

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 Ковалентный докинг лигандов RNF126

Обучающийся

А.Е. Лазарев

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

А.С. Бунев

(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 стало расширение химического пространства рекрутеров E3-убиквитинлигазы RNF126, содержащих фрагмент фумаровой кислоты в качестве акцептора Михаэля, с помощью подходов ковалентного докинга и молекулярной динамики. Разработка и дизайн новых лигандов E3-лигаз – важная задача в области направленного протеолиза белков.

В литературном обзоре обсуждены основные элементы стратегии ковалентного связывания с белками для модуляции активности последних, а также рассмотрен подход необратимого рекрутирования E3-лигаз для задач направленного протеолиза.

Вторая часть посвящена обсуждению дизайна исследования и полученных результатов. Проведен ковалентный докинг виртуальной комбинаторной библиотеки ковалентных рекрутеров RNF126, содержащих фрагмент фумаровой кислоты в качестве реактивной боеголовки. Проведена дополнительная оценка отобранных хитов с помощью других методов молекулярного моделирования, в частности – с помощью молекулярной динамики.

В экспериментальной части описаны расчетные модули и процедуры, используемые в работе, среди которых – подготовка белка и библиотеки соединений, проведение ковалентного докинга, осуществление расчетов молекулярно-динамической симуляции.

В ходе проведения ковалентного докинга и сопутствующих дополнительных исследований был выявлен 1 потенциальный хит, рекомендованный для дальнейших более точных *in silico* исследований, синтеза и тестирования.

Работа изложена на 148 страницах, содержит 58 рисунков, 7 таблиц и приложение.

Abstract

The title of the graduation work is Covalent docking of RNF126 ligands. The graduation work consists of introduction, three parts, 58 figures, 7 tables, a conclusion, the list of 65 references including foreign sources and appendix.

The aim of this work was to expand the chemical space of novel E3-ligase RNF126 recruiters containing a fumaric acid fragment as a Michael acceptor using covalent docking approaches.

The object of the graduation work is the concept of covalent recruitment of E3 ligase.

The subject of the graduation work is the development of RNF126 ligands for the creation of PROTAC.

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

The first part outlines the covalent inhibition strategy and covalent ligand discovery methods, the directed proteolysis approach focusing on the action of the ubiquitin-proteasome system and the PROTAC strategy, and describes the biological functions of RNF126 and its role in the degradation of target proteins upon ligand binding.

The second part describes the methodology and results of computational studies, which consisted of searching for the NMR structure of the target, its preparation, covalent docking of the reference ligand and the prepared library of compounds, and subsequent evaluation of the selected hits using other molecular modeling techniques.

The third part consists the methodology of computational studies. Based on the data obtained, we can conclude that 1 potential hit recommended for further more precise in silico studies, synthesis and testing.

Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор.....	8
1.1 Стратегия ковалентного ингибирования в медицинской химии	8
1.1.1 Ковалентное ингибирование как терапевтическая стратегия.....	8
1.2 Подходы к открытию новых ковалентных лигандов.....	13
1.2.1 Инструментальные методы открытия ковалентных лигандов	13
1.2.2 Стратегии открытия ковалентных лигандов <i>in silico</i>	17
1.3 RNF126 как новая E3-лигаза для рекрутирования в подходах направленного протеолиза	20
1.3.1 RNF126. Структура, функции и биологическая роль	24
1.3.2 Лиганды RNF126.....	26
2 Результаты и их обсуждение	32
2.1 Подготовка структуры белка.....	33
2.2 Создание структур библиотеки.....	34
2.3 Ковалентный докинг референсного лиганда.....	36
2.3.1 Влияние гетероциклического фрагмента на аффинность связывания	42
2.4 Симуляция молекулярной динамики соединений-хитов	57
2.5 PROTAC RNF126-CRBN	65
3 Экспериментальная часть.....	73
3.1 Компьютерное моделирование	73
Заключение.....	75
Список используемой литературы и используемых источников.....	77
Приложение А Тепловая карта для 2 положения	83
Приложение Б Результаты стыковки сгенерированной библиотеки.....	85
Приложение В Отчеты молекулярнодинамической симуляции.....	123

