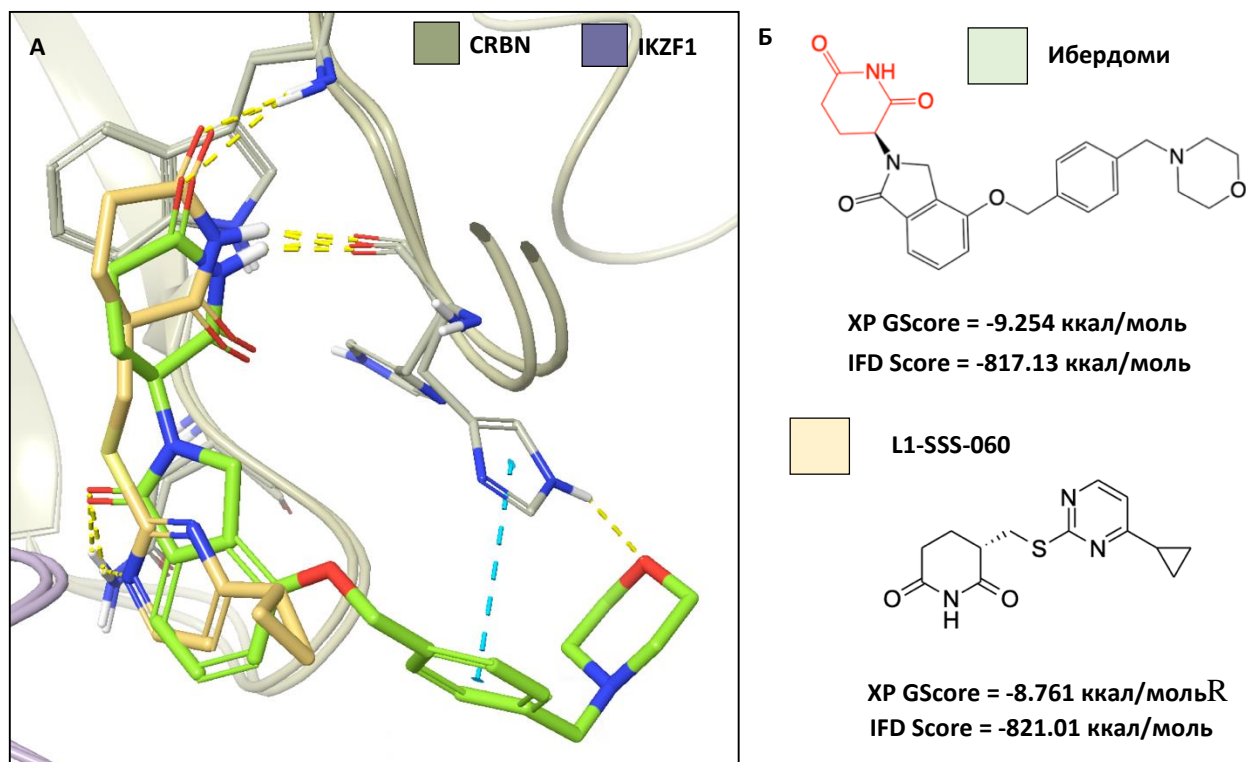
Продолжение таблицы 9

L1-SSS-048	12	-10.046	-814.78
L1-SSS-045	14	-8.572	-815.17
L1-SSS-027	10	-8.708	-814.57
L1-SSS-054	11	-9.044	-815.11
L1-SSS-053	7	-8.626	-815.08
L1-SSS-067	16	-8.808	-814.95
L1-SSS-017	16	-9.646	-814.96
L1-SSS-022	7	-8.899	-814.94
L1-SSS-018	11	-8.875	-814.87
L1-SSS-012	13	-9.366	-814.91
L1-SSS-024	9	-8.896	-814.87
L2-DVD-000885	11	-8.100	-814.67
L1-SSS-011	9	-8.870	-814.57
L1-SSS-006	8	-9.492	-814.55
L1-SSS-026	13	-8.628	-814.31
L1-SSS-003	14	-8.593	-813.94
L1-SSS-016	12	-8.881	-814.01
L1-SSS-066	6	-8.465	-813.84
L1-SSS-015	9	-8.323	-813.59
L1-SSS-014	14	-8.241	-813.24
L1-SSS-004	13	-8.058	-813.58
L1-SSS-030	12	-8.258	-813.55
L2-DVD-000877	12	-8.258	-813.55
L2-115	1	-9.712	-813.33
L1-SSS-002	11	-8.805	-813.00
L1-SSS-001	9	-8.245	-812.76
L2-118	3	-9.577	-812.87
L1-SSS-005	15	-8.385	-811.96
L1-SSS-013	11	-8.219	-812.72
L2-DVD-000892	12	-7.364	-811.90
L1-SSS-055	9	-7.902	-812.06
L2-DVD-000888	1	-7.687	-812.05
L2-DVD-000879	18	-6.966	-811.98
L2-DVD-000891	7	-7.904	-811.89

Продолжение таблицы 9

L2-DVD-000881	7	-7.565	-811.30
L2-DVD-000874	7	-6.854	-810.64
L2-DVD-000884	11	-7.151	-810.64
L2-145	4	-8.082	-810.60
L2-DVD-000894	3	-7.482	-810.41
L1-SSS-010	12	-7.002	-810.11
L2-147	2	-7.739	-810.33
L2-DVD-000880	10	-6.858	-809.92
L3-ZJB-8	1	-7.162	-809.78
L2-DVD-000889	19	-5.737	-809.76
L2-DVD-000883	3	-6.165	-809.61
L2-DVD-000876	12	-5.200	-809.32
L2-DVD-000887	9	-6.357	-807.95
L2-DVD-000882	3	-6.405	-808.44
L2-DVD-000890	11	-6.120	-807.32
L1-SSS-056	1	-5.491	-806.89
L2-DVD-000895	1	-5.673	-805.75
L2-DVD-000875	3	-5.556	-801.71
L2-DVD-000878	2	-5.537	-800.76

При ранжировании результатов по значению IFD Score складывается впечатление, что распределение лигандов соответствует таковому для комплекса бНОF, особенно среди лидеров. Все также верхние строчки списка занимают сульфид/сульфон содержащие лиганды из библиотеки L1. Роль пиримидиновых заместителей здесь раскрывается лучше, чем в предыдущей кристаллической структуре. Ряду соединений удается воспроизвести режим связывания нативного ибердомида в области глутаримида, а атомы азота гетероцикла служат акцепторами водородной связи с аминными протонами Asn351 (рисунок 29).

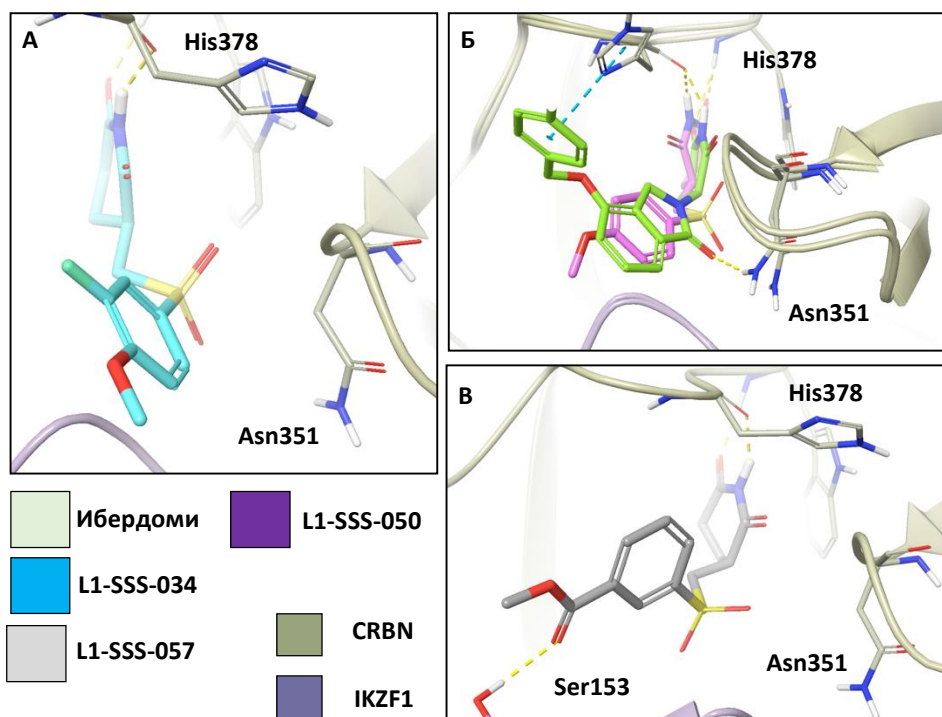


А, Б – наложение L1-SSS-060 и ибердомида в сайте IKZF1-CRBN (8D80), их структуры и значения скоринга, соответственно.

Рисунок 29 – связывание соединения L1-SSS-060 в сайте IKZF1-CRBN (8D80); желтый пунктир – водородная связь, голубой пунктир – π -стэкинг

Разумеется, размер таких лигандов не позволяет им воспроизвести геометрию бензилморфолинового фрагмента ибердомида, подобно ему же, парного взаимодействия с остатком His378 не реализуется, что в целом объясняет довольно скромные значения Glide XP GScore (нулевые вклады дескрипторов коррелированных взаимодействий – XP (PhobEnPairHB)). Остальные представители сульфидной группы L1 показывают схожие режимы стыковки.

Сульфосодержащие глутаримиды показывают в сайте 8D80 гораздо худший результат. Геометрия кармана связывания в купе с ориентацией самих лигандов исключают возможность образования водородной связи с остатком Asn351, что сказывается на значении их скоринга (рисунок 30).



А, В – Режимы связывания L1-SSS-034 и L1-SSS-057 в сайте, образованном IKZF1-CRBN, соответственно; Б – наложение L1-SSS-050 и ибердомида в сайте, образованном IKZF1-CRBN

Рисунок 30 – Режимы связывания некоторых сульфоновых лигандов в сайте, образованном IKZF1-CRBN (8D80); желтый пунктир – водородная связь, голубой пунктир – π -стэкинг

На рисунке выше представлены такие соединения: L1-SSS-034 (XP GScore = -9.343 ккал/моль, IFD Score = -816.69 ккал/моль), L1-SSS-057 (XP GScore = -9.156 ккал/моль, IFD Score = -816.68 ккал/моль) - в случае которого ситуация несколько исправляется за счет наличия связи между бензоатным фрагментом и Ser153(IKZF1) и L1-SSS-050 (XP GScore = -9.266 ккал/моль, IFD Score = -816.57 ккал/моль), представленный в наложении с ибердомидом.

Отрадно, что другие сульфон-содержащие лиганды все-таки образуют искомую связь с остатком Asn351 – как, например L1-SSS-037 (XP GScore = -7.362 ккал/моль, IFD Score = -816.87 ккал/моль) (рисунок 31).

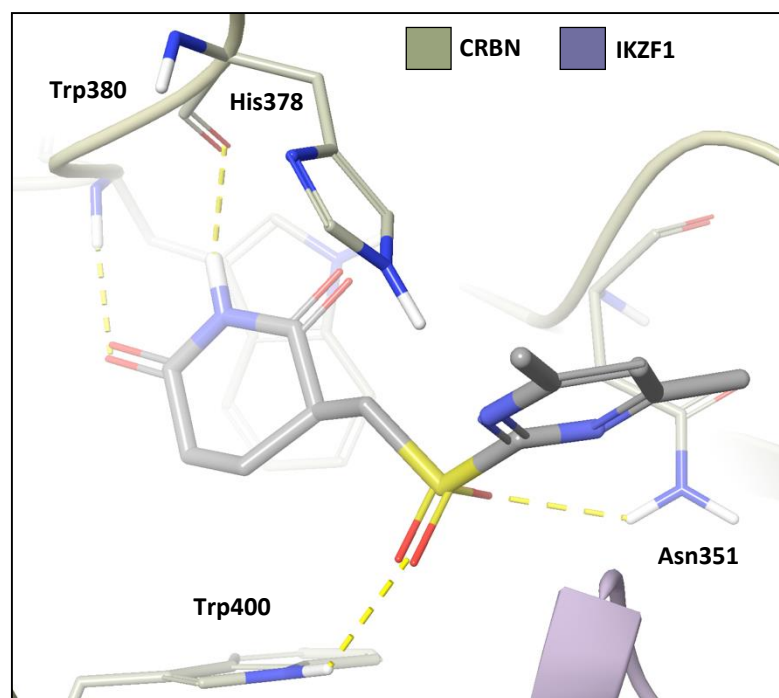


Рисунок 31 – Режим связывания соединения L1-SSS-037 в сайте, образованном IKZF1-CRBN (8D80)

Как можно заметить, представленный выше лиганд также взаимодействует с остатком Trp400. Целый ряд сульфонов воспроизводит похожий режим: L1-SSS-035, L1-SSS-043, L1-SSS-49.

Ранжирование по значению XP GScore было проведено нами для идентификации тех лигандов, которые могут потенциально быть более аффинными, чем нативный ибердомид (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты IFD для комплекса 8D80

Код соединения	Параметры лучшей позы	
	XP GScore, ккал/моль	IFD Score, ккал/моль
L1-SSS-049	-10.046	-814.78
L1-SSS-048	-9.904	-817.17
L2-DVD-000876	-9.736	-816.20
L1-SSS-056	-9.712	-813.33

Продолжение таблицы 10

L2-DVD-000878	-9.646	-814.96
L2-DVD-000875	-9.577	-812.87
L2-DVD-000889	-9.557	-816.06
L2-DVD-000890	-9.492	-814.55
L2-DVD-000883	-9.403	-815.22
L2-DVD-000887	-9.366	-814.91
L2-DVD-000882	-9.343	-816.69
L2-DVD-000895	-9.299	-818.63
L2-DVD-000874	-9.273	-816.43
L2-DVD-000880	-9.266	-816.57
Ибердомид	-9.254	-817.13
L2-DVD-000879	-9.249	-816.72
L1-SSS-010	-9.212	-815.81
L2-DVD-000884	-9.156	-816.68

Можно обратить внимание, что соединения библиотеки L2 показывают себя в качестве лидеров при таком режиме сортировки. Однако все они представляют собой абсолютно небольшие фрагментные молекулы, никаким образом не воспроизводящие мотивы связывания нативного лиганда нигде, кроме района связывания глутаримида (рисунок 32).

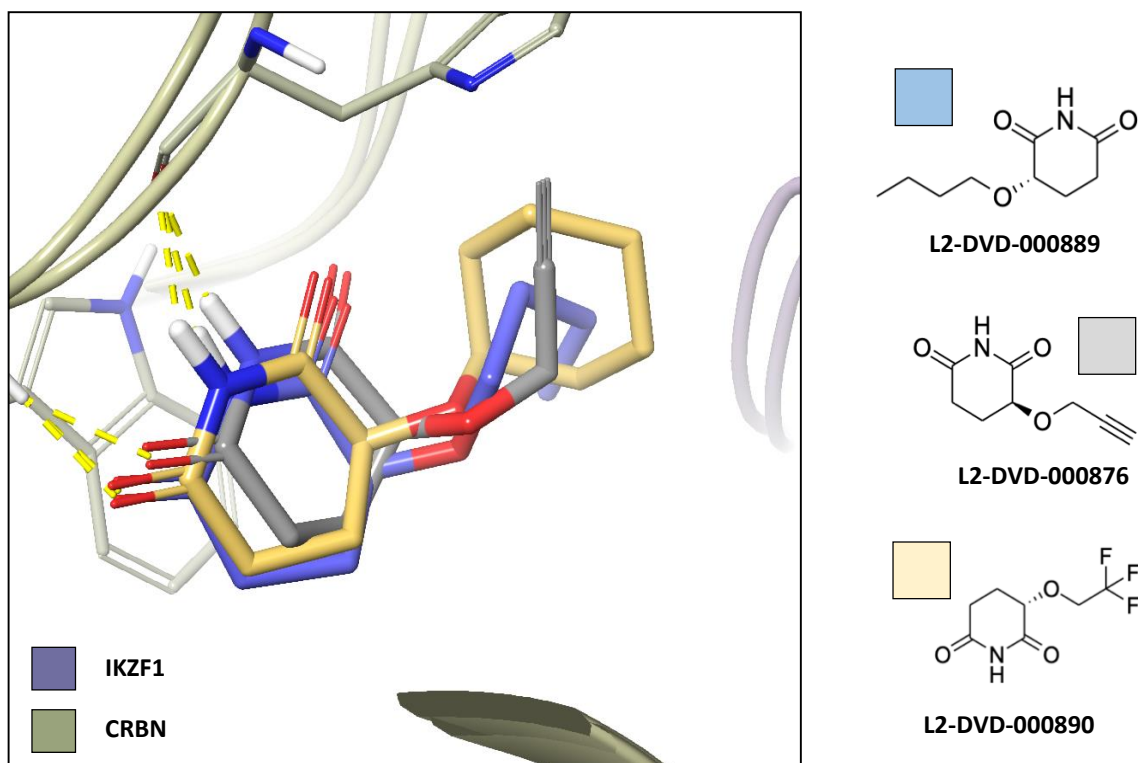


Рисунок 32 – режимы связывания некоторых лигандов из библиотеки L2 в сайте, образованном IKZF1-CRBN; желтый пунктир – водородные связи

2.3.2 Идентификация хитов и их *in vitro* исследование

При идентификации хитов мы старались отбирать структуры, соответствующие следующим критериям, указанным по убыванию их важности:

- воспроизведение режима связывания нативного лиганда (больше актуально для комплекса 6H0F);
- значения XP GScore лучше нативного лиганда при лучших или сопоставимых значениях скоринга IFD ($\pm 1-1.5$ ккал/моль);
- желательно, но не обязательно схожее позиционирование лигандов в рейтинге при ранжировании по IFD Score в обоих комплексах.

Таким образом, преимущественно нами были отобраны различные сульфоны и сульфиды из библиотеки L1, так как они в основном занимают верхние строчки рейтинга в результатах IFD для обоих комплексов. Демонстрируемые довольно низкие значения XP GScore могут указывать

на хорошую аффинность к лигазе CRBN, однако об активности молекулярного клея правильнее было бы судить по степени сходства режимов связывания с режимом нативного лиганда. Исходя из последнего, предпочтения были отданы структурам, содержащим сульфо-группу, так им удается гораздо более выгодно занять сайт связывания, образованный CRBN-IKZF1 и, в отличие от сульфидов, образовать взаимодействие с остатком Asn351, подобно помалидомиду (6H0F) или компенсировать отсутствие этого взаимодействия связью с Trp400 в комплексе 8D80, сохраняя сходную ориентацию.

Более того, индуцированная стыковка всех отобранных лигандов свидетельствует о сохранении всех межбелковых водородных связей в комплексе 6H0F и 8D80 или возникновению новых. Выбранные нами структуры представлены в таблице ниже. Для того, чтобы показать, насколько лучше или хуже ранжируется лучшая IFD-поза данного лиганда относительно нативного, нами были рассчитаны значения $relXP\ GScore$ (формула 7).

$$relXP\ GScore = \frac{XP\ GScore\ (ligand)}{XP\ GScore\ (native)}, \quad (7)$$

где $XP\ GScore\ (ligand)$ и $XP\ GScore\ (native)$ – значения оценочной функции Glide $XP\ GScore$ для текущего и нативного лиганда, соответственно, ккал/моль.

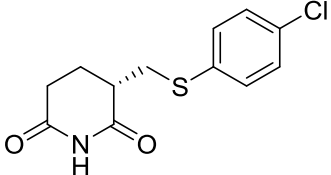
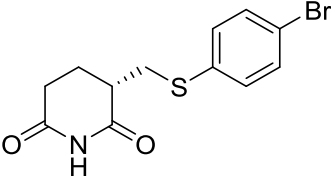
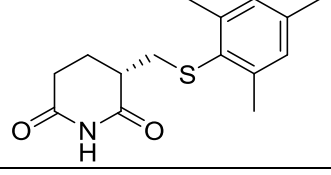
В рамках текущего проекта Центра медицинской химии по расширению химического пространства рекрутеров E3 лигазы CRBN, проводимого совместно с коллегами из Санкт-Петербургского государственного университета, Федерального балтийского университета имени Иммануила Канта и Института Макса Планка, некоторые из отобранных соединений были синтезированы, а также произведена оценка

их аффинности к данной лигазе и цитотоксического эффекта на линиях множественной миеломы человека (*англ.* Multiple Myeloma, ММ).