Определения, обозначения и сокращения

В данной работе используются следующие термины с соответствующими определениями:

AKT	серин/треониновая протеин-киназа семейства Rho-альфа
AR	рецептор андрогена
BAG6	В-клеточная лимфома 2 – ассоциированный атамогенный кошаперон 6
BRD4	бромодомен-содержащий белок 4
BTZ	Бортезомиб
CDK4	циклин-зависимая киназа 4
CRBN	цереблон
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
ERK	киназа, регулируемая внеклеточным сигналом
MDM2	E3-лигаза (Mouse double minute 2 homolog)
NF-κB	ядерный фактор каппа-лайт-цепь-энхансер активированных В-клеток
PDK1	фосфоинозитид-зависимая киназа–1
SMARCA2	родственный, связанный с матрицей, актинозависимый регулятор хроматина, подсемейство A
VHL	E3-убиквитин лигаза Вон Хиппель-Линдау
ВЭЖХ-МС	высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота

Введение

Молекулярные клеи – это новый подход в создании соединений, способных привлекать E3–лигазы. Эти небольшие молекулы обладают способностью точно связываться с целевыми мишенями, что делает их эффективным инструментом для изучения и регулирования биологических процессов. В отличие от традиционных ингибиторов, молекулярные клеи обеспечивают более точное и эффективное воздействие на целевые молекулы, открывая новые перспективы в области фармацевтической химии и биомедицинских исследований.

В человеческом геноме найдено около 600 различных E3-лигаз, каждая из которых играет ключевую роль в системе убиквитинилирования и деградации протеинов. Эти ферменты способны добавлять убиквитин к целевым белкам, помечая их для последующего разложения и обеспечивая контроль уровня белков в клетке. Разнообразие E3-лигаз позволяет точно настраивать и регулировать различные аспекты клеточного метаболизма - от ответа на стресс до цикла клеточного деления, что подчеркивает значимость этих ферментов для поддержания нормальной функциональности клеток и организма в целом.

Ковалентное присоединение играет важную роль в разработке молекулярных клеев и других соединений, способных привлечь E3-лигазы. Этот подход открывает новые возможности для создания устойчивых и долговременных комплексов с целевыми мишенями, что стимулирует развитие новых стратегий лечения и борьбы с различными заболеваниями. Применение ковалентного связывания значительно расширяет ассортимент лекарственных препаратов для борьбы с трудноизлечимыми заболеваниями, такими как рак, нейродегенеративные расстройства и аутоиммунные заболевания. Помимо этого, данная стратегия предоставляет возможность ингибировать широкий спектр мишеней, включая те, которые ранее считались недоступными для

медикаментозного воздействия, что значительно повышает эффективность и разнообразие лекарственных препаратов.

Примером успешной разработки ковалентных лигандов для целевых мишеней может служить работа с E3-лигазой RNF126. Эта лигаза стала объектом интереса для создания рекрутеров, которые могут ковалентно связываться с ней и модулировать ее активность. Успешные эксперименты с разработанными лигандами для RNF126 подтвердили их способность эффективно взаимодействовать с мишенью, открывая путь к созданию новых лекарственных соединений. Более того, разработанные лиганды для RNF126 могут служить основой для дальнейшего улучшения и оптимизации, что позволит расширить спектр ингибиторов и углубить понимание механизмов, лежащих в основе регуляции клеточных процессов. Такие инновационные подходы не только способствуют разработке новых лекарственных препаратов, но и демонстрируют потенциал ковалентного связывания как эффективного метода в лекарственной химии и биомедицинских исследованиях.

Целью данной работы стало расширение химического пространства новых рекрутеров E3-лигазы RNF126, содержащих фрагмент фумаровой кислоты в качестве акцептора Михаэля, с помощью подходов ковалентного докинга.

Задачи:

1. Проведение ковалентной стыковки и молекулярной динамики – 1-(4-метоксифенил)-4-(пиперазин-1-ил)бут-2-ен-1,4-диона – референсной боеголовки Номуры, а также анализ ее способа связывания.

2. Создание, подготовка и проведение ковалентного докинга библиотеки соединений на основе референсного лиганда с последующей нтификацией первичных хитов виртуального скрининга и их молекулярно-динамическая симуляция.