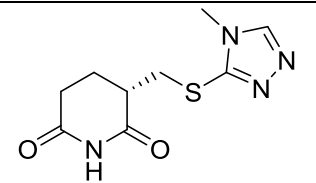
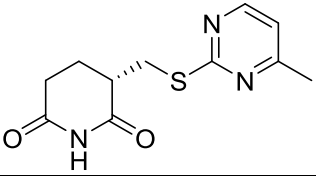
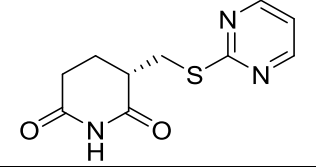
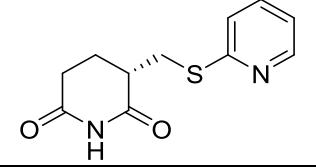
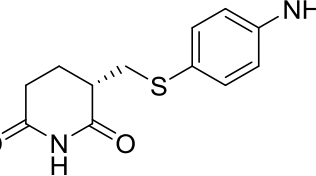
Показано, что жизнедеятельность клеток ММ сильно зависит от активности фактора транскрипции *Ikaros*. Его деградация вследствие индукции белок-белковых взаимодействий IKZF1 с E3 лигазой CRBN, вызванной связыванием последней различных IMiDs, может вызвать антипролиферативный эффект и гибель таких клеток. Оценка жизнеспособности клеток с помощью люминесцентного теста Cell TiterGlo [106] проводилась на двух линиях множественной миеломы – MOLP-8 и KMS-12 PE. Каждое соединение тестировалось в различных концентрациях, начиная с 500 мкмоль, в трех повторах. Результаты также представлены в таблице ниже (таблица 11).

Аффинность была определена путем количественной оценки конкуренции за связывание с CRBN между исследуемыми структурами и флуоресцентным лигандом методом микромасштабного термофореза (*англ.* Microscale thermophoresis) в температурном градиенте [107]. Результаты также представлены в таблице ниже (таблица 11)

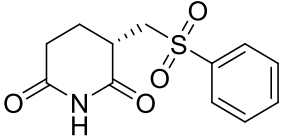
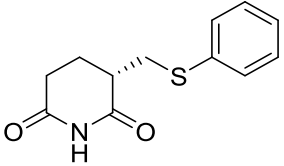
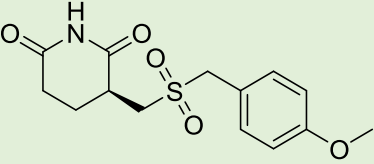
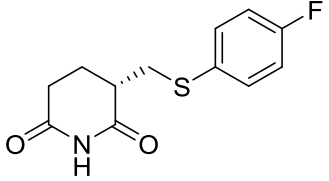
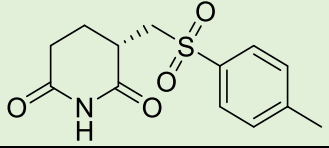
Таблица 1 – Идентифицированные хиты и результаты их *in vitro* исследований

Структура соединения	Код соединения	Результаты <i>in silico</i> расчета						Результаты <i>in vitro</i> исследования		
		6H0F		relXP GScore	8D80		relXP GScore	CRBN K _i мкмоль	IC ₅₀ , мкмоль	
		XP GScore, ккал/моль	IFD Score, ккал/моль		XP GScore, ккал/моль	IFD Score, ккал/моль			MOLP-8	KMS-12- PE
	L1-SSS-002	-9.72	-846.14	0.99	-8.81	-813.00	0.93	5.1±1.8	20.49±1.55	16.21±2.55
	L1-SSS-005	-9.68	-845.97	0.99	-8.27	-812.85	0.87	3.5±1.2	18.28±0.94	12.87±2.83
	L1-SSS-006	-8.90	-846.07	0.91	-9.49	-814.55	1.00	13.02±2.0	21.02±0.97	23.05±3.60

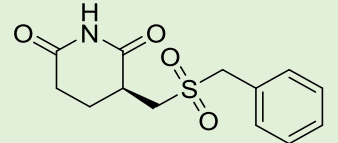
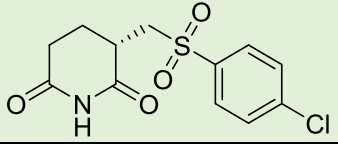
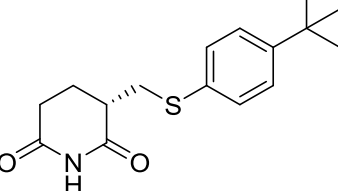
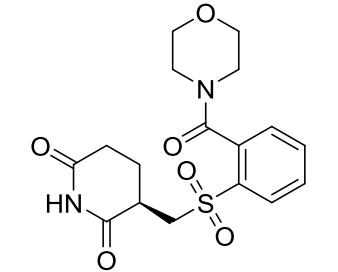
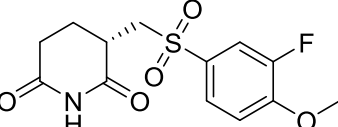
Продолжение таблицы 11

	L1-SSS-010	-8.60	-845.93	0.88	-6.74	-810.33	0.71	21.0±0.46	>100	>100
	L1-SSS-008	-9.37	-851.89	0.96	-8.06	-819.11	0.85	6.0±1.5	11.93±1.13	36.79±11.09
	L1-SSS-007	-9.22	-850.47	0.94	-7.812	-817.79	0.84	7.3±1.6	23.94±2.68	36.71±8.42
	L1-SSS-009	-9.64	-849.20	0.98	-7.946	-815.19	0.85	7.8±1.5	27.39±4.00	13.31±2.4
	L1-SSS-018	-9.84	-846.28	1.01	-8.84	-814.93	0.93	7.1±2.0	44.26±10.07	>90

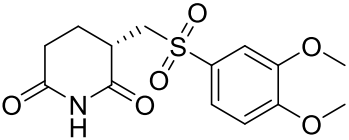
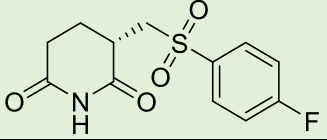
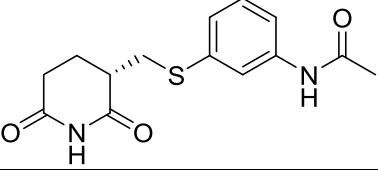
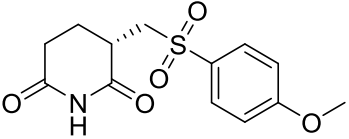
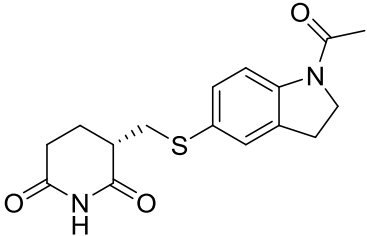
Продолжение таблицы 11

	L1-SSS-022	-9.85	-845.71	1.01	-8.90	-814.94	0.94	7.5±1.7	5.72±0.52	6.00±0.84
	L1-SSS-001	-9.71	-848.38	0.99	-8.245	-812.76	0.89	7.1±1.0	39.98±7.41	36.35±2.99
	L1-SSS-029	-9.59	-848.21	0.98	-8.846	-816.06	0.96	5.5±1.7	6.27±0.81	5.88±0.42
	L1-SSS-004	-9.72	-846.60	0.99	-8.06	-813.58	0.85	9.0±1.8	31.99±4.91	29.82±3.36
	L1-SSS-021	-10.34	-848.12	1.058	-9.036	-816.23	0.98	10.0±2.2	5.3±0.57	6.12±0.90

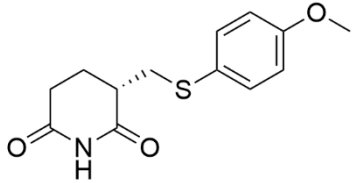
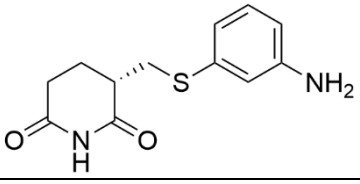
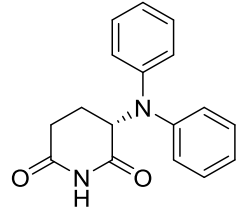
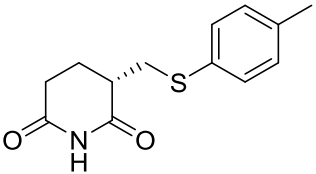
Продолжение таблицы 11

	L1-SSS-027	-9.67	-847.90	0,99	-8.708	-814.57	0,94	7.0±2.3	5.52±0.72	5.17±1.28
	L1-SSS-025	-9.86	-847.87	1,0087	-	-	-	7.4±2.5	6.81±0.83	5.90±0.47
	L1-SSS-058	-10.62	-847.81	1.086	-9.273	-816.43	1.0021	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-049	-10.53	-847.74	1.077	-9.904	-817.17	1.071	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-034	-9.77	-847.73	0.99	-9.343	-816.69	1.0096	n. d.	n. d.	n. d.

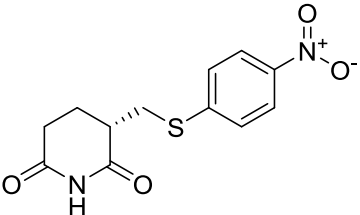
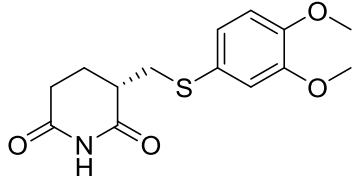
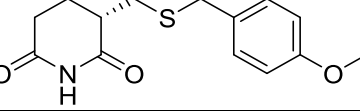
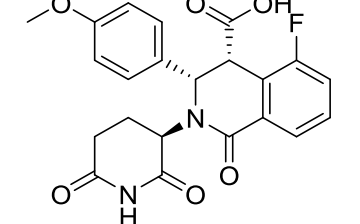
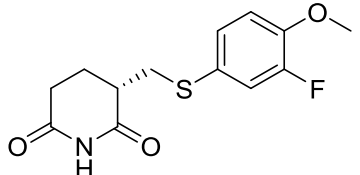
Продолжение таблицы 11

	L1-SSS-053	-9.67	-847.67	0.99	-8.626	-815.08	0.93	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-024	-9.81	-847.55	1.0027	-8.896	-814.87	0.96	4.8±1.7	5.8±0.61	6.45±0.62
	L1-SSS-020	-10.43	-847.35	1.066	-8.924	-816.47	0.96	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-050	-9.84	-847.31	1.0061	-9.266	-816.57	1.0012	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-063	-11.49	-847.29	1,17	-9.212	-815.81	0.99	n. d.	n. d.	n. d.

Продолжение таблицы 11

	L1-SSS-045	-10.83	-847.13	1.11	-8.572	-815.17	0.93	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-017	-10.29	-847.03	1.053	-9.646	-814.96	1.042	3.1±1.4	41.16±11.63	>90
	L2-DVD-000888	-10.43	-846.96	1.066	-7.687	-812.05	0.83	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-003	-10.29	-846.91	1.053	-8.593	-813.94	0.93	5.0±1.6	38.15±3.12	39.99±9.64

Продолжение таблицы 11

	L1-SSS-015	-10.066	-846.79	1.029	-8.323	-813.59	0.89	3.0±1.1	8.43±1.58	n. d.
	L1-SSS-046	-10.75	-846.77	1.099	-8.917	-816.14	0.96	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-028	-11.071	-846.62	1.13	-9.403	-815.22	1.016	4.0±1.3	73.19±14.76	>100
	L1-SSS-019	-9.94	-846.49	1.017	-	-	-	n. d.	n. d.	n. d.
	L1-SSS-067	-10.37	-846.23	1.060	-8.808	-814.95	0.951	n. d.	n. d.	n. d.

Как можно увидеть, большая часть протестированных лигандов успешно связывается с CRBN, однако цитотоксический эффект на клеточных линиях ММ проявляют только лиганды, содержащие сульфогруппу, что может опосредовать их активность молекулярных клеев. Соединения, проявляющие такую активность представлены на рисунке ниже (рисунок 33).

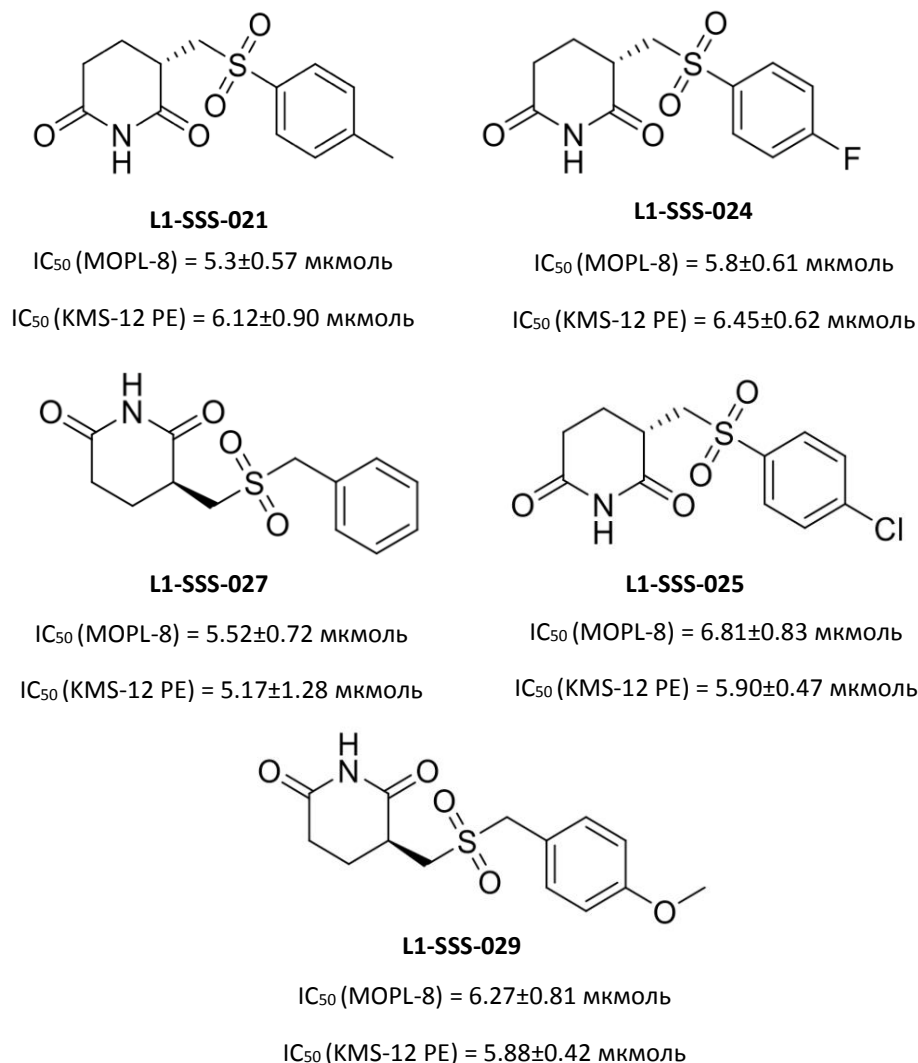
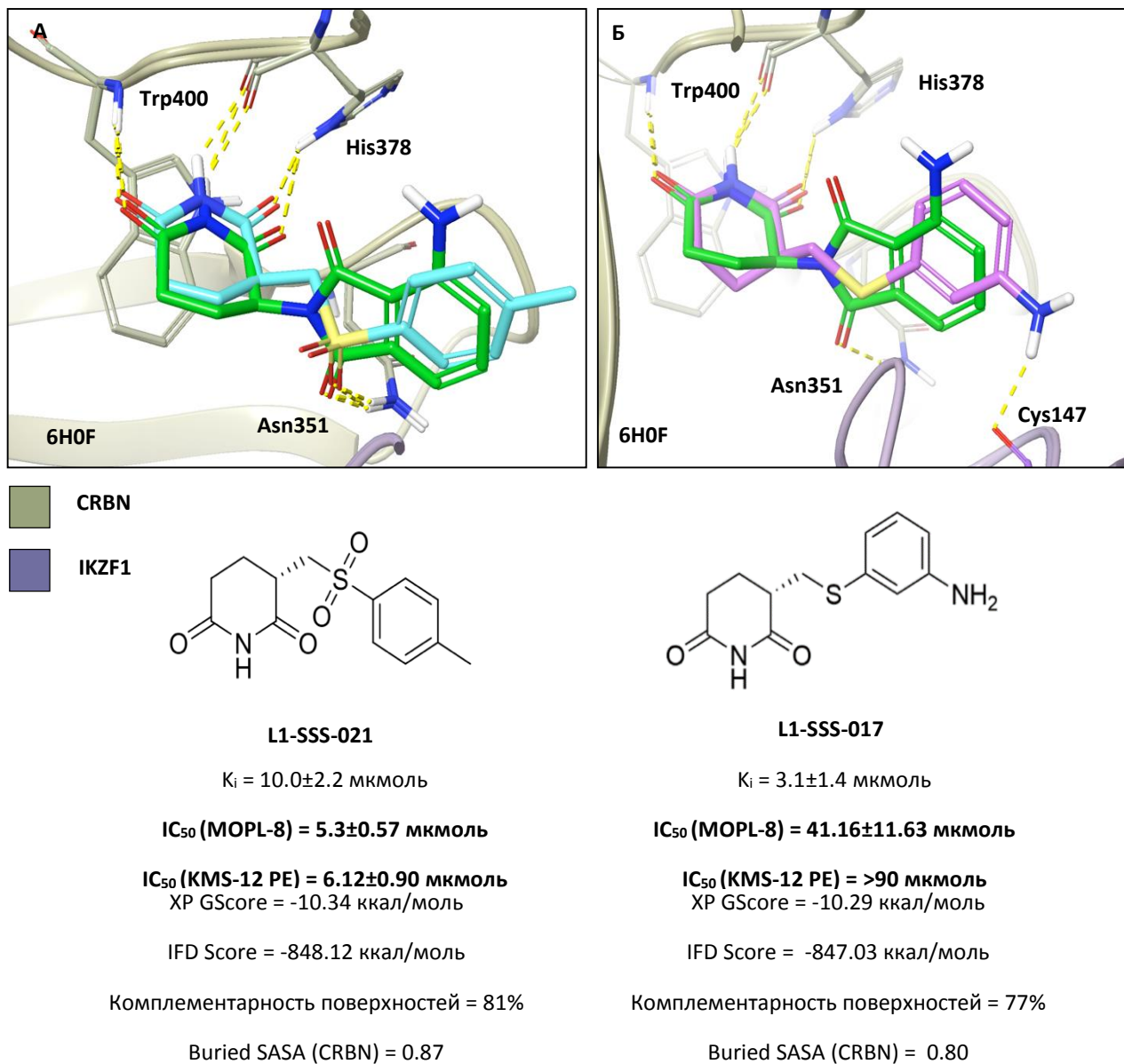


Рисунок 33 – идентифицированные соединения-хиты по результатам *in vitro* тестирования

Как упоминалось ранее, при прочих равных (то есть одинаково хорошие значения XP GScore, IFD Score, комплементарность поверхностей, а также % buried SASA остатков интерфейса), сульфоновые лиганды лучше воспроизводят позу связывания нативного лиганда. Следовательно, можно ожидать, что и

индукция конформационных изменений поверхности CRBN в области IMiD-связывающего сайта, необходимая для изменения субстратной специфичности E3 лигазы в пользу IKZF1, будет происходить схожим образом (рисунок 34).



А – Наложение помалидомида и соединения **L1-SSS-021** в сайте связывания IKZF1-CRBN (6H0F), значения *in vitro* тестов, *in silico* скоринга и оценка белок-белкового интерфейса; Б – то же, но для соединения **L1-SSS-017**

Рисунок 34 – сравнение режимов связывания сульфонового **L1-SSS-021** и сульфидного **L1-SSS-017** лигандов (в наложении с помалидомидом) в сайте IKZF1-CRBN; желтые линии – водородные связи.

3 Экспериментальная часть

3.1 Компьютерное моделирование

Все расчеты в рамках выполненной 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 белков

Кристаллические структуры CRBN-IKZF1 (PDB ID: 6H0F, 8D7Z, 8D80) были загружены из Protein Data Bank [99]. Подготовка осуществлялась с помощью модуля Protein Preparation Wizard [108]. Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, уточнены порядки связей, состояние протонирования спрогнозировано с использованием алгоритма Epik [109] в диапазоне $\text{pH} = 7 \pm 2$. Цепь, содержащая DDB1, молекулы воды и гетероатомы кроме лигандов удалены из структур.

3.1.2 Подготовка лигандов

Структуры всех исследуемых соединений были созданы с помощью панели сборки Maestro и подготовлены алгоритмом LigPrep: хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования предсказано с использованием Epik [109] в диапазоне $\text{pH} = 7 \pm 2$. Дополнительно проводился расчет физико-химических свойств с помощью модуля QikProp [110].

3.1.3 Индуцированный докинг

Модуль Inducted Fit Docking [104] использовался для проведения индуцированной стыковки. Область стыковки определялась как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с центром масс лиганда в сайте. Выбран режим автоматического удаления остатков для первичной стыковки Glide [72], параметры смягчения потенциалов, а также уточнения и оптимизации Prime [111] установлены по умолчанию. Повторный докинг в режиме точности Glide XP [112]

выполнялся для всех поз, находящихся в диапазоне ± 30 ккал/моль относительно лучшей по результатам первичной стыковки.

3.2 Биологические испытания

3.2.1 Реагенты и оборудование

Для проведения биологических испытаний использовалось следующее оборудование: ламинарный шкаф II класса защиты (SafeFast, Italy), инвертированный микроскоп (ZEISS Primovert, Germany), CO₂ – инкубатор (Binder, Germany), автоматический счетчик клеток (TC20, Bio–Rad, USA), прибор для микромасштабного термофореза (NanoTemper Technologies, Germany), флуоресцентный детектор Nano-BLUE (NanoTemper Technologies, Germany), автоматическая раскапывающая станция (epMotion 5070, Germany), планшетный ридер (Promega, USA), криохранилище (Thermo Fisher Scientific, USA), центрифуга (Elmi centrifuge CM–75, Latvia), механический дозатор на 300 мкЛ (Eppendorf Research Plus, Germany), механический дозатор на 1000 мкЛ (Eppendorf, Germany), непрозрачный 96–луночный планшет (Eppendorf, Germany), резервуар 100 мл (Eppendorf, Germany), центрифужные пробирки (Eppendorf, Germany), криопробирка (Cryofreeze, USA), серологические пипетки на 5 мл, 10 мл, 25 мл, 50 мл (Eppendorf, Germany).

Для проведения биологических испытаний использовались следующие реагенты: питательная среда RPMI (Gibco, UK), фетальная бычья сыворотка (FBS) (Capricorn Scientific, USA), трипановый синий (0.4%) (cGMP, USA), раствор антибиотиков пенициллин–стрептомицина (Capricorn Scientific, USA), клеточная культура MOLP-8 и KMS-12-PE (DSMZ, Germany), реагент CellTiter–Glo[®], культуральный флакон 75 см² (Eppendorf, Germany).

3.2.2 Культивирование клеток

Клеточные линии MOLP-8 и KMS-12-PE были получены из DSMZ, клетки поддерживали в питательной среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, смеси пенициллина–стрептомицина (100 мкг/мл) и GlutaMax

(2 мМ). Культивировали клеточную линию во влажной атмосфере 95% воздуха, 5% CO₂ при 37°C. Количество жизнеспособных клеток определяли по исключению трипанового синего.

3.2.3 Анализ жизнеспособности CellTiter–Glo

Ресуспендировали и производили расчет клеточной линии согласно методике культивирования.

Подготовили непрозрачные 96–луночные планшеты с клетками MOLP-8 и KMS-12-PE MM и культуральной средой, количество клеток в лунке – 20 000. Добавили тестируемые соединения, начиная с концентрации 10 мкМ, провели раститровку, инкубировали клетки в соответствии с протоколом культивирования. Проводили инкубацию в течение 48 часов при комнатной температуре. Добавили объем реагента CellTiter–Glo[®], равный объему среды для культивирования клеток в каждой лунке. Смешали содержимое лунок планшета в течение 2 минут на орбитальном шейкере, чтобы вызвать лизис клеток. Оставили планшет инкубироваться при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала. Измерили сигнал люминесценции при помощи планшетного ридера. Каждое из тестируемых соединений оценивали на цитотоксичность в трех отдельных экспериментах.

3.2.4 Определение аффинности методом микромасштабного термофореза

Сродство к связыванию исследуемых соединений с талидомид-связывающим доменом человеческого CRBN (hTBD) было определено при помощи метода микромасштабного термофореза в температурном градиенте. 16-точечную серию разведенных соединений в соотношении 1:1 в ДМСО разбавляли 1:100 в ddH₂O, а затем смешивали с белком: репортерным сырьем до конечных концентраций 10 мкМ hTBD и 200 нМ бодипирацила. Измерения проводились на монолите NT.115 с детектором Nano BLUE с использованием 20% мощности возбуждения MST и контролем температуры при 25 °C. Данные за 20 секунд были проанализированы с использованием графической панели Prism 9.

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

– проведен отбор и подготовка белок-белковых комплексов E3-лигазы CRBN с фактором транскрипции IKZF1, содержащих различные молекулярные клеи, а также анализ режимов связывания кристаллических лигандов;

– несколько библиотек лигандов CRBN были подвергнуты процедуре индуцированной стыковки в отобранные комплексы 6H0F(помалидомида) и 8D80 (ибердомид). анализ результатов докинга позволил идентифицировать ряд из 32 структур, предположительно обладающих активностью молекулярного клея: в основном различные сульфоны и сульфиды из библиотеки L1. Все они по сравнению с нативным лигандом (6H0F; помалидомид) продемонстрировали более низкие или сопоставимые значения скоринговой функции XP GScore 9.1-10.6 и комбинированной оценки энергетики комплекса IFD Score 847.0-852.5. Более того, анализ белок-белковых взаимодействий в полученных позах показал увеличение взаимной комплементарности поверхностей интерфейса IKZF1-CRBN, а также образование новой межбелковой водородной связи Asn351;

– особое предпочтение было отдано соединениям, содержащим сульфо-группу, так как они практически полностью воспроизводят режим связывания нативных лигандов, а именно, в отличие от сульфидных аналогов, могут образовывать водородную связь с остатком Asn351;

– в рамках текущего проекта Центра медицинской химии некоторые из исследуемых соединений были синтезированы и проведена оценка их влияния на жизнеспособность клеток множественной миеломы человека, а также определена аффинность к E3-лигазе CRBN. Сульфон-содержащие аналоги талидомида демонстрируют цитотоксический эффект в диапазоне 5.2-6.8 мкмоль и 5-6.5 мкмоль на линиях MOLP-8 и KMS-12 PE, соответственно; сульфиды же не обладают подобной активностью. Выявленные соединения могут быть использованы в ходе будущих проектов Центра медицинской химии в области направленного протеолиза.

Список используемой литературы

1. Stanton B. Z., Chory E. J., Crabtree G. R. Chemically induced proximity in biology and medicine // *Science*. – 2018. – Vol. 359. – №. 6380. – P. 5902.
4. Schreiber S. L. The rise of molecular glues // *Cell*. – 2021. – Vol. 184. – №. 1. – P. 3-9.
5. Dimopoulos M. A., Terpos E. Lenalidomide: an update on evidence from clinical trials // *Blood Rev*. – 2010. – Vol. 24. – P. S21-S26.
6. Lata S., Mishra R., Banerjee A. C. Proteasomal degradation machinery: favorite target of HIV-1 proteins // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2738.
7. Schapira M. et al. Targeted protein degradation: expanding the toolbox // *Nature Rev Drug discovery*. – 2019. – Vol. 18. – №. 12. – P. 949-963.
8. Dong G. et al. Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2021. – Vol. 64. – №. 15. – P. 10606-10620
9. Komander D., Rape M. The ubiquitin code // *Annual review of Biochemistry* – 2012. – Vol. 81. – P. 203-229.
10. An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation / S. Prakash, L. Tian, K. S. Ratliff, et al. // *Nat Struct Mol Biol*. – 2004. – Vol. 11, no. 9. – P. 830- 837.
11. Geiger T. M. et al. Clues to molecular glues // *Current Research in Chemical Biology* – 2022. – Vol. 2. – P. 100018.
12. Schreiber S. L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands // *Science* – 1991. – Vol. 251. – №. 4991. – P. 283-287.
13. Liu J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes // *Cell* – 1991. – Vol. 66. – №. 4. – P. 807-815.
14. Huai Q. et al. Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2002. – Vol. 99. – №. 19. – P. 12037-12042.

15. Sanglier J. et al. Sangliferins isolated A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity // *J. Antibiot.* – 1999. – Vol. 52. – P. 466-473.
16. Pua K. H. et al. IMPDH2 is an intracellular target of the cyclophilin A and sangliferin A complex // *Cell Reports* – 2017. – Vol. 18. – №. 2. – P. 432-442.
17. Chang C. F., Flaxman H. A., Woo C. M. Enantioselective Synthesis and Biological Evaluation of Sangliferin A and B and Analogs // *Angewandte Chemie* – 2021. – Vol. 133. – №. 31. – P. 17182-17189.
18. Harding M. W. et al. A receptor for the immuno-suppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase // *Nature* – 1989. – Vol. 341. – №. 6244. – P. 758-760.
19. Winter G. E. et al. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation // *Science* – 2015. – Vol. 348. – №. 6241. – P. 1376-1381.
20. Sakamoto K. M. et al. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2001. – Vol. 98. – №. 15. – P. 8554-8559.
21. Dong G. et al. Molecular glues for targeted protein degradation: from serendipity to rational discovery // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2021. – Vol. 64. – №. 15. – P. 10606-10620.
22. Paiva S. L., Crews C. M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design // *Current Opinion in Chemical Biology* – 2019. – Vol. 50. – P. 111-119.
23. Mellin G. W., Katzenstein M. The saga of thalidomide: neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies // *New England Journal of Medicine* – 1962. – Vol. 267. – №. 23. – P. 1184-1193.
24. Vargesson N. Thalidomide- induced teratogenesis: History and mechanisms // *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* – 2015. – Vol. 105. – №. 2. – P. 140-156.
25. Singhal S. et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma // *New England Journal of Medicine* – 1999. – Vol. 341. – №. 21. – P. 1565-1571.

26. Tefferi A. et al. Pomalidomide therapy in anemic patients with myelofibrosis: results from a phase-2 randomized multicenter study // *Blood* – 2008. – Vol. 112. – №. 11. – P. 663.
27. Tohnya T. M. et al. A Phase I Study of Oral CC-5013 (Lenalidomide, Revlimid™), a Thalidomide Derivative, in Patients with Refractory Metastatic Cancer // *Clinical Prostate Cancer* – 2004. – Vol. 2. – №. 4. – P. 241-243.
28. Ito T. et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity // *Science* – 2010. – Vol. 327. – №. 5971. – P. 1345-1350.
29. Shi Q., Chen L. Cereblon: a protein crucial to the multiple functions of immunomodulatory drugs as well as cell metabolism and disease generation // *Journal of Immunology Research* – 2017. – Vol. 2017.
30. Krönke J. et al. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells // *Science* – 2014. – Vol. 343. – №. 6168. – P. 301-305.
31. Powell M. D. et al. Ikaros zinc finger transcription factors: regulators of cytokine signaling pathways and CD⁴⁺ T helper cell differentiation // *Frontiers in Immunology* – 2019. – Vol. 10. – P. 1299.
32. Jovanović K. K. et al. Targeting MYC in multiple myeloma // *Leukemia* – 2018. – Vol. 32. – №. 6. – P. 1295-1306.
33. Licht J. D., Shortt J., Johnstone R. From anecdote to targeted therapy: the curious case of thalidomide in multiple myeloma // *Cancer Cell* – 2014. – Vol. 25. – №. 1. – P. 9-11.
34. Sievers Q. L. et al. Defining the human C2H2 zinc finger degrome targeted by thalidomide analogs through CRBN // *Science* – 2018. – Vol. 362. – №. 6414. – P. eaat0572.
35. Wu H. et al. Molecular glues modulate protein functions by inducing protein aggregation: A promising therapeutic strategy of small molecules for disease treatment // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2022.

36. Du X. et al. Structural basis and kinetic pathway of RBM39 recruitment to DCAF15 by a sulfonamide molecular glue E7820 // *Structure* – 2019. – Vol. 27. – №. 11. – P. 1625-1633. e3.
37. Owa T. et al. Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1999. – Vol. 42. – №. 19. – P. 3789-3799
38. Haritunians T. et al. Novel acyl sulfonamide LY573636-sodium: effect on hematopoietic malignant cells // *Oncology Reports* – 2008. – Vol. 20. – №. 5. – P. 1237-1242.
39. Funahashi Y. et al. Sulfonamide derivative, E7820, is a unique angiogenesis inhibitor suppressing an expression of integrin $\alpha 2$ subunit on endothelium // *Cancer Research*. – 2002. – Vol. 62. – №. 21. – P. 6116-6123.
40. Han T. et al. Anticancer sulfonamides target splicing by inducing RBM39 degradation via recruitment to DCAF15 // *Science* – 2017. – Vol. 356. – №. 6336. – P. eaal3755.
41. Li Z. et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT–LC3 linker compounds // *Nature* – 2019. – Vol. 575. – №. 7781. – P. 203-209.
42. Price M. N., Dehal P. S., Arkin A. P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments // *PloS one*. – 2010. – Vol. 5. – №. 3. – P. e9490.
43. Zhu C. et al. Developing an efficient and general strategy for immobilization of small molecules onto microarrays using isocyanate chemistry // *Sensors* – 2016. – Vol. 16. – №. 3. – P. 378.
44. Isobe Y. et al. Manumycin polyketides act as molecular glues between UBR7 and P53 // *Nature Chemical Biology* – 2020. – Vol. 16. – №. 11. – P. 1189-1198.
45. Sattler I., Thiericke R., Zeeck A. The manumycin-group metabolites // *Natural Product Reports* – 1998. – Vol. 15. – №. 3. – P. 221-240.
46. Galmozzi A. et al. Application of activity-based protein profiling to study enzyme function in adipocytes // *Methods in enzymology* – Academic Press, 2014. – Vol. 538. – P. 151-169.

47. Young D. C. Computational drug design: a guide for computational and medicinal chemists – John Wiley & Sons, 2009.
48. Van Drie J. H. Computer-aided drug design: the next 20 years // Journal of Computer-Aided Molecular Design – 2007. – Vol. 21. – №. 10. – P. 591-601.
49. Salmaso V., Moro S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview // Frontiers in Pharmacology – 2018. – Vol. 9. – P. 923
50. Podlogar B. L., Muegge I., Brice L. J. Computational methods to estimate drug development parameters // Current Opinion in Drug Discovery & Development – 2001. – Vol. 4. – №. 1. – P. 102-109.
51. Duran A., Zamora I., Pastor M. Suitability of GRIND-based principal properties for the description of molecular similarity and ligand-based virtual screening // Journal of Chemical Information and Modeling – 2009. – Vol. 49. – №. 9. – P. 2129-2138.
52. Du Q., Qian Y., Xue W. Cross-reactivity of two human IL-6 family cytokines OSM and LIF explored by protein-protein docking and molecular dynamics simulation // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects – 2021. – Vol. 1865. – №. 7. – P. 129907.
53. Antes I. et al. Accurate Prediction of Protein-Ligand Binding by Combined Molecular Dynamics-Based Docking and QM/MM Methods // Biophysical Journal – 2018. – Vol. 114. – №. 3. – P. 42a.
54. Tripathi A., Bankaitis V. A. Molecular docking: From lock and key to combination lock // Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications – 2017. – Vol. 2. – №. 1.
55. Koshland Jr D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis // Proceedings of the National Academy of Sciences – 1958. – Vol. 44. – №. 2. – P. 98-104.
56. Desta I. T. et al. Performance and its limits in rigid body protein-protein docking // Structure – 2020. – Vol. 28. – №. 9. – P. 1071-1081. e3.

57. Hall-Swan S. et al. DINC-COVID: A webserver for ensemble docking with flexible SARS-CoV-2 proteins // *Computers in Biology and Medicine* – 2021. – Vol. 139. – P. 104943.
58. Sherman W. et al. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2006. – Vol. 49. – №. 2. – P. 534-553.
59. Yan C., Zou X. Modeling protein flexibility in molecular docking. – 2017.
60. Berman H. M. et al. The protein data bank // *Nucleic Acids Research* – 2000. – Vol. 28. – №. 1. – P. 235-242.
61. Thomsen R., Christensen M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2006. – Vol. 49. – №. 11. – P. 3315-3321.
62. Kim S. et al. PubChem substance and compound databases // *Nucleic Acids Research* – 2016. – Vol. 44. – №. D1. – P. D1202-D1213.
63. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *Journal of Computational Chemistry* – 2010. – Vol. 31. – №. 2. – P. 455-461.
64. Gioia D. et al. Dynamic docking: a paradigm shift in computational drug discovery // *Molecules* – 2017. – Vol. 22. – №. 11. – P. 2029.
65. Kitchen D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications // *Nature reviews Drug discovery* – 2004. – Vol. 3. – №. 11. – P. 935-949.
66. Moitessier N. et al. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go // *British Journal of Pharmacology* – 2008. – Vol. 153. – №. S1. – P. S7-S26.
67. Salmaso V., Moro S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview // *Frontiers in Pharmacology* – 2018. – Vol. 9. – P. 923.
68. Ewing T. J. A. et al. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases // *Journal of Computer-Aided Molecular Design* – 2001. – Vol. 15. – №. 5. – P. 411-428.

69. Eldridge M. D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes // *Journal of Computer-Aided Molecular Design* – 1997. – Vol. 11. – №. 5. – P. 425-445.

70. Rarey M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm // *Journal of Molecular Biology* – 1996. – Vol. 261. – №. 3. – P. 470-489.

71. Jain A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2003. – Vol. 46. – №. 4. – P. 499-511.

72. Mooij W. T. M., Verdonk M. L. General and targeted statistical potentials for protein–ligand interactions // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* – 2005. – Vol. 61. – №. 2. – P. 272-287.

73. Huang S. Y., Grinter S. Z., Zou X. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2010. – Vol. 12. – №. 40. – P. 12899-12908.

74. Halgren J. J. K. et al. Glide-related material // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2004. – Vol. 47. – P. 1739-1749.

75. Friesner R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2004. – Vol. 47. – №. 7. – P. 1739-1749.

76. Friesner R. A. et al. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2006. – Vol. 49. – №. 21. – P. 6177-619

77. Sasso J. M. et al. Molecular glues: The adhesive connecting targeted protein degradation to the clinic // *Biochemistry* – 2022.

78. Mayor-Ruiz C. et al. Rational discovery of molecular glue degraders via scalable chemical profiling // *Nature Chemical Biology* – 2020. – Vol. 16. – №. 11. – P. 1199-1207.