3. Проведение ковалентной стыковки и молекулярной динамики небольшой библиотеки PROTAC CRBN–RNF126.

1 Литературный обзор

1.1 Стратегия ковалентного ингибирования в медицинской химии

Учитывая, что взаимодействие между лекарством и его мишенью является фактором, влияющим на терапевтический эффект, главная задача современных программ по разработке лекарств заключается в максимизации силы таких химических связей между молекулами. Для 80% лекарств на рынке связывание обуславливают обратимые взаимодействия такие как водородные связи, солевые мостики, гидрофобные контакты. Однако в области разработки лекарств находит свое место стратегия, известная как ковалентное ингибирование, которая становится все более популярной среди исследователей.

1.1.1 Ковалентное ингибирование как терапевтическая стратегия

Ковалентные ингибиторы представляют собой молекулы, которые формируют ковалентные связи с активными сайтами ферментов, блокируя их активность временно или навсегда. Процесс происходит в два этапа и начинается с обратимого образования нековалентного комплекса между лигандом и белком, стабилизированного нековалентными взаимодействиями. Затем между электрофильным фрагментом соединения и нуклеофильным реактивным остатком фермента происходит реакция с формированием полноценной ковалентной химической связи. Второй этап связывания, также как и первый, может быть обратимым процессом и характеризоваться константами скорости образования (k_2) и диссоциации (k_{-2}), в связи с чем различают необратимые ($k_2 \gg k_{-2}$) и обратимые ковалентные ингибиторы. Справедливости ради стоит отметить, что большая часть известных лигандов относится к первому типу (рисунок 1) [1].

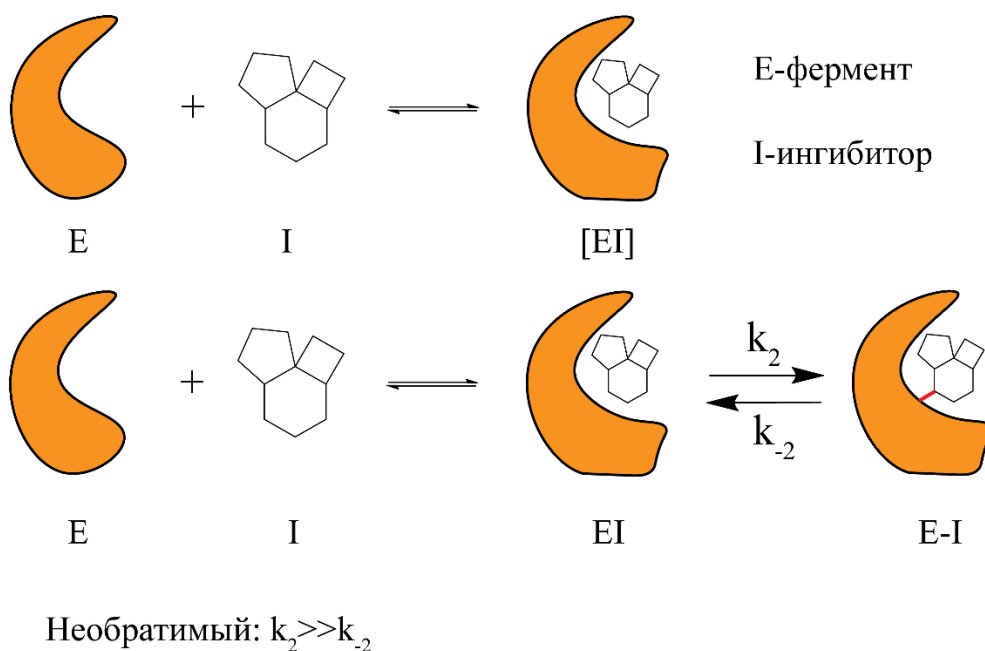


Рисунок 1 – Сравнение необратимого и обратимого ковалентного ингибитора

Говоря о реактивных в контексте ковалентного связывания аминокислотах, стоит отметить такие остатки, как лизин [2] глутаминовая кислота [3], серин [4], треонин [5], тирозин [6] и цистеин, который обладает наиболее выраженной нуклеофильностью, вследствие чего на связывание с ним нацелено большая часть ковалентных лекарств [7, 8]. Реакционно-способные фрагменты лигандов представляют зачастую электрофильные фрагменты – такие, как α,β -ненасыщенные карбонильные соединения, α,β -кетонамиды, эпоксиды, нитрилы и другие (рисунок 2).