79. Simonetta K. R. et al. Prospective discovery of small molecule enhancers of an E3 ligase-substrate interaction // *Nature Communications* – 2019. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-12.
80. Słabicki M. et al. The CDK inhibitor CR8 acts as a molecular glue degrader that depletes cyclin K // *Nature*. – 2020. – Vol. 585. – №. 7824. – C. 293-297
81. Matyskiela M. E. et al. Crystal structure of the SALL4–pomalidomide–cereblon–DDB1 complex // *Nature Structural & Molecular Biology* – 2020. – Vol. 27. – №. 4. – P. 319-322.
82. Hagner P. R. et al. CC-122, a pleiotropic pathway modifier, mimics an interferon response and has antitumor activity in DLBCL // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* – 2015. – Vol. 126. – №. 6. – P. 779-789.
83. Matyskiela M. E. et al. A cereblon modulator (CC-220) with improved degradation of Ikaros and Aiolos // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2018. – Vol. 61. – №. 2. – P. 535-542.
84. Surka C. et al. CC-90009, a novel cereblon E3 ligase modulator, targets acute myeloid leukemia blasts and leukemia stem cells // *Blood* – 2021. – Vol. 137. – №. 5. – P. 661-677
85. Fischer E. S. et al. Structure of the DDB1–CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide // *Nature* – 2014. – Vol. 512. – №. 7512. – P. 49-53.
86. Guharoy M. et al. Tripartite degrons confer diversity and specificity on regulated protein degradation in the ubiquitin-proteasome system // *Nature Communications* – 2016. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-13.
87. Higgins J. J. et al. A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation // *Neurology* – 2004. – Vol. 63. – №. 10. – P. 1927-1931.
88. Liu J. et al. CRL4ACRBN E3 ubiquitin ligase restricts BK channel activity and prevents epileptogenesis // *Nature communications* – 2014. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-9.

89. Lee K. M. et al. Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* – 2011. – Vol. 1813. – №. 3. – P. 448-455.
90. Kang J. A. et al. Epigenetic regulation of Kcna3-encoding Kv1. 3 potassium channel by cereblon contributes to regulation of CD4+ T-cell activation // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2016. – Vol. 113. – №. 31. – P. 8771-8776.
91. Muller G. W. et al. A concise two-step synthesis of thalidomide // *Organic Process Research & Development* – 1999. – Vol. 3. – №. 2. – P. 139-140.
92. Muller G. W. et al. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- α production // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 1999. – Vol. 9. – №. 11. – P. 1625-1630.
93. Matyskiela M. E. et al. SALL4 mediates teratogenicity as a thalidomide-dependent cereblon substrate // *Nature Chemical Biology* – 2018. – Vol. 14. – №. 10. – P. 981-987.
94. Petzold G., Fischer E. S., Thomä N. H. Structural basis of lenalidomide-induced CK1 α degradation by the CRL4CRBN ubiquitin ligase // *Nature* – 2016. – Vol. 532. – №. 7597. – P. 127-130.
95. Donovan K. A. et al. Thalidomide promotes degradation of SALL4, a transcription factor implicated in Duane Radial Ray syndrome // *Elife* – 2018. – Vol. 7. – P. e38430.
96. Wang A. et al. ZFP91 is required for the maintenance of regulatory T cell homeostasis and function // *Journal of Experimental Medicine* – 2021. – Vol. 218. – №. 2.
97. Unoki M., Okutsu J., Nakamura Y. Identification of a novel human gene, ZFP91, involved in acute myelogenous leukemia // *International Journal of Oncology* – 2003. – Vol. 22. – №. 6. – P. 1217-1223.
98. Hansen J. D. et al. CC-90009: a cereblon E3 ligase modulating drug that promotes selective degradation of GSPT1 for the treatment of acute myeloid leukemia // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2021. – Vol. 64. – №. 4. – P. 1835-1843.

99. Matyskiela M. E. et al. A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4CRBN ubiquitin ligase // *Nature* – 2016. – Vol. 535. – №. 7611. – P. 252-257.

100. Hao B. et al. The novel cereblon modulator CC-885 inhibits mitophagy via selective degradation of BNIP3L // *Acta Pharmacologica Sinica* – 2020. – Vol. 41. – №. 9. – P. 1246-1254.

101. RCSB Protein Data Bank (PDB). URL: <https://www.rcsb.org/>

102. Watson E. R. et al. Molecular glue CELMoD compounds are regulators of cereblon conformation // *Science*. – 2022. – Vol. 378. – №. 6619. – P. 549-553.

103. Madhavi Sastry G. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments // *Journal of Computer-aided Molecular Design*. – 2013. – Vol. 27. – P. 221-234.

104. Shelley J. C. et al. Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. – 2007. – Vol. 21. – P. 681-691.

105. Friesner R. A. et al. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein– ligand complexes // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 49. – №. 21. – P. 6177-6196.

106. Sherman W., Beard H. S., Farid R. Use of an induced fit receptor structure in virtual screening // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2006. – Vol. 67. – №. 1. – P. 83-84.

107. Jacobson M. P. et al. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 320. – №. 3. – P. 597-608.

108. Niles A. L., Moravec R. A., Riss T. L. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening // *Current Chemical Genomics*. – 2009. – Vol. 3. – P. 33.

109. Maiwald S. et al. Sweet and blind spots in E3 ligase ligand space revealed by a thermophoresis-based assay // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 12. – №. 1. – P. 74-81.

110. Wizard P. P. 2: Epik, Version 2.4, Impact, Version 5.9;(b) GM Satry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju and W. Sherman // J. Comput.-Aided Mol. Des. – 2013. – Vol. 27. – P. 221-234.

111. Shelley J. C. Cholleti A. Frye LL Greenwood JR Timlin MR Uchimaya MJ Comput // Aided Mol. Des. – 2007. – Vol. 21. – P. 681-691.

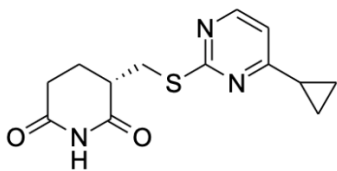
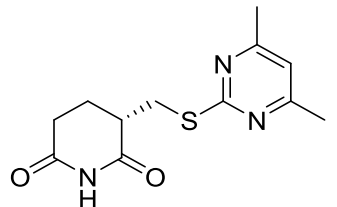
112. Ioakimidis L. et al. Benchmarking the reliability of QikProp. Correlation between experimental and predicted values // QSAR & Combinatorial Science. – 2008. – Vol. 27. – №. 4. – P. 445-456.

113. Jelsch C., Longhi S., Cambillau C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 1998. – Vol. 31. – №. 3. – P. 320-333.

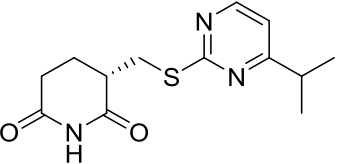
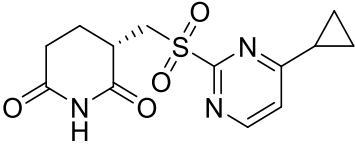
114. Friesner R. et al. ExtraPrecision glide-Docking and scoring based on a new theory of molecular recognition // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49. – P. 6177-6199.

Приложение А
Результаты экспериментальных исследований

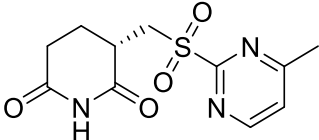
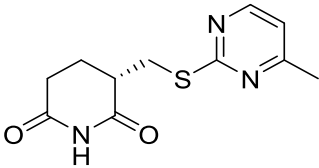
Таблица А.1 – Результаты индуцированной стыковки в комплекс CRBN-IKZF1 (PDB ID: 6H0F)

Библиотека	Структура соединения	Номер соединения	Ранг позы	IFD Score, ккал/моль	XP GScore, ккал/моль
1	2	3	4	5	6
L1		L1-SSS-060	1	-9.612	-852.48
			2	-9.381	-852.48
			3	-9.105	-852.03
			4	-9.152	-851.79
			5	-8.678	-851.62
			6	-8.550	-851.48
			7	-8.616	-851.41
			8	-8.679	-851.33
			9	-8.589	-851.26
			10	-8.496	-851.07
			11	-8.194	-851.04
			12	-8.408	-850.99
			13	-8.170	-850.92
			14	-8.599	-850.67
			15	-7.253	-850.06
L1		L1_SSS-064	1	-9.916	-852.47
			2	-9.487	-852.16
			3	-9.575	-851.71
			4	-9.044	-851.67
			5	-8.921	-851.61
			6	-8.556	-850.79
			7	-8.382	-850.75
			8	-7.460	-850.26
			9	-8.136	-850.17
			10	-7.413	-849.82

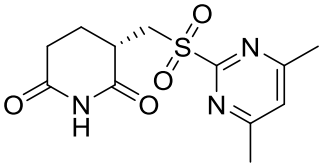
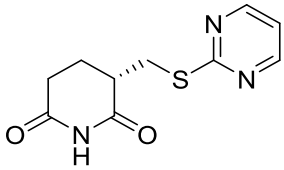
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-061	1	-9.090	-852.34
			2	-9.115	-852.31
			3	-8.990	-852.17
			4	-8.763	-852.03
			5	-8.828	-851.80
			6	-8.680	-851.80
			7	-8.356	-851.60
			8	-8.662	-851.57
			9	-9.055	-851.47
			10	-8.678	-851.42
			11	-8.282	-851.22
			12	-8.247	-851.11
			13	-7.954	-851.10
			14	-8.693	-851.08
			15	-8.310	-850.94
			16	-7.721	-850.77
			17	-7.763	-850.47
			18	-6.393	-848.58
L1		L1_SSS-039	1	-9.792	-852.07
			2	-9.985	-852.03
			3	-9.618	-851.92
			4	-9.760	-851.71
			5	-10.050	-851.62
			6	-9.463	-851.36
			7	-9.461	-851.27
			8	-9.382	-851.22
			9	-8.985	-850.96
			10	-9.060	-850.91
			11	-8.242	-850.43

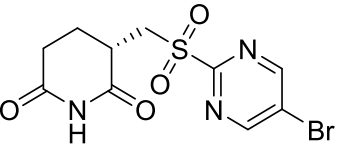
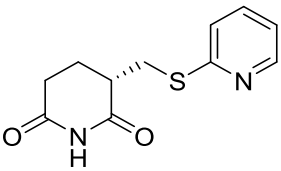
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			12	-8.837	-850.33
			13	-8.685	-850.15
			14	-7.919	-849.57
			15	-8.029	-849.28
			16	-8.341	-849.24
			17	-7.920	-849.01
L1		L1_SSS-043	1	-9.626	-852.03
			2	-9.532	-851.78
			3	-7.914	-850.56
			4	-8.467	-850.53
			5	-8.179	-850.50
			6	-8.081	-850.22
			7	-8.055	-850.09
			8	-7.631	-849.93
			9	-7.573	-849.45
			10	-7.067	-849.12
			11	-6.091	-847.28
			12	-5.330	-847.02
			13	-5.125	-846.90
			14	-3.956	-845.80
L1		L1_SSS-008	1	-9.371	-851.89
			2	-9.386	-851.76
			3	-9.197	-851.52
			4	-9.205	-851.49
			5	-9.477	-851.27
			6	-8.888	-851.15
			7	-8.718	-851.02
			8	-8.647	-850.82
			9	-8.778	-850.82
			10	-8.150	-850.65
			11	-8.249	-850.53
			12	-8.837	-850.46
			13	-8.018	-850.27

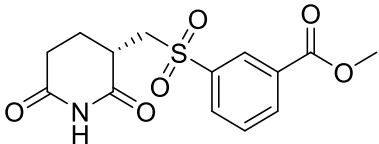
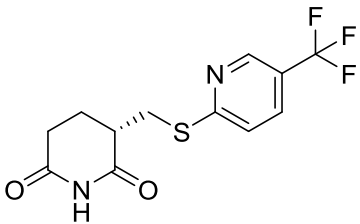
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			14	-8.351	-850.26
			15	-7.950	-850.15
			16	-7.156	-849.57
			17	-7.759	-849.38
			18	-6.979	-849.32
L1		L1_SSS-037	1	-9.372	-851.23
			2	-9.119	-851.02
			3	-8.965	-850.82
			4	-8.872	-850.71
			5	-8.406	-850.31
			6	-8.315	-850.05
			7	-8.617	-849.90
			8	-7.369	-849.14
			9	-7.509	-848.49
			10	-7.084	-847.93
			11	-5.712	-847.60
			12	-6.365	-847.49
			13	-5.461	-846.52
			14	-5.213	-846.46
L1		L1_SSS-007	1	-9.224	-850.47
			2	-8.461	-850.28
			3	-9.411	-850.27
			4	-8.094	-849.86
			5	-8.125	-849.81
			6	-8.049	-849.72
			7	-8.513	-849.58
			8	-7.820	-849.56
			9	-8.399	-849.47
			10	-7.525	-849.40
			11	-7.693	-849.35
			12	-7.129	-848.59
			13	-7.125	-848.59
			14	-6.793	-847.94

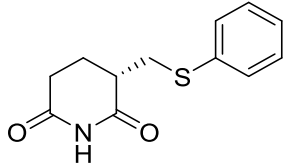
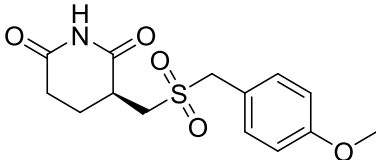
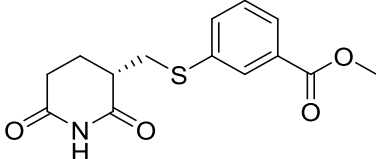
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-051	1	-8.108	-849.33
			2	-7.652	-848.48
			3	-7.708	-848.33
			4	-7.739	-848.19
			5	-7.570	-848.05
			6	-7.645	-848.03
			7	-7.430	-847.70
			8	-7.341	-847.59
			9	-7.337	-847.50
			10	-7.049	-847.48
			11	-6.656	-847.24
			12	-6.402	-846.79
			13	-6.152	-846.71
L1		L1_SSS-009	1	-9.638	-849.20
			2	-9.576	-849.03
			3	-9.393	-848.93
			4	-9.484	-848.82
			5	-9.552	-848.80
			6	-9.160	-848.44
			7	-9.175	-848.31
			8	-8.636	-848.14
			9	-8.795	-847.92
			10	-8.215	-847.72
			11	-8.360	-847.66
			12	-8.193	-847.37
			13	-8.453	-847.28
14	-6.967	-846.52			
15	-7.046	-846.36			
16	-6.857	-845.84			

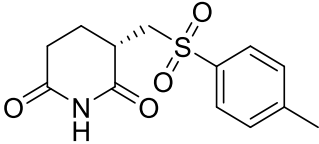
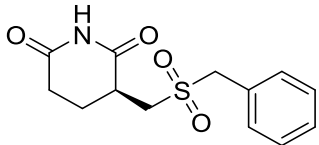
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-057	1	-10.170	-848.65
			2	-9.661	-848.15
			3	-9.438	-847.41
			4	-8.719	-847.04
			5	-8.462	-846.82
			6	-8.450	-846.69
			7	-7.877	-846.15
			8	-7.809	-846.01
			9	-7.717	-845.72
			10	-6.067	-843.75
			11	-3.399	-841.11
L1		L1_SSS-065	1	-9.706	-848.44
			2	-9.605	-848.30
			3	-9.352	-848.02
			4	-9.244	-847.89
			5	-8.791	-847.85
			6	-9.192	-847.78
			7	-8.599	-847.28
			8	-8.114	-846.82
			9	-8.221	-846.79
			10	-8.331	-846.72
			11	-8.059	-846.67
			12	-8.239	-846.67
			13	-8.053	-846.53
			14	-7.923	-846.50
			15	-8.014	-846.13

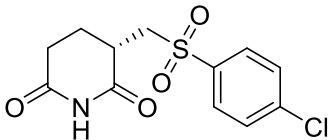
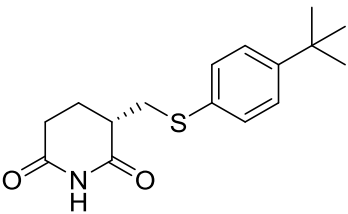
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-001	1	-9.712	-848.38
			2	-8.703	-847.93
			3	-9.011	-847.60
			4	-9.481	-847.21
			5	-9.037	-846.81
			6	-8.258	-846.18
			7	-8.042	-845.84
			8	-7.576	-845.53
L1		L1_SSS-029	1	-9.594	-848.21
			2	-9.626	-847.85
			3	-9.229	-847.73
			4	-9.478	-847.64
			5	-9.643	-847.57
			6	-8.698	-847.33
			7	-8.812	-846.80
			8	-7.861	-846.05
			9	-7.814	-845.71
			10	-7.591	-845.69
			11	-8.431	-845.67
			12	-7.375	-845.62
			13	-7.607	-845.62
			14	-7.616	-845.04
			15	-6.444	-843.70
L1		L1_SSS-047	1	-10.161	-848.16
			2	-9.133	-847.27
			3	-9.253	-847.22
			4	-9.224	-847.21
			5	-8.993	-846.97
			6	-9.190	-846.96
			7	-9.510	-846.82
			8	-8.845	-846.81
			9	-9.050	-846.72
			10	-9.213	-846.44

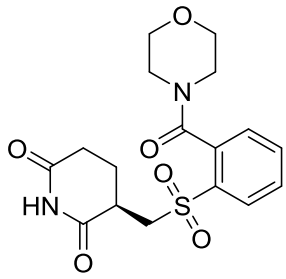
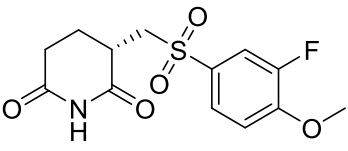
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			11	-8.619	-846.38
			12	-8.450	-846.29
			13	-8.804	-846.21
			14	-8.447	-846.12
			15	-8.473	-845.80
			16	-7.318	-845.17
			17	-7.317	-845.02
			18	-6.249	-843.87
L1		L1_SSS-021	1	-10.344	-848.12
			2	-10.035	-847.88
			3	-10.308	-847.81
			4	-9.499	-847.37
			5	-9.849	-847.30
			6	-9.490	-847.06
			7	-8.793	-846.76
			8	-8.709	-846.42
			9	-8.665	-846.40
			10	-8.675	-846.37
			11	-8.771	-846.31
			12	-8.954	-846.22
			13	-8.529	-845.86
			14	-8.419	-845.80
L1		L1_SSS-027	1	-9.670	-847.90
			2	-9.936	-847.78
			3	-9.834	-847.72
			4	-9.525	-847.61
			5	-9.367	-847.47
			6	-9.018	-847.24
			7	-8.970	-847.08
			8	-8.045	-846.24
			9	-8.140	-846.12
			10	-7.820	-846.08
			11	-8.196	-845.89

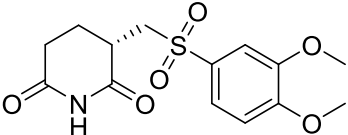
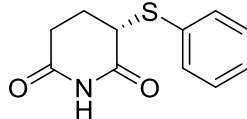
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			12	-8.221	-845.85
			13	-7.950	-845.75
			14	-7.985	-845.68
			15	-8.008	-845.68
L1		L1_SSS-025	1	-9.863	-847.87
			2	-8.972	-846.93
			3	-8.782	-846.62
			4	-8.269	-846.10
			5	-8.272	-846.08
			6	-8.097	-846.07
			7	-8.492	-845.72
			8	-7.583	-845.34
			9	-7.724	-845.34
			10	-7.623	-845.27
			11	-8.119	-845.23
			12	-7.618	-845.11
			13	-7.311	-845.03
			14	-7.306	-844.92
			15	-6.899	-844.20
L1		L1_SSS-058	1	-10.626	-847.81
			2	-10.706	-847.31
			3	-10.671	-847.27
			4	-10.454	-847.01
			5	-9.983	-846.70
			6	-9.092	-845.87
			7	-8.927	-845.71
			8	-9.056	-845.34
			9	-8.816	-845.33
			10	-8.615	-845.32

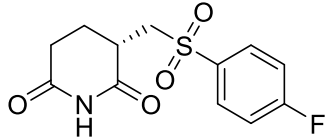
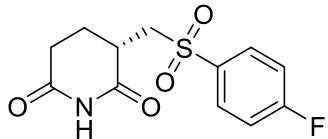
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			11	-9.361	-845.27
			12	-8.949	-845.23
			13	-8.691	-845.18
			14	-8.382	-845.14
			15	-8.238	-844.84
			16	-8.019	-844.84
			17	-8.373	-844.58
			18	-7.749	-844.54
			19	-7.696	-844.47
			20	-7.269	-843.34
L1		L1_SSS-049	1	-10.535	-847.74
			2	-9.514	-847.10
			3	-9.046	-846.74
			4	-8.672	-846.18
			5	-8.741	-845.66
			6	-7.730	-845.30
			7	-8.043	-845.28
			8	-7.637	-845.09
			9	-8.367	-845.05
			10	-7.348	-844.96
			11	-7.523	-844.86
			12	-6.656	-844.44
L1		L1_SSS-034	1	-9.774	-847.73
			2	-9.631	-847.65
			3	-9.217	-846.98
			4	-9.195	-846.84
			5	-8.649	-846.53
			6	-8.435	-845.97
			7	-7.929	-845.63
			8	-7.686	-845.40
			9	-7.311	-845.46

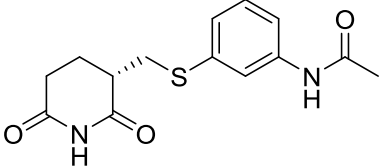
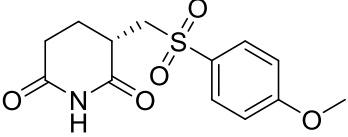
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			10	-7.632	-845.25
			11	-7.657	-845.24
			12	-7.533	-845.17
			13	-7.507	-845.15
			14	-7.197	-845.04
			15	-7.111	-844.99
			16	-7.299	-844.66
			17	-7.100	-844.44
			18	-6.404	-844.00
L1		L1_SSS-053	1	-9.673	-847.67
			2	-9.851	-847.32
			3	-8.451	-845.95
			4	-7.963	-845.57
			5	-7.232	-844.87
			6	-6.892	-844.66
			7	-6.828	-844.62
			8	-7.340	-844.62
			9	-6.645	-844.51
			10	-6.845	-844.42
			11	-6.606	-844.37
			12	-6.802	-844.20
			13	-6.393	-843.92
			15	-6.143	-843.54
			15	-5.898	-843.19
			16	-5.162	-842.63
			17	-4.673	-841.94
L2		L2_DVD-000881	1	-9.088	-847.67
			2	-7.680	-846.03
			3	-7.331	-845.69

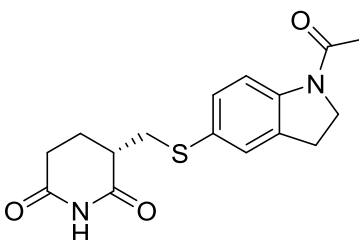
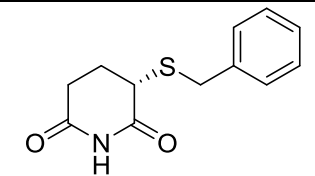
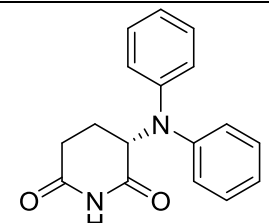
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-024	1	-9.805	-847.55
			2	-8.582	-846.21
			3	-7.935	-845.49
			4	-8.174	-845.36
			5	-7.823	-845.31
			6	-7.722	-845.23
			7	-8.126	-845.10
			8	-7.695	-845.06
			9	-7.622	-845.04
			10	-7.523	-845.04
			11	-7.409	-845.02
			12	-7.665	-844.81
			13	-7.813	-844.81
			14	-7.497	-844.48
			L1		L1_SSS-054
2	-8.632	-846.32			
3	-8.735	-846.20			
4	-8.329	-845.86			
5	-8.255	-845.55			
6	-7.995	-845.48			
7	-7.707	-845.32			
8	-8.281	-845.22			
9	-7.760	-845.16			
10	-7.617	-845.10			
11	-7.467	-845.00			
12	-7.757	-844.91			
13	-7.838	-844.86			
14	-7.706	-844.70			

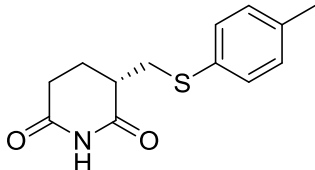
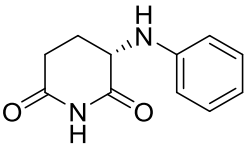
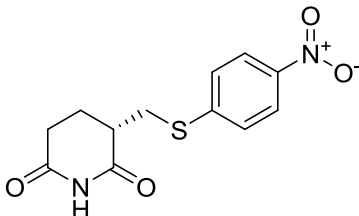
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-020	1	-10.427	-847.35
			2	-9.628	-847.30
			3	-9.644	-847.13
			4	-9.802	-846.89
			5	-9.187	-846.71
			6	-9.158	-846.63
			7	-8.993	-846.24
			8	-8.558	-845.97
			9	-8.309	-845.92
			10	-8.349	-845.61
			11	-7.914	-845.31
			12	-8.111	-845.25
			13	-7.689	-845.23
			14	-7.807	-845.10
			15	-8.329	-845.04
L1		L1_SSS-050	1	-9.838	-847.31
			2	-9.269	-846.71
			3	-9.078	-846.49
			4	-8.929	-846.33
			5	-9.181	-846.31
			6	-8.517	-845.78
			7	-8.727	-845.76
			8	-7.827	-845.30
			9	-8.694	-845.28
			10	-8.428	-845.23
			11	-7.708	-845.06
			12	-7.863	-844.89
			13	-7.859	-844.86
			14	-7.842	-844.65
			15	-7.542	-844.62
			16	-7.393	-844.36
			17	-7.198	-844.31
			18	-7.380	-844.24

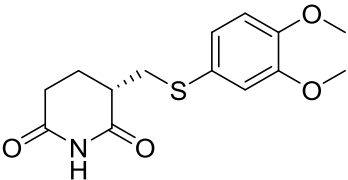
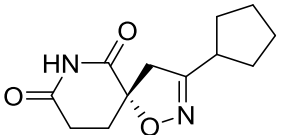
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-063	1	-11.496	-847.29
			2	-10.297	-846.04
			3	-10.568	-845.99
			4	-10.088	-845.98
			5	-10.302	-845.95
			6	-10.406	-845.85
			7	-10.018	-845.56
			8	-9.357	-845.08
			9	-9.011	-844.99
			10	-9.082	-844.93
			11	-9.373	-844.71
			12	-8.120	-844.02
			13	-8.853	-844.00
			14	-7.642	-843.62
			15	-8.072	-843.46
			16	-8.337	-843.16
			17	-8.098	-843.12
			18	-6.720	-841.82
L1		L1_SSS-030	1	-9.216	-847.27
			2	-9.431	-847.02
			3	-8.930	-847.00
			4	-9.053	-846.84
			5	-8.141	-846.75
			6	-7.775	-845.46
L2		L2_DVD-000888	1	-8.677	-845.95
			2	-7.024	-843.81

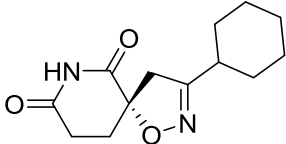
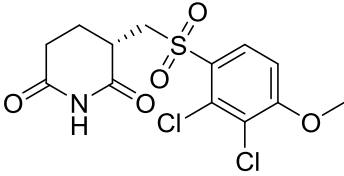
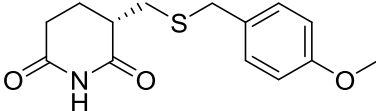
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-003	1	-10.298	-846.91
			2	-9.903	-846.51
			3	-9.945	-846.12
			4	-9.389	-845.39
			5	-9.060	-845.39
			6	-9.509	-845.01
			7	-8.698	-844.77
			8	-8.465	-844.71
			9	-8.266	-844.46
			10	-8.513	-844.38
			11	-8.255	-843.96
			12	-7.468	-843.73
			13	-7.404	-843.67
			14	-5.709	-841.55
L2		L2_DVD-000883	1	-8.175	-846.79
			2	-7.680	-846.38
			3	-7.808	-846.33
			4	-7.520	-846.26
			5	-7.174	-845.41
			6	-6.691	-844.63
			7	-6.664	-844.04
L1		L1_SSS-015	1	-10.066	-846.79
			2	-9.929	-846.64
			3	-9.355	-845.82
			4	-9.302	-845.71
			5	-8.992	-845.69
			6	-8.774	-845.41
			7	-8.502	-845.37
			8	-8.795	-845.25
			9	-8.589	-845.19

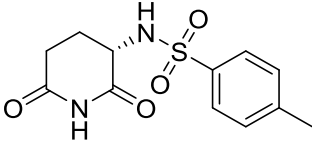
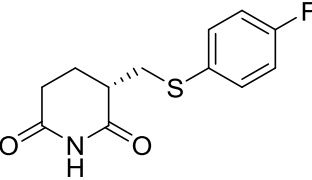
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			10	-8.567	-845.13
			11	-8.610	-845.11
			12	-8.361	-844.97
			13	-8.688	-844.78
			14	-8.078	-843.84
L1		L1_SSS-046	1	-10.753	-846.77
			2	-9.668	-845.55
			3	-9.452	-844.85
			4	-9.357	-844.85
			5	-9.591	-844.83
			6	-8.616	-844.56
			7	-8.981	-844.53
			8	-8.607	-844.28
			9	-8.388	-844.20
			10	-8.141	-844.14
			11	-8.270	-844.08
			12	-8.016	-843.80
			13	-8.451	-843.64
			14	-7.587	-843.59
			15	-8.518	-843.57
			16	-7.844	-843.54
			17	-6.786	-842.47
			18	-5.387	-840.56
L2		L2_145	1	-9.125	-846.77
			2	-8.918	-846.12
			3	-8.862	-845.99
			4	-8.866	-845.96
			5	-8.929	-845.38
			6	-8.192	-845.10
			7	-8.232	-845.09

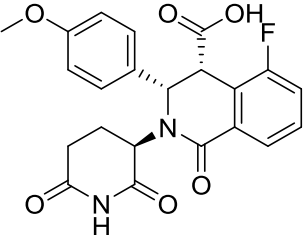
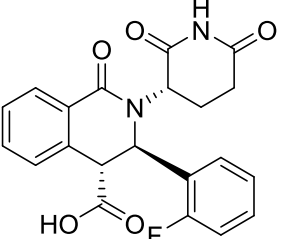
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			8	-7.665	-844.37
			9	-8.111	-844.36
			10	-7.600	-844.16
			11	-7.571	-843.99
			12	-7.137	-843.59
			13	-6.798	-843.28
L2		L2_118	1	-9.714	-846.75
			2	-9.160	-846.45
			3	-8.740	-846.21
			4	-9.069	-846.03
			5	-8.955	-845.75
			6	-8.597	-845.41
			7	-8.517	-845.37
			8	-8.348	-844.57
			9	-8.148	-844.24
			10	-7.584	-843.89
			11	-7.610	-843.88
			12	-7.292	-843.57
L1		L1_SSS-035	1	-9.182	-846.68
			2	-9.427	-846.13
			3	-7.530	-844.70
			4	-7.816	-844.49
			5	-7.507	-844.27
			6	-7.133	-843.73
			7	-6.860	-843.68
			8	-6.104	-842.94
			9	-5.150	-842.05
L1		L1_SSS-028	1	-11.071	-846.62
			2	-9.137	-845.95
			3	-9.763	-845.36
			4	-8.383	-844.31

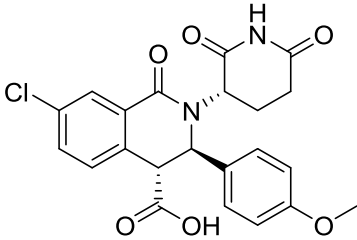
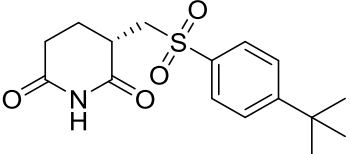
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			5	-8.212	-843.74
			6	-8.074	-843.53
			7	-6.985	-842.41
			8	-4.761	-840.15
L2		L2_DVD-000885	1	-8.750	-846.61
			2	-8.663	-845.97
			3	-8.465	-845.72
			4	-8.190	-845.72
			5	-7.570	-845.21
			6	-7.734	-845.17
			7	-8.268	-845.12
			8	-7.208	-844.67
			9	-6.778	-844.47
			10	-6.973	-843.90
			11	-6.191	-843.17
			12	-5.581	-842.53
			13	-3.424	-840.35
			14	-3.206	-839.92
L1		L1_SSS-004	1	-9.720	-846.60
			2	-8.892	-845.91
			3	-8.983	-845.90
			4	-8.711	-845.37
			5	-8.687	-845.18
			6	-8.272	-845.12
			7	-8.220	-845.07
			8	-8.239	-845.05
			9	-8.290	-845.04
			10	-8.131	-844.92
			11	-8.243	-844.71
			12	-7.855	-844.16
			13	-8.014	-844.11
			14	-8.212	-844.10

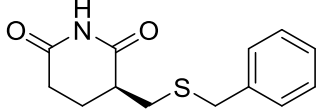
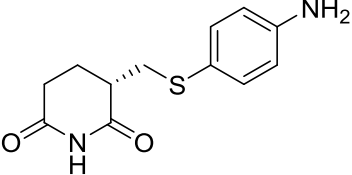
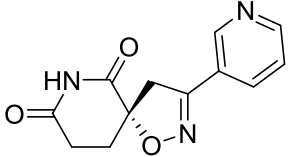
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-019	1	-9.941	-846.49
			2	-9.641	-846.19
			3	-9.400	-846.04
			4	-9.383	-845.99
			5	-9.411	-845.98
			6	-8.966	-845.63
			7	-8.974	-845.52
			8	-8.517	-845.45
			9	-9.108	-845.25
			10	-8.423	-844.98
			11	-8.493	-844.45
			12	-6.529	-842.96
			13	-7.376	-842.81
			14	-6.233	-842.31
L1		L1_SSS-011	1	-9.914	-846.46
			2	-9.376	-845.38
			3	-9.369	-845.34
			4	-9.618	-845.31
			5	-9.708	-844.95
			6	-9.490	-844.72
			7	-8.531	-844.12
			8	-9.001	-844.07
			9	-8.187	-843.68
			10	-7.696	-843.44
			11	-4.615	-839.76

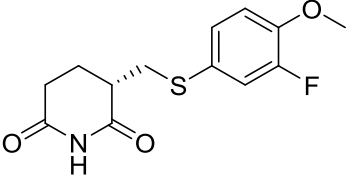
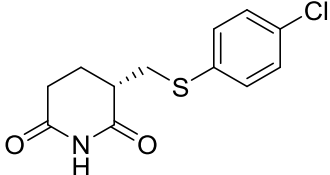
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-016	1	-9.552	-846.44
			2	-9.799	-846.40
			3	-9.661	-846.28
			4	-9.047	-846.13
			5	-9.127	-846.04
			6	-9.467	-845.77
			7	-8.927	-845.73
			8	-9.098	-845.72
			9	-8.690	-845.41
			10	-9.054	-845.33
			11	-8.416	-845.30
			12	-8.426	-845.21
			13	-8.304	-845.07
			14	-8.737	-845.03
			15	-8.193	-844.95
			16	-7.930	-844.76
L1		L1_SSS-052	1	-8.904	-846.38
			2	-7.705	-845.89
			3	-7.520	-845.77
			4	-8.261	-845.74
			5	-8.112	-845.70
			6	-8.217	-845.61
			7	-7.216	-845.51
			8	-7.314	-845.30
			9	-7.378	-845.11
			10	-7.202	-845.09
			11	-7.248	-844.77
			12	-6.431	-844.22
			13	-6.387	-844.20
			14	-5.808	-843.40
			15	-4.643	-842.72
			16	-5.318	-842.69
			17	-5.132	-842.43

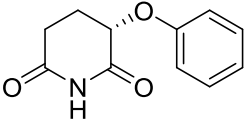
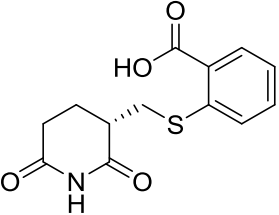
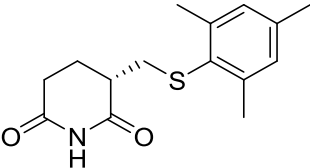
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-026	1	-9.970	-846.30
			2	-9.869	-845.53
			3	-9.475	-844.66
			4	-8.311	-843.97
			5	-8.132	-843.93
			6	-8.070	-843.69
			7	-8.066	-843.51
			8	-7.861	-843.32
			9	-7.646	-843.09
			10	-7.793	-842.93
			11	-7.152	-842.72
			12	-7.470	-842.69
			13	-7.174	-842.37
			14	-6.374	-841.90
			15	-6.331	-841.31
L1		L1_SSS-018	1	-9.844	-846.28
			2	-8.304	-844.97
			3	-8.241	-844.86
			4	-8.373	-844.74
			5	-7.963	-844.20
			6	-7.652	-844.13
			7	-7.445	-843.81
			8	-6.956	-843.55
			9	-7.796	-843.45
L2		L2_086	1	-8.547	-846.24
			2	-8.091	-844.90

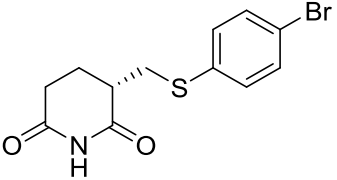
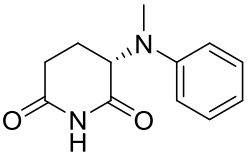
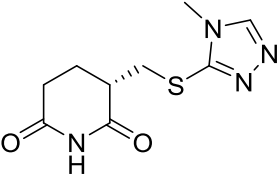
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-067	1	-10.368	-846.23
			2	-10.423	-846.11
			3	-10.347	-846.06
			4	-10.152	-846.01
			5	-9.131	-845.33
			6	-8.815	-844.82
			7	-8.535	-844.63
			8	-8.686	-844.59
			9	-8.845	-844.49
			10	-8.511	-844.38
			11	-8.512	-844.29
			12	-8.452	-844.04
			13	-7.740	-843.83
			14	-7.640	-843.80
			15	-7.716	-843.54
			16	-7.483	-842.97
			17	-6.486	-842.58
L1		L1_SSS-002	1	-9.723	-846.14
			2	-9.460	-845.42
			3	-9.082	-845.39
			4	-8.859	-845.19
			5	-9.104	-845.04
			6	-8.520	-844.86
			7	-8.570	-844.84
			8	-8.361	-844.75
			9	-8.331	-844.68
			10	-8.317	-844.44
			11	-8.186	-844.31
			12	-8.376	-844.29
			13	-7.896	-844.07
			14	-7.213	-843.37
			15	-6.888	-843.35
			16	-7.028	-842.82

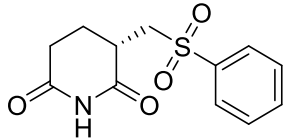
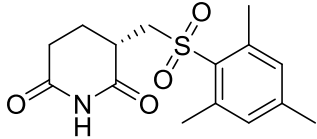
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000882	1	-8.146	-846.12
			2	-7.994	-846.08
			3	-7.273	-845.45
			4	-6.809	-844.98
			5	-6.974	-844.26
L1		L1_SSS-012	1	-10.391	-846.08
			2	-9.118	-845.55
			3	-8.091	-844.47
			4	-8.440	-844.36
			5	-8.300	-844.16
			6	-8.397	-844.12
			7	-8.398	-843.95
			8	-7.947	-843.91
			9	-7.717	-843.88
			10	-7.607	-843.72
			11	-7.473	-843.58
			12	-7.862	-843.33
			13	-8.113	-843.33
			14	-7.336	-842.71
			15	-6.621	-842.41
			16	-6.596	-842.11
			17	-5.453	-841.84
			18	-5.649	-841.77
L1		L1_SSS-006	1	-8.898	-846.07
			2	-8.741	-845.81
			3	-8.710	-845.59
			4	-8.395	-845.07
			5	-8.897	-844.61
			6	-7.858	-844.58
			7	-8.358	-944.16
			8	-6.388	-843.52

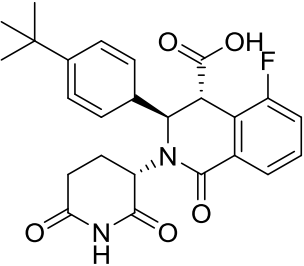
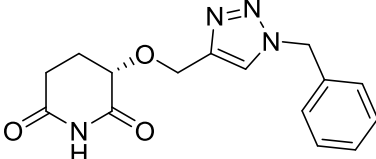
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-005	1	-9.683	-845.97
			2	-9.587	-845.53
			3	-9.430	-845.36
			4	-8.951	-845.24
			5	-8.445	-844.73
			6	-8.474	-844.72
			7	-8.348	-844.60
			8	-8.123	-844.57
			9	-8.355	-844.51
			10	-8.207	-844.33
			11	-7.442	-843.89
			12	-7.402	-843.87
			13	-7.500	-843.67
L2		L2_DVD-000887	1	-8.677	-845.95
			2	-7.024	-843.81
			3	-7.085	-843.64
			4	-6.082	-843.60
			5	-6.755	-843.53
			6	-5.705	-843.17
			7	-5.944	-842.90
			8	-4.703	-841.53
			9	-3.700	-841.03
			10	-4.489	-840.81
L1		L1_SSS-010	1	-8.859	-845.93
			2	-8.830	-845.64
			3	-8.199	-845.55
			4	-8.305	-845.44
			5	-8.529	-845.43
			6	-8.187	-845.02
			7	-8.348	-845.01
			8	-7.999	-844.99
			9	-7.755	-844.89
			10	-7.569	-844.85

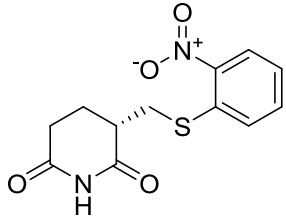
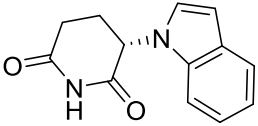
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			11	-7.922	-844.78
			12	-7.703	-844.68
			13	-7.319	-844.33
			14	-7.306	-844.31
			15	-7.616	-844.05
			16	-7.451	-843.76
			17	-7.135	-843.29
			18	-6.727	-843.22
L1		L1_SSS-022	1	-9.852	-845.71
			2	-8.471	-845.30
			3	-8.272	-845.27
			4	-7.777	-844.63
			5	-7.435	-844.56
			6	-8.374	-844.14
			7	-7.588	-844.07
			8	-7.675	-844.05
			9	-7.214	-844.00
			10	-6.966	-843.74
			11	-7.232	-843.71
			12	-7.036	-843.59
			13	-6.796	-843.55
			14	-7.443	-843.52
			15	-6.823	-843.50
			16	-6.388	-842.61
			17	-5.561	-842.16
			18	-5.049	-841.43
L1		L1_SSS-033	1	-8.873	-845.67
			2	-8.019	-845.24
			3	-8.088	-845.18
			4	-7.980	-845.04
			5	-7.896	-844.54

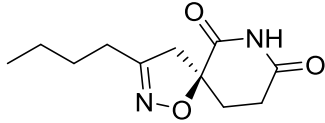
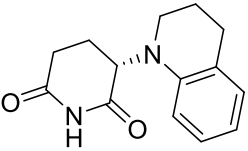
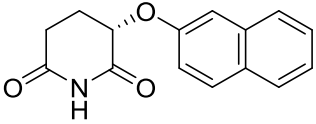
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			6	-7.439	-844.30
			7	-8.149	-843.90
			8	-7.864	-843.70
			9	-6.113	-842.83
			10	-5.493	-842.21
			11	-5.519	-842.12
L1		L1_SSS-014	1	-9.750	-845.66
			2	-9.608	-845.44
			3	-9.585	-845.42
			4	-8.466	-844.66
			5	-8.404	-844.61
			6	-8.765	-844.61
			7	-8.455	-844.45
			8	-8.383	-844.24
			9	-8.159	-844.13
			10	-8.054	-843.53
			11	-8.107	-843.45
			12	-7.075	-843.26
			13	-7.350	-843.11
			14	-7.607	-842.97
			15	-7.040	-842.85
L2		L2_DVD-000895	1	-8.981	-845.64
			2	-9.013	-845.58
			3	-8.806	-845.49
			4	-8.469	-845.43
			5	-8.798	-845.41
			6	-8.523	-844.94
			7	-8.088	-844.77
			8	-7.966	-844.70
			9	-8.053	-844.38

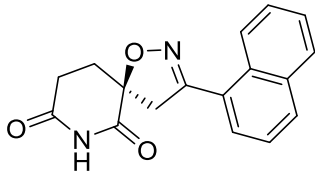
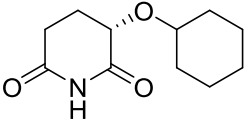
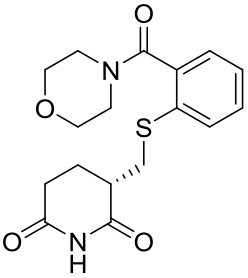
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			10	-7.561	-844.33
			11	-7.656	-844.25
			12	-7.497	-844.22
			13	-7.979	-844.19
			14	-7.285	-843.99
			15	-7.977	-843.84
			16	-7.537	-843.73
			17	-7.461	-843.19
			18	-7.399	-843.00
			L1		L1_SSS-013
2	-9.333	-845.43			
3	-9.648	-845.34			
4	-9.330	-845.31			
5	-9.020	-845.25			
6	-9.273	-845.15			
7	-9.089	-845.13			
7	-9.353	-845.10			
9	-8.520	-844.83			
10	-8.677	-844.66			
11	-8.902	-844.57			
12	-8.331	-844.57			
13	-8.600	-844.27			
14	-8.430	-844.24			
15	-8.078	-844.21			
16	-8.423	-843.89			
17	-8.475	-843.73			
18	-7.809	-843.27			
L2		L2_DVD-000894	1	-8.802	-845.49
			2	-8.176	-845.22
			3	-8.625	-845.07
			4	-9.139	-844.75
			5	-8.158	-844.36

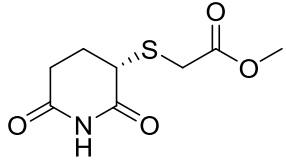
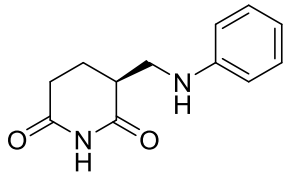
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			6	-7.128	-844.20
			7	-7.968	-843.81
			8	-7.856	-843.52
			9	-7.198	-843.11
			10	-6.501	-842.97
L2		L2_147	1	-8.540	-845.31
			2	-8.379	-845.16
			3	-8.515	-845.07
			4	-8.490	-844.90
			5	-8.410	-844.87
			6	-8.341	-844.83
			7	-8.080	-844.65
			8	-8.028	-844.47
			9	-8.249	-844.37
			10	-7.695	-844.14
			11	-7.854	-844.12
			12	-7.387	-843.99
			13	-7.451	-843.89
			14	-7.422	-843.46
			15	-6.569	-842.41
			16	-5.480	-841.70
L2		L2_DVD-000886	1	-9.088	-845.25
			2	-7.404	-844.09
			3	-6.578	-843.32
			4	-6.339	-843.16
			5	-5.461	-842.16
L2		L2_DVD-000891	1	-9.700	-845.25
			2	-9.868	-845.17
			3	-9.524	-845.11
			4	-9.523	-844.82
			5	-8.318	-843.11

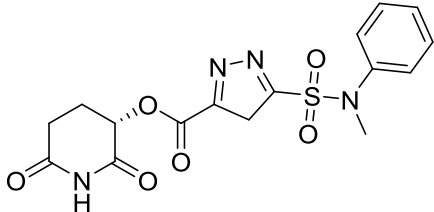
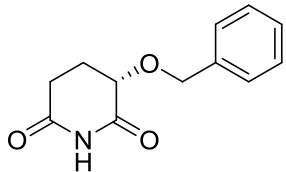
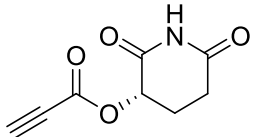
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			6	-7.074	-842.77
			7	-7.173	-842.75
			8	-7.027	-842.48
			9	-6.355	-841.52
			10	-6.473	-841.45
L2		L2_115	1	-10.475	-845.17
			2	-9.440	-844.61
			3	-9.263	-844.31
			4	-8.658	-844.00
			5	-9.024	-843.79
			6	-8.434	-843.68
			7	-8.263	-842.70
			8	-7.858	-842.34
L2		L2_DVD-000880	1	-7.960	-845.07
			2	-8.344	-844.78
			3	-8.891	-844.69
			4	-7.719	-844.41
			5	-5.339	-842.04
L1		L1_SSS-048	1	-9.758	-844.91
			2	-9.976	-844.59
			3	-8.892	-844.21
			4	-8.622	-843.82
			5	-8.573	-843.71
			6	-8.484	-843.57
			7	-8.567	-843.47
			8	-7.733	-843.08
			9	-7.917	-843.00
			10	-8.773	-842.69
			11	-7.431	-842.58
			12	-7.866	-842.12
			13	-7.600	-841.84
			14	-7.227	-841.71

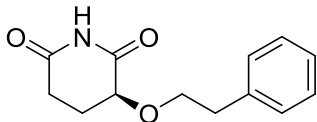
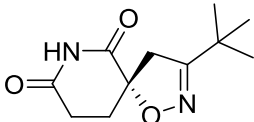
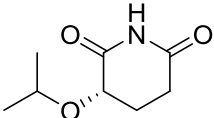
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000879	1	-8.980	-844.90
			2	-8.986	-844.82
			3	-8.766	-844.33
			4	-7.775	-843.62
			5	-7.349	-843.53
			6	-7.981	-843.49
			7	-7.325	-843.09
			8	-7.127	-843.05
			9	-6.972	-843.01
			10	-7.441	-842.96
			11	-6.662	-842.72
			12	-6.800	-842.71
			13	-6.635	-842.61
			14	-6.439	-842.55
			15	-6.416	-842.47
			16	-7.028	-842.38
			17	-6.742	-841.99
L1		L1_SSS-055	1	-8.503	-844.72
			2	-8.403	-844.35
			3	-7.989	-844.11
			4	-7.853	-844.10
			5	-7.913	-844.09
			6	-7.227	-843.40
			7	-7.315	-843.28
			8	-7.491	-843.20
			9	-7.404	-843.10
			10	-7.513	-843.02
			11	-6.774	-841.80
			12	-6.212	-841.19

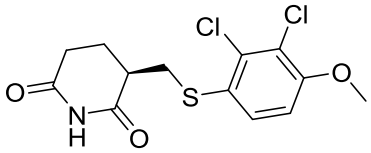
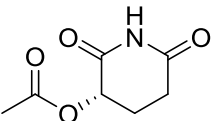
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000893	1	-9.375	-844.70
			2	-9.332	-844.65
			3	-8.923	-844.63
			4	-8.604	-843.90
			5	-8.560	-843.73
			6	-8.338	-843.67
			7	-7.612	-842.80
			8	-7.645	-842.78
			9	-7.261	-842.32
			10	-6.693	-842.02
			11	-6.971	-841.92
			12	-6.336	-841.82
			13	-6.404	-841.57
			14	-6.506	-841.37
L2		L2_DVD-000874	1	-8.278	-844.68
			2	-8.535	-844.66
			3	-8.528	-844.46
			4	-8.625	-844.45
			5	-8.426	-844.38
			6	-8.403	-844.34
			7	-8.224	-844.20
			8	-7.650	-842.97
			9	-6.536	-842.10
			10	-6.802	-842.06
			11	-5.924	-841.66
L2		L2_DVD-000884	1	-7.131	-844.65
			2	-7.208	-844.49
			3	-6.869	-844.46
			4	-6.949	-844.44
			5	-6.828	-844.34
			6	-6.764	-844.33
			7	-6.538	-844.28

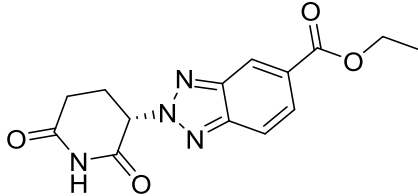
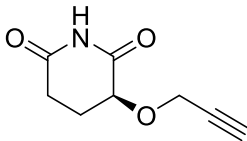
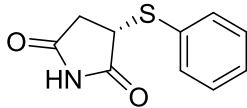
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			8	-6.780	-844.25
			9	-7.271	-844.16
			10	-6.502	-843.63
			11	-6.495	-843.62
			12	-6.422	-843.49
			13	-5.782	-842.57
			14	-5.307	-842.07
L2		L2_DVD-000892	1	-9.071	-844.63
			2	-8.831	-844.07
			3	-8.420	-843.88
			4	-7.981	-843.47
			5	-7.450	-842.92
			6	-7.316	-842.86
			7	-7.038	-842.26
			8	-7.173	-841.94
			9	-7.130	-841.86
			10	-6.604	-841.76
			11	-6.630	-841.37
			12	-5.694	-840.29
			13	-5.830	-840.15
L2		L2_144	1	-8.370	-844.38
			2	-7.779	-843.87
			3	-7.780	-843.79
			4	-7.700	-843.70
			5	-7.860	-843.60
			6	-7.520	-843.13
			7	-6.447	-842.60
L2		L2_DVD-000875	1	-7.030	-844.20
			2	-6.861	-844.19
			3	-6.792	-844.18
			4	-6.976	-843.99

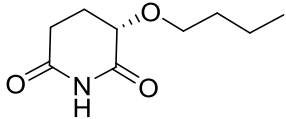
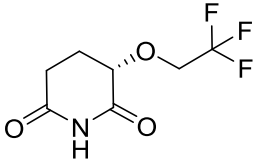
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			5	-6.766	-843.49
			6	-6.799	-842.79
			7	-5.240	-842.39
			8	-5.274	-841.60
			9	-4.557	-840.51
L1		L1_SSS-066	1	-8.758	-843.98
			2	-8.455	-843.26
			3	-7.750	-843.18
			4	-7.291	-843.02
			5	-7.244	-842.95
			6	-7.453	-842.73
			7	-7.674	-842.16
			8	-6.822	-841.99
			9	-6.813	-841.78
			10	-5.5-2	-840.67
			11	-6.043	-840.31
			12	-4.041	-839.02
L2		L2_DVD-000878	1	-6.983	-843.94
			2	-6.738	-843.67
			3	-7.196	-843.64
			4	-7.324	-843.62
			5	-6.177	-842.80
			6	-5.985	-842.75
			7	-6.046	-842.55
			8	-5.863	-841.98
			9	-5.861	-841.84
			10	-5.653	-841.76
			11	-5.684	-841.42
			12	-5.300	-841.42

Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000896	1	-8.159	-843.85
			2	-8.080	-843.83
			3	-7.974	-843.65
			4	-7.902	-843.53
			5	-7.809	-843.48
			6	-7.959	-843.19
			7	-7.475	-842.51
			8	-7.287	-842.43
			9	-6.620	-842.18
			10	-7.274	-842.17
			11	-7.137	-842.00
			12	-6.700	-841.72
			13	-6.371	-841.60
			14	-6.160	-841.31
			15	-5.996	-840.85
L2		L2_DVD-000876	1	-7.311	-843.71
			2	-7.147	-843.66
			3	-7.275	-843.64
			4	-6.998	-843.43
			5	-7.070	-843.29
			6	-7.098	-843.26
			7	-6.951	-843.21
			8	-6.728	-842.85
			9	-6.661	-842.81
			10	-6.384	-842.51
			11	-6.092	-842.43
			12	-5.530	-841.74
			13	-5.442	-841.26
			14	-4.658	-840.63
L1		L1_SSS-056	1	-5.625	-842.82
			2	-5.600	-842.79
			3	-5.375	-842.43
			4	-5.330	-842.29

Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6
			5	-5.413	-842.28
			6	-5.204	-842.08
			7	-5.625	-841.77
			8	-4.547	-840.76
L2		L2_DVD-000889	1	-7.014	-842.57
			2	-7.201	-841.97
			3	-7.024	-841.95
			4	-7.256	-841.92
			5	-7.041	-841.91
			6	-7.001	-841.84
			7	-6.569	-841.71
			8	-6.330	-841.66
			9	-6.740	-841.47
			10	-6.818	-841.39
			11	-5.483	-840.95
			12	-5.689	-840.85
			13	-6.236	-840.59
			14	-5.347	-840.39
			15	-5.673	-840.33
			16	-4.539	-839.51
			17	-4.600	-839.47
L2		L2-DVD-000890	1	-7.518	-842.33
			2	-7.299	-842.09
			3	-7.491	-842.07
			4	-7.234	-842.06
			5	-7.369	-842.02
			6	-7.147	-841.96
			7	-7.294	-841.70
			8	-7.232	-841.64
			9	-6.888	-841.27
			10	-6.210	-841.26
			11	-6.375	-841.26
			12	-6.181	-841.25

Продолжение таблицы А.1

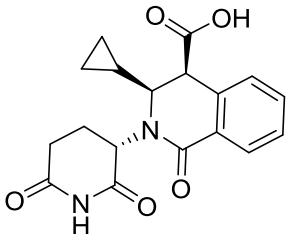
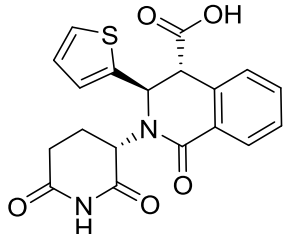
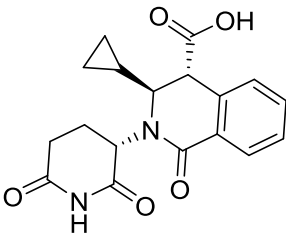
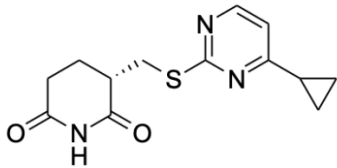
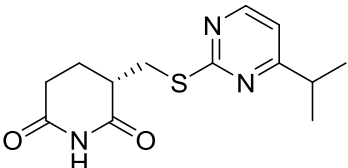
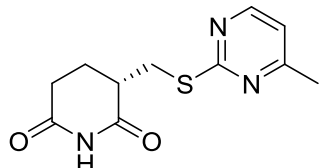
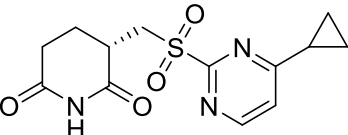
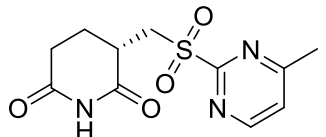
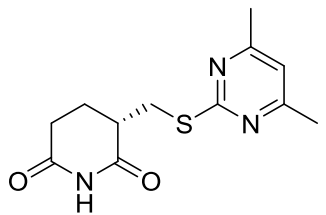
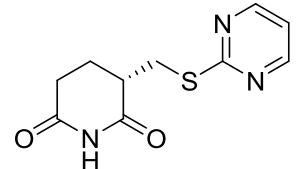
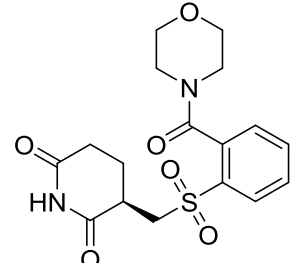
1	2	3	4	5	6
			13	-6.357	-841.22
			14	-6.766	-840.93
			15	-6.052	-840.82
			16	-6.075	-840.41
			17	-5.646	-840.23
L3		L3_ZJB-9	1	-6.734	-841.56
L3		L3_ZJB-12	1	-6.489	-840.91
L3		L3_ZJB-8	1	-6.431	-840.83
			2	-5.925	-840.70

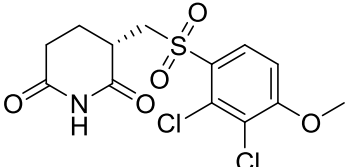
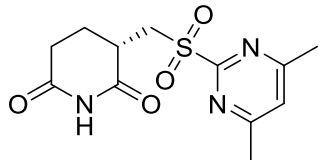
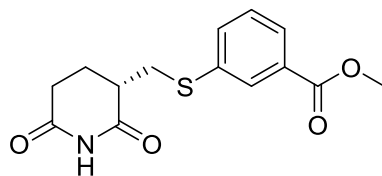
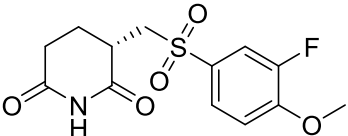
Таблица А.2 – Результаты индуцированной стыковки в комплекс CRBN-IKZF1 (PDB ID: 8D80)

Библиотека	Структура соединения	Номер соединения	Ранг позы	IFD Score, ккал/моль	XP GScore, ккал/моль
1	2	3	4	5	6
L1		L1-SSS-060	1	-8.761	-821.01
			2	-8.462	-820.88
			3	-8.753	-820.38
			4	-8.367	-819.85
			5	-8.133	-819.74
			6	-7.996	-819.59
			7	-8.288	-819.47
			8	-7.990	-819.24
			9	-7.731	-818.80
			10	-6.874	-818.42
			11	-5.423	-816.54
L1		L1_SSS-061	1	-8.152	-820.34
			2	-7.900	-820.24
			3	-8.621	-820.19
			4	-5.617	-817.63
L1		L1_SSS-008	1	-8.062	-819.11
			2	-8.066	-819.02
			3	-7.779	-818.66
			4	-8.173	-818.63
			5	-7.600	-818.52
			6	-8.101	-818.04
			7	-7.639	-817.96
			8	-7.484	-817.61
			9	-6.583	-817.47
			10	-6.700	-817.06
			11	-5.938	-816.439

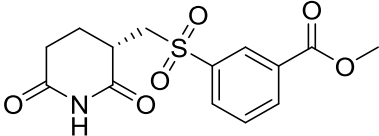
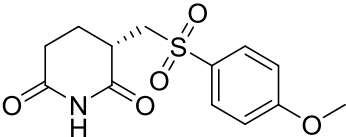
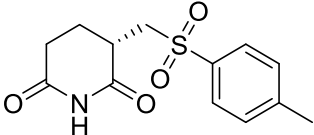
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-039	1	-9.299	-818.63
			2	-8.399	-817.49
			3	-7.337	-816.42
			4	-7.324	-816.38
			5	-7.743	-816.01
L1		L1_SSS-043	1	-8.020	-818.46
			2	-7.646	-817.72
L1		L1_SSS-064	1	-8.217	-817.84
L1		L1_SSS-007	1	-7.812	-817.79
			2	-7.607	-817.77
			3	-7.418	-817.05
			4	-5.714	-814.81
			5	-5.298	-814.50
L1		L1_SSS-049	1	-9.904	-817.17
			2	-8.448	-815.46
			3	-7.958	-813.90
			4	-5.121	-811.20

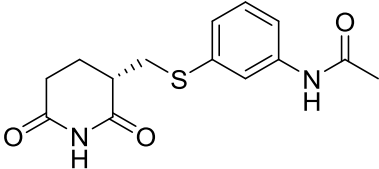
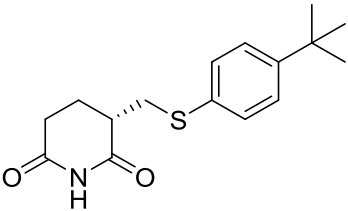
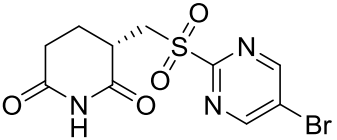
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-035	1	-8.476	-817.00
			2	-9.249	-816.72
			3	-8.447	-816.14
			4	-8.370	-815.58
			5	-8.221	-815.40
L1		L1_SSS-037	1	-7.362	-816.87
L1		L1_SSS-047	1	-8.969	-816.84
			2	-8.942	-816.74
			3	-8.619	-816.36
			4	-8.326	-815.92
			5	-8.427	-815.81
			6	-8.465	-815.58
			7	-8.253	-815.38
			8	-8.245	-815.29
			9	-8.084	-815.01
			10	-7.547	-814.73
			11	-8.274	-814.69
			12	-7.866	-814.30
			13	-6.423	-814.08
L1		L1_SSS-034	1	-9.343	-816.69
			2	-9.105	-816.27
			3	-8.189	-815.44
			4	-8.455	-815.38
			5	-8.239	-814.92
			6	-8.034	-814.78

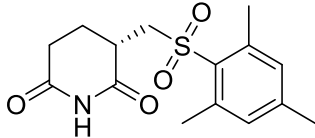
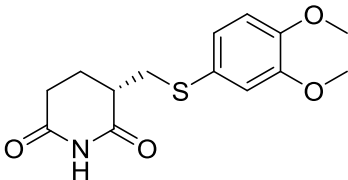
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			9	-7.988	-814.50
			10	-7.363	-814.49
			11	-7.037	-814.24
			12	-6.443	-813.19
			13	-5.925	-812.55
			14	-5.100	-811.54
			15	-3.051	-809.16
L1		L1_SSS-057	1	-9.156	-816.68
			2	-8.903	-816.35
			3	-8.192	-815.07
			4	-7.501	-813.82
L1		L1_SSS-050	1	-9.180	-816.67
			2	-9.266	-816.57
			3	-8.295	-814.49
			4	-7.389	-814.30
			5	-7.824	-814.21
			6	-7.610	-814.07
			7	-6.975	-813.93
			8	-6.108	-812.50
L1		L1_SSS-021	1	-8.635	-816.63
			2	-9.036	-816.23
			3	-8.697	-816.15
			4	-8.385	-816.15
			5	-8.535	-816.07
			6	-9.186	-815.92
			7	-8.267	-815.63
			8	-8.308	-815.45
			9	-8.208	-815.42
			10	-8.252	-815.36
			11	-8.838	-815.29
			12	-8.794	-815.04
			13	-8.251	-814.99
			14	-8.528	-814.89

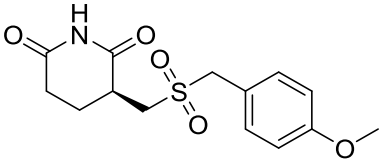
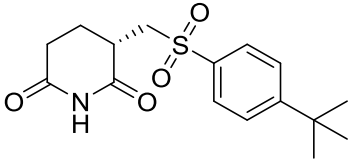
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-020	1	-8.924	-816.47
			2	-8.460	-816.05
			3	-8.833	-815.70
			4	-8.114	-815.32
			5	-7.945	-815.25
			6	-8.039	-815.09
			7	-7.746	-815.01
			8	-8.312	-814.70
			9	-5.991	-812.71
			10	-5.080	-812.67
			11	-5.328	-812.67
			12	-4.738	-811.18
L1		L1_SSS-058	1	-9.273	-816.43
			2	-9.271	-816.29
			3	-9.207	-816.26
			4	-9.123	-815.84
			5	-9.104	-815.66
			6	-9.340	-815.66
			7	-9.060	-815.53
			8	-8.710	-815.25
			9	-8.463	-814.79
			10	-8.234	-814.64
			11	-8.191	-814.36
			12	-6.685	-812.79
L1		L1_SSS-051	1	-7.896	-816.41
			2	-7.229	-816.06
			3	-7.550	-815.57

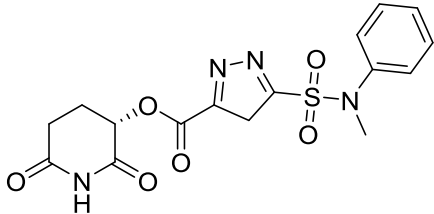
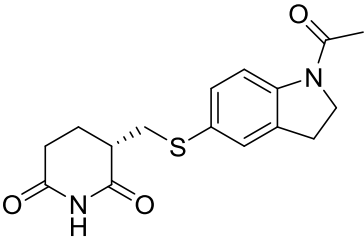
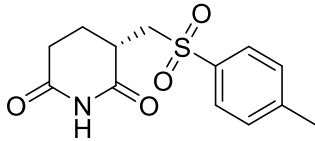
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-033	1	-9.736	-816.20
			2	-9.417	-815.87
			3	-9.063	-815.84
			4	-9.208	-815.73
			5	-8.931	-814.93
			6	-8.695	-814.89
			7	-7.718	-813.90
			8	-7.993	-813.84
			9	-7.936	-813.56
			10	-7.883	-813.55
			11	-7.355	-813.26
			12	-7.652	-813.23
			L1		L1_SSS-046
2	-8.256	-815.24			
3	-8.910	-815.05			
4	-7.786	-814.73			
5	-8.496	-814.64			
6	-8.223	-814.42			
7	-8.538	-814.40			
8	-8.112	-814.15			
9	-8.001	-813.89			
10	-7.663	-813.72			
11	-7.092	-813.22			
12	-5.055	-811.83			

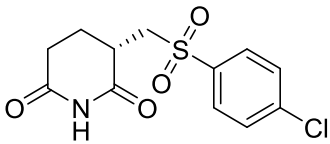
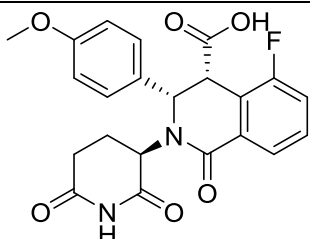
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-029	1	-8.846	-816.06
			2	-8.167	-815.31
			3	-8.705	-815.15
			4	-7.954	-815.04
			5	-8.422	-814.87
			6	-8.390	-814.53
			7	-7.883	-814.17
			8	-7.745	-814.06
			9	-7.041	-813.27
			10	-5.755	-812.69
L1		L1_SSS-052	1	-8.880	-816.06
			2	-8.500	-815.70
			3	-8.849	-815.57
			4	-8.273	-815.34
			5	-8.389	-815.15
			6	-8.011	-815.00
			7	-8.596	-814.97
			8	-7.928	-814.89
			9	-8.381	-814.88
			10	-8.192	-814.88
			11	-8.261	-814.81
			12	-8.259	-814.77
			13	-7.954	-814.75
			15	-8.239	-814.71
			15	-7.384	-813.82
			16	-6.686	-812.42

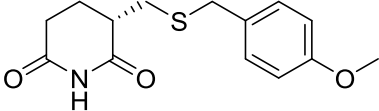
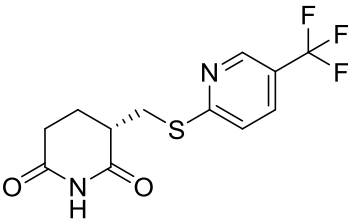
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000893	1	-9.557	-816.06
			2	-8.083	-814.73
			3	-6.846	-813.69
			4	-6.704	-813.56
			5	-7.682	-813.53
			6	-6.844	-813.09
			7	-6.321	-812.68
			8	-6.117	-812.67
			9	-5.908	-812.49
			10	-5.403	-812.14
			11	-2.861	-809.29
L1		L1_SSS-063	1	-9.108	-816.03
			2	-9.025	-815.92
			3	-9.212	-815.81
			4	-8.909	-815.35
			5	-8.898	-815.18
			6	-8.744	-815.17
			7	-8.718	-815.15
			8	-8.748	-815.14
			9	-8.880	-814.95
			10	-8.634	-814.86
			11	-8.660	-814.63
			12	-8.629	-814.43
			13	-8.007	-813.46
			14	-7.423	-813.04
L1		L1_SSS-021	1	-8.635	-816.63
			2	-9.036	-816.23
			3	-8.697	-816.15
			4	-8.385	-816.15
			5	-8.535	-816.07
			6	-9.186	-815.92

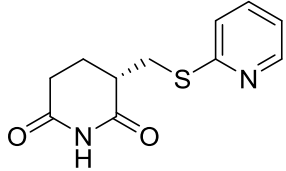
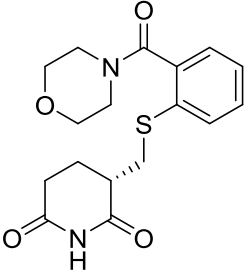
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			7	-8.267	-815.63
			8	-8.308	-815.45
			9	-8.208	-815.42
			10	-8.252	-815.36
			11	-8.838	-815.29
			12	-8.794	-815.04
			13	-8.251	-814.99
			14	-8.528	-814.89
			15	-7.589	-814.76
			16	-7.917	-814.74
L1		L1_SSS-025	1	-9.082	-815.84
			2	-9.085	-815.60
			3	-8.352	-815.44
			4	-8.473	-815.29
			5	-8.314	-814.52
			6	-7.934	-814.24
			7	-7.346	-813.48
			8	-6.104	-812.10
			9	-5.540	-812.07
L1		L1_SSS-019	1	-8.512	-815.69
			2	-8.056	-813.97

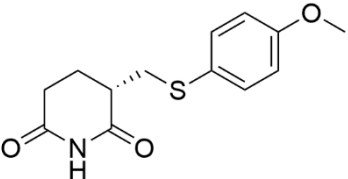
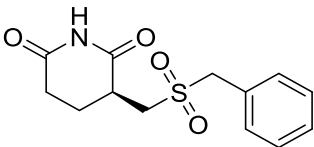
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-028	1	-9.401	-815.51
			2	-9.403	-815.22
			3	-8.649	-814.88
			4	-8.850	-814.81
			5	-9.013	-814.51
			6	-8.840	-814.21
			7	-9.057	-814.20
			8	-8.130	-814.19
			9	-8.446	-814.06
			10	-8.074	-813.94
			11	-8.158	-813.86
			12	-8.307	-813.69
			13	-8.108	-813.68
			14	-7.909	-813.61
			15	-8.013	-813.45
			16	-7.901	-813.41
			17	-8.057	-812.83
			18	-6.987	-812.58
			19	-6.748	-812.10
L1		L1_SSS-65	1	-7.836	-815.45
			2	-7.867	-815.43
			3	-7.704	-815.11
			4	-7.644	-815.01
			5	-7.890	-814.92
			6	-7.601	-814.78
			7	-7.826	-814.53
			8	-6.970	-814.43
			9	-7.378	-814.36

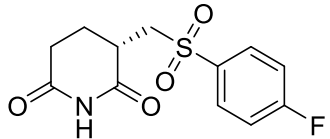
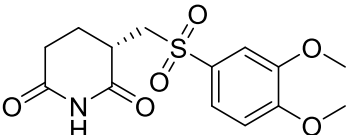
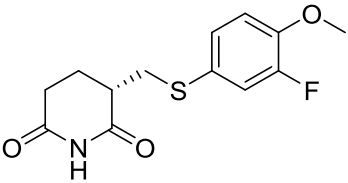
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			10	-7.525	-814.26
			11	-7.068	-814.22
			12	-7.652	-814.16
			13	-6.831	-814.12
			14	-6.736	-813.82
			15	-6.893	-813.58
			16	-6.141	-812.91
			17	-2.977	-809.77
L1		L1_SSS-009	1	-7.866	-815.35
			2	-7.846	-815.30
			3	-7.946	-815.19
			4	-7.827	-815.12
			5	-7.778	-815.07
			6	-7.856	-815.01
			7	-7.794	-814.89
			8	-7.755	-814.88
			9	-7.836	-814.77
			10	-7.725	-814.57
			11	-7.272	-814.55
			12	-7.762	-814.53
			13	-7.477	-814.41
			14	-7.166	-814.01
			15	-7.089	-813.79
L1		L1_SSS-048	1	-9.680	-815.30
			2	-8.799	-814.82
			3	-10.046	-814.78
			4	-9.067	-814.16
			5	-8.635	-814.07
			6	-9.391	-813.96
			7	-9.026	-813.74
			8	-8.020	-813.71

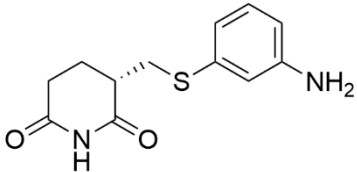
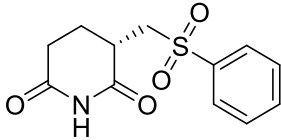
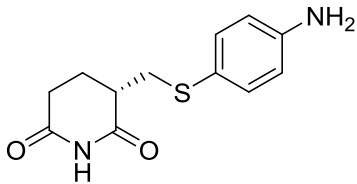
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			9	-8.020	-813.61
			10	-8.400	-813.17
			11	-5.625	-810.82
			12	-3.829	-809.23
L1		L1_SSS-045	1	-8.572	-815.17
			2	-8.449	-815.12
			3	-8.415	-815.05
			4	-8.445	-814.66
			5	-8.161	-814.65
			6	-8.549	-814.63
			7	-7.954	-814.36
			8	-7.532	-813.81
			9	-7.801	-813.72
			10	-7.579	-813.62
			11	-7.521	-813.50
			12	-7.788	-813.36
			13	-7.982	-813.23
			14	-4.727	-810.78
L1		L1_SSS-027	1	-8.666	-815.13
			2	-8.708	-814.57
			3	-7.869	-814.26
			4	-8.432	-814.16
			5	-8.429	-814.07
			6	-7.639	-813.90
			7	-8.675	-813.88
			8	-8.728	-813.86
			9	-8.203	-813.57
			10	-5.406	-811.37

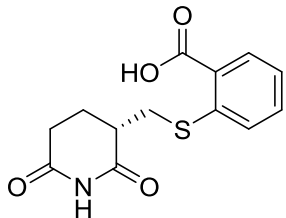
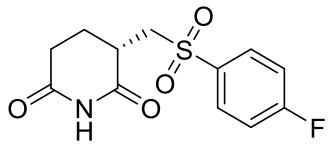
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-054	1	-9.044	-815.11
			2	-8.630	-814.76
			3	-8.565	-813.89
			4	-8.037	-813.56
			5	-7.841	-813.49
			6	-7.669	-813.24
			7	-7.736	-812.81
			8	-6.233	-812.08
			9	-6.507	-811.57
			10	-6.185	-811.41
			11	-5.882	-810.96
L1		L1_SSS-053	1	-8.626	-815.08
			2	-8.414	-814.85
			3	-8.644	-814.82
			4	-8.342	-814.75
			5	-8.486	-814.68
			6	-8.224	-813.93
			7	-8.086	-813.60
L1		L1_SSS-067	1	-8.549	-814.96
			2	-8.808	-814.95
			3	-8.776	-814.88
			4	-8.564	-814.81
			5	-8.343	-814.75
			6	-8.496	-814.55
			7	-8.208	-814.53
			8	-8.852	-814.52
			9	-8.585	-814.45
			10	-8.019	-813.91
			11	-7.810	-813.83

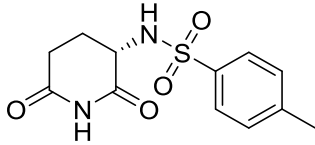
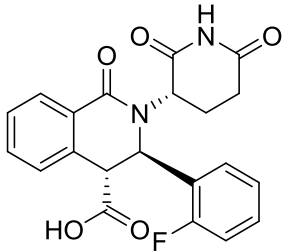
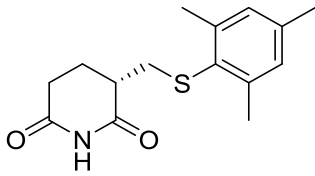
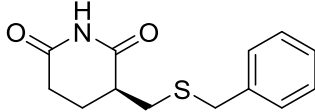
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			12	-7.815	-813.26
			13	-7.421	-813.24
			14	-7.640	-813.12
			15	-7.784	-813.03
			16	-6.833	-812.01
L1		L1_SSS-017	1	-9.646	-814.96
			2	-9.573	-814.94
			3	-9.640	-814.71
			4	-9.575	-814.59
			5	-9.844	-814.54
			6	-9.469	-814.52
			7	-9.496	-814.27
			8	-9.132	-814.02
			9	-8.616	-813.86
			10	-9.042	-813.81
			11	-8.836	-813.57
			12	-8.624	-813.06
			13	-8.433	-812.90
			14	-8.113	-812.78
			15	-7.510	-812.68
			16	-7.500	-812.35
L1		L1_SSS-022	1	-8.899	-814.94
			2	-8.280	-814.00
			3	-8.386	-813.38
			4	-7.818	-813.34
			5	-7.451	-812.79
			6	-7.832	-812.69
			7	-6.072	-811.43
L1		L1_SSS-018	1	-8.844	-814.93
			2	-8.875	-814.87
			3	-8.754	-814.81
			4	-8.733	-814.69
			5	-8.620	-814.65

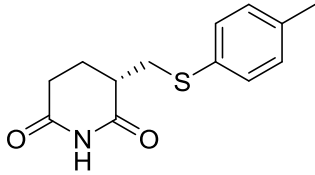
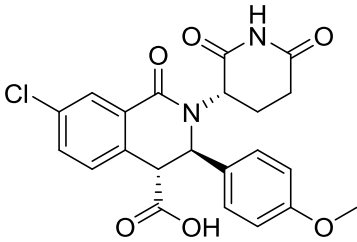
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			6	-8.473	-814.56
			7	-8.478	-814.11
			8	-8.294	-813.73
			9	-8.445	-813.57
			10	-7.425	-812.41
			11	-7.061	-812.08
L1		L1_SSS-012	1	-9.366	-814.91
			2	-8.728	-814.06
			3	-8.007	-813.97
			4	-7.656	-813.93
			5	-8.417	-813.89
			6	-8.520	-813.84
			7	-7.352	-813.84
			8	-8.530	-813.68
			9	-7.827	-813.53
			10	-6.441	-812.67
			11	-6.171	-811.98
			12	-6.111	-811.74
			13	-5.419	-810.88
L1		L1_SSS-024	1	-8.896	-814.87
			2	-8.443	-814.53
			3	-8.758	-814.07
			4	-8.055	-813.72
			5	-8.330	-813.44
			6	-7.856	-813.33
			7	-7.689	-813.24
			8	-6.347	-811.43
			9	-5.724	-810.97

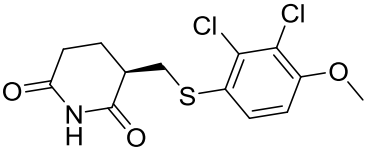
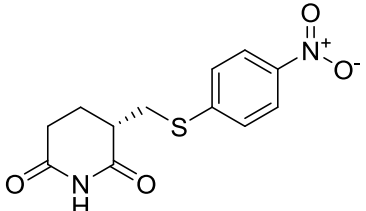
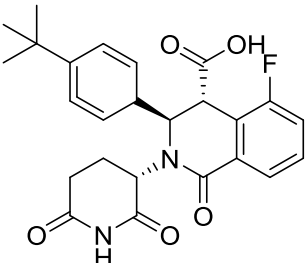
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000885	1	-8.100	-814.67
			2	-7.836	-814.56
			3	-7.508	-814.27
			4	-7.282	-814.09
			5	-7.389	-813.90
			6	-7.087	-813.71
			7	-6.772	-813.46
			8	-6.252	-813.43
			9	-7.134	-813.24
			10	-6.657	-813.15
			11	-6.543	-812.40
L1		L1_SSS-011	1	-8.870	-814.57
			2	-8.797	-814.26
			3	-8.413	-814.26
			4	-8.529	-813.70
			5	-8.207	-813.49
			6	-8.434	-812.79
			7	-7.945	-812.29
			8	-6.949	-812.02
			9	-7.072	-811.84
L1		L1_SSS-006	1	-9.492	-814.55
			2	-8.937	-814.16
			3	-7.772	-813.19
			4	-7.708	-812.73
			5	-7.091	-812.11
			6	-7.100	-811.85
			7	-6.924	-811.63
			8	-6.513	-810.76
L1		L1_SSS-026	1	-8.628	-814.31
			2	-7.989	-813.07
			3	-7.800	-812.93
			4	-7.582	-812.73
			5	-7.628	-812.67

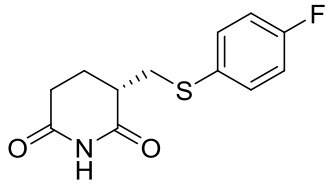
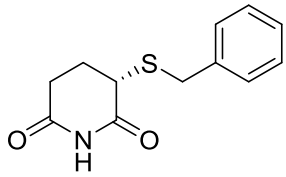
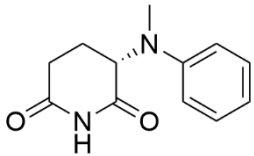
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			6	-7.548	-812.66
			7	-7.064	-812.38
			8	-8.151	-812.35
			9	-7.656	-812.34
			10	-6.702	-811.99
			11	-7.047	-811.83
			12	-7.022	-811.72
			13	-4.855	-809.62
L1		L1_SSS-003	1	-8.360	-814.21
			2	-8.341	-814.07
			3	-8.303	-814.04
			4	-8.593	-813.94
			5	-8.077	-813.69
			6	-7.886	-813.55
			7	-7.917	-813.37
			8	-8.085	-813.31
			9	-8.222	-812.73
			10	-7.387	-812.38
			11	-7.121	-812.33
			12	-7.056	-812.25
			13	-7.114	-811.97
			14	-6.764	-811.65
L1		L1_SSS-016	1	-8.881	-814.01
			2	-8.335	-812.97
			3	-8.539	-812.95
			4	-8.178	-812.48
			5	-8.146	-812.41
			6	-7.718	-812.38
			7	-7.924	-812.33

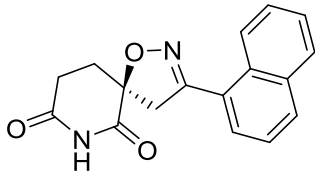
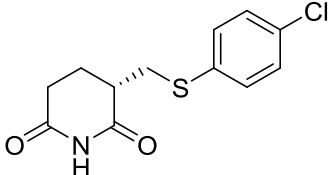
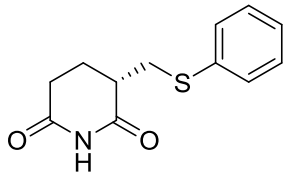
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			8	-8.061	-812.31
			9	-7.561	-811.75
			10	-7.546	-811.74
			11	-7.371	-811.63
			12	-6.614	-810.60
L1		L1_SSS-066	1	-8.465	-813.84
			2	-8.101	-813.52
			3	-7.872	-813.08
			4	-8.073	-812.88
			5	-7.616	-812.56
			6	-7.911	-812.21
L1		L1_SSS-015	1	-8.323	-813.59
			2	-8.253	-813.19
			3	-7.975	-812.87
			4	-7.884	-812.69
			5	-7.490	-812.24
			6	-7.113	-811.67
			7	-7.325	-811.53
			8	-6.840	-811.08
			9	-5.961	-809.98
L1		L1_SSS-014	1	-8.300	-813.58
			2	-8.213	-813.39
			3	-8.241	-813.24
			4	-8.212	-813.23
			5	-8.059	-812.75
			6	-7.813	-812.43
			7	-7.923	-812.39
			8	-7.602	-812.32
			9	-7.792	-811.96
			10	-7.346	-811.75
			11	-6.527	-811.65
			12	-6.310	-810.84
			13	-5.887	-810.09
			14	-4.008	-808.64

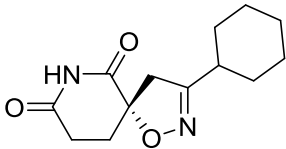
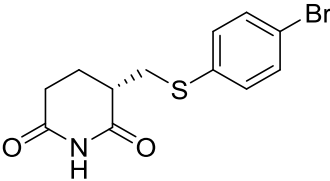
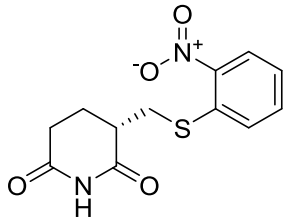
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L1		L1_SSS-004	1	-8.058	-813.58
			2	-7.968	-813.25
			3	-7.996	-812.91
			4	-7.511	-812.84
			5	-7.737	-812.56
			6	-7.918	-812.48
			7	-7.641	-812.47
			8	-7.665	-812.35
			9	-7.554	-812.29
			10	-6.796	-811.73
			11	-6.880	-811.67
			12	-7.207	-811.66
			L1		L1_SSS-030
23	-8.169	-813.42			
4	-8.034	-813.14			
5	-7.816	-812.77			
6	-7.453	-812.44			
7	-7.371	-812.10			
8	-7.311	-812.05			
9	-7.008	-812.02			
10	-7.656	-812.00			
11	-7.480	-811.98			
12	-7.268	-811.64			
L2		L2_DVD-000877			
			2	-8.169	-813.42
			3	-8.034	-813.14
			4	-7.816	-812.77
			5	-7.453	-812.44
			6	-7.371	-812.10
			7	-7.311	-812.05

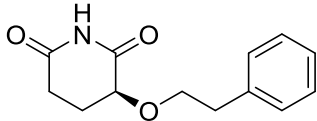
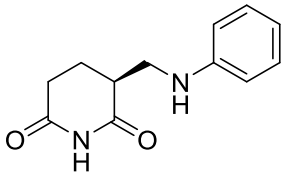
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			8	-7.008	-812.02
			9	-7.656	-812.00
			10	-7.480	-811.98
			11	-7.268	-811.64
			12	-5.954	-810.63
L2		L2_115	1	-9.712	-813.33
L1		L1_SSS-002	1	-8.805	-813.00
			2	-7.698	-811.50
			3	-6.966	-811.08
			4	-8.082	-811.06
			5	-7.873	-811.01
			6	-7.003	-810.75
			7	-6.715	-810.45
			8	-7.087	-810.35
			9	-6.928	-809.79
			10	-6.004	-809.25
			11	-5.431	-808.73
L1		L1_SSS-001	1	-8.066	-812.87
			2	-8.245	-812.76
			3	-7.877	-812.37
			4	-8.000	-812.28
			5	-7.742	-812.02

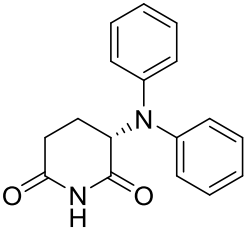
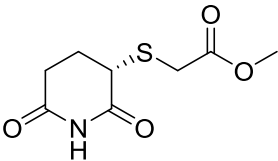
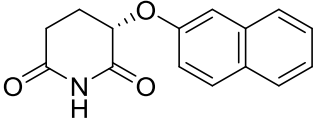
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			6	-7.378	-811.34
			7	-7.466	-811.25
			8	-7.768	-811.19
			9	-6.585	-810.84
L2		L2_118	1	-9.577	-812.87
			2	-9.093	-811.84
			3	-6.693	-809.92
L1		L1_SSS-005	1	-8.269	-812.85
			2	-8.385	-811.96
			3	-7.403	-811.65
			4	-7.693	-811.51
			5	-7.430	-811.04
			6	-7.844	-811.01
			7	-7.065	-810.96
			8	-6.919	-810.76
			9	-7.326	-810.68
			10	-6.879	-810.57
			11	-6.625	-810.53
			12	-6.743	-810.45
			13	-6.389	-810.39
			14	-6.931	-810.09
			15	-5.363	-808.58
L1		L1_SSS-013	1	-8.219	-812.72
			2	-8.060	-812.36
			3	-7.810	-812.33
			4	-7.826	-812.22
			5	-7.913	-812.18
			6	-7.149	-811.41
			7	-6.487	-811.00

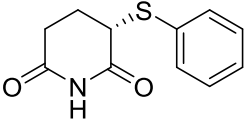
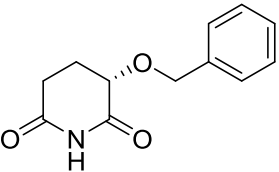
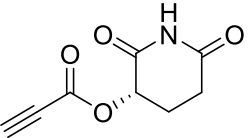
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			8	-6.921	-810.87
			9	-6.835	-810.68
			10	-6.677	-810.02
			11	-4.113	-808.02
L2		L2_DVD-000892	1	-7.292	-812.15
			2	-7.364	-811.90
			3	-7.019	-811.81
			4	-6.376	-811.34
			5	-6.580	-811.12
			6	-6.700	-811.03
			7	-6.825	-811.01
			7	-6.216	-810.74
			9	-5.940	-810.62
			10	-5.811	-810.20
			11	-6.387	-810.20
			12	-6.071	-809.65
L1		L1_SSS-055	1	-7.902	-812.06
			2	-7.557	-811.94
			3	-7.426	-811.77
			4	-7.533	-811.72
			5	-7.226	-811.58
			6	-7.326	-811.17
			7	-7.202	-810.88
			8	-5.807	-808.92
			9	-5.488	-808.87

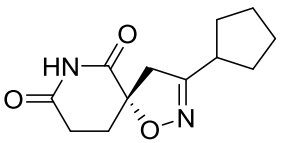
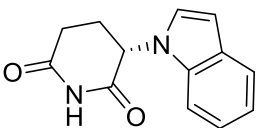
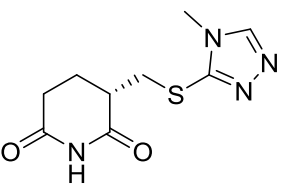
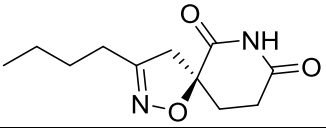
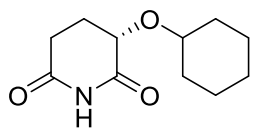
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000888	1	-7.687	-812.05
L2		L2_DVD-000879	1	-6.966	-811.98
			2	-6.616	-811.74
			3	-6.737	-811.49
			4	-6.290	-811.10
			5	-6.204	-811.01
			6	-6.230	-811.00
			7	-6.417	-810.94
			8	-5.742	-810.79
			9	-6.390	-810.78
			10	-6.480	-810.72
			11	-6.167	-810.64
			12	-5.953	-810.54
			13	-6.403	-810.54
			14	-6.137	-810.24
			15	-5.115	-809.82
			16	-4.835	-809.62
			17	-5.355	-809.47
			18	-3.401	-808.15
L2		L2_DVD-000891	1	-7.904	-811.89
			2	-7.892	-811.74
			3	-7.626	-811.60
			4	-7.030	-810.89

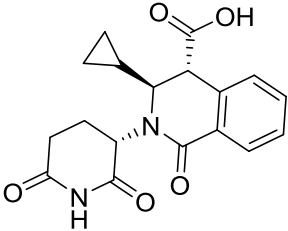
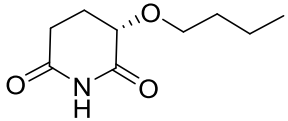
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			5	-7.169	-810.39
			6	-7.203	-810.22
			7	-5.227	-808.03
L2		L2_DVD-000881	1	-7.565	-811.30
			2	-7.131	-811.05
			3	-7.374	-810.91
			4	-7.297	-810.76
			5	-7.138	-810.62
			6	-6.848	-810.05
			7	-6.538	-810.03
L2		L2_DVD-000874	1	-6.730	-810.78
			2	-6.864	-810.64
			3	-6.842	-810.59
			4	-6.723	-810.14
			5	-6.924	-809.60
			6	-6.012	-809.45
			7	-5.478	-808.77
L2		L2_DVD-000884	1	-7.151	-810.64
			2	-6.581	-810.43
			3	-5.511	-809.32
			4	-5.698	-809.22
			5	-5.301	-809.13
			6	-5.366	-809.04
			7	-5.402	-808.72
			8	-5.458	-808.68
			9	-5.323	-807.72
			10	-3.005	-806.37
			11	-3.481	-806.35

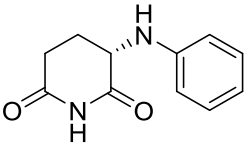
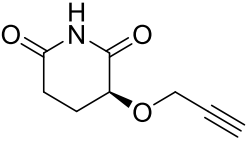
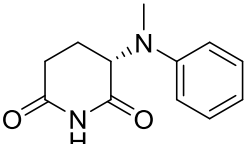
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L2		L2_145	1	-8.082	-810.60
			2	-7.117	-809.43
			3	-6.760	-808.61
			4	-3.711	-805.62
L2		L2_DVD-000894	1	-7.482	-810.41
			2	-7.226	-810.16
			3	-6.626	-809.29
L1		L1_SSS-010	1	-6.739	-810.33
			2	-7.002	-810.11
			3	-6.493	-809.56
			4	-6.526	-809.32
			5	-5.964	-809.20
			6	-6.299	-809.13
			7	-6.379	-809.08
			8	-6.757	-809.00
			9	-6.546	-808.95
			10	-6.142	-808.58
			11	-5.637	-808.57
			12	-5.911	-808.10
L2		L2_147	1	-7.739	-810.33
			2	-7.170	-809.86
L2		L2_DVD-000880	1	-6.858	-809.92
			2	-6.727	-809.73
			3	-6.252	-809.01
			4	-5.713	-808.58
			5	-5.198	-807.99

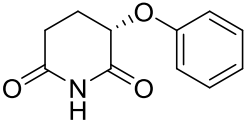
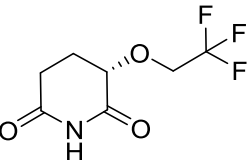
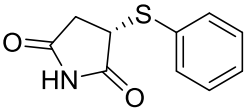
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			6	-5.324	-807.66
			7	-4.775	-807.53
			8	-4.321	-807.44
			9	-4.273	-806.58
			10	-3.483	-806.32
L3		L3_ZJB-8	1	-7.162	-809.78
L2		L2_DVD-000889	1	-5.737	-809.76
			2	-5.398	-809.66
			3	-5.507	-809.63
			4	-5.401	-809.62
			5	-5.701	-809.61
			6	-5.082	-809.55
			7	-5.730	-809.55
			8	-5.635	-809.51
			9	-5.593	-809.44
			10	-5.445	-809.43

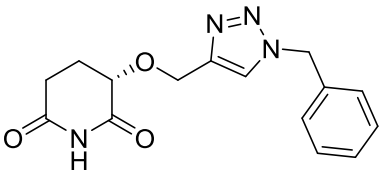
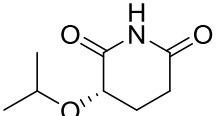
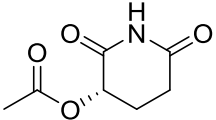
Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			11	-5.466	-809.38
			12	-5.395	-809.38
			13	-5.524	-809.16
			14	-5.629	-809.12
			15	-5.166	-808.97
			16	-5.429	-808.86
			17	-5.246	-808.79
			18	-5.181	-808.64
			19	-4.931	-808.64
L2		L2_DVD-000883	1	-5.824	-809.69
			2	-6.165	-809.61
			3	-4.679	-807.99
L2		L2_DVD-000876	1	-5.116	-809.57
			2	-5.185	-809.51
			3	-5.200	-809.32
			4	-5.077	-809.28
			5	-5.175	-809.17
			6	-5.086	-809.07
			7	-5.116	-808.97
			8	-5.158	-808.77
			9	-5.159	-808.42
			10	-4.850	-808.40
			11	-5.029	-808.08
			12	-4.856	-807.84
L2		L2_DVD-000887	1	-6.144	-808.99
			2	-6.357	-807.95
			3	-5.755	-807.85
			4	-5.363	-807.52
			5	-5.569	-807.21

Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
			6	-3.743	-806.17
			7	-3.528	-806.09
			8	-3.671	-806.01
			9	-3.551	-805.37
L2		L2_DVD-000882	1	-6.405	-808.44
			2	-6.157	-808.34
			3	-6.036	-808.07
L2		L2_DVD-000890	1	-6.120	-807.32
			2	-5.879	-807.06
			3	-5.688	-806.99
			4	-5.762	-806.92
			5	-5.545	-806.90
			6	-5.548	-806.88
			7	-6.004	-806.88
			8	-5.623	-806.67
			9	-5.784	-806.66
			10	-5.155	-806.13
			11	-5.200	-805.73
L1		L1_SSS-056	1	-5.491	-806.89

Продолжение таблицы А.2

1	2	3	4	5	6
L2		L2_DVD-000895	1	-5.673	-805.75
L2		L2-DVD-000875	1	-5.556	-801.71
			2	-5.472	-801.42
			3	-4.660	-800.62
L2		L2_DVD-000878	1	-5.537	-800.76
			2	-4.886	-800.29