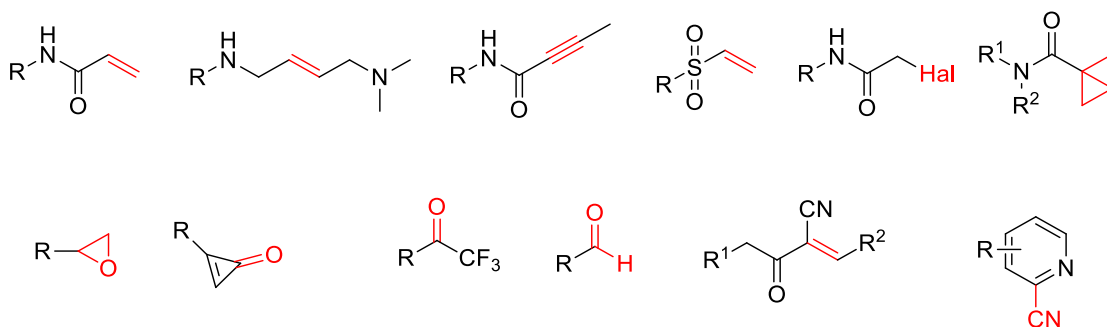


Рисунок 2 – Ковалентно реактивные фрагменты малых молекул

На рисунке 3 приведены некоторые примеры ковалентных ингибиторов: Бортезомиб **1**, обратимо связывающийся ингибитор протеосом 26S [9], Ибрутиниб **2**, необратимый ингибитор ВТК [10], CCW-16 **3**, рекрутер E3-лигазы RNF4 [11], и Канетиниб **4**, ингибитор EGFR [12].

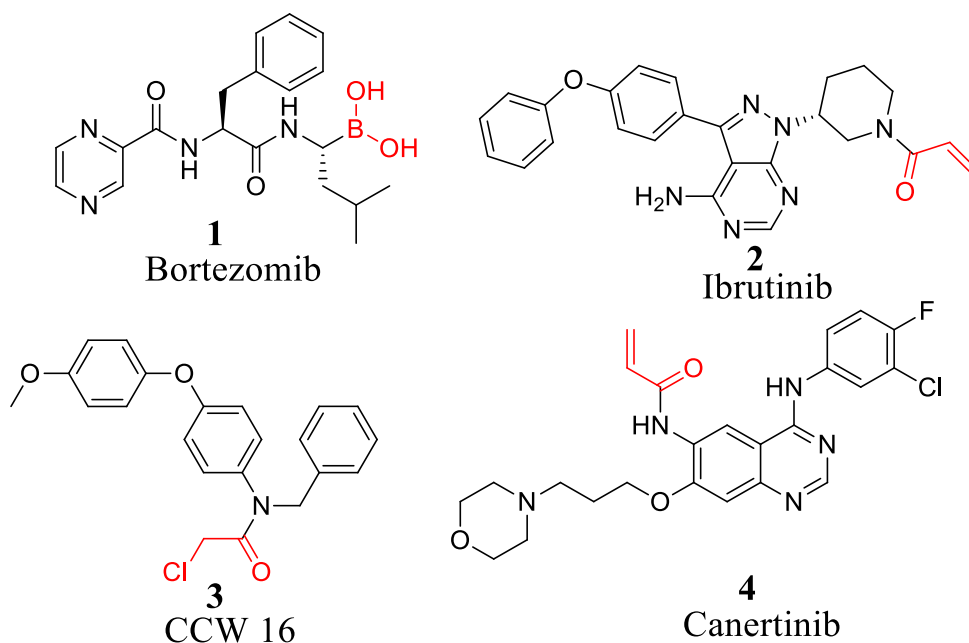


Рисунок 3 – Структуры некоторых ковалентных ингибиторов

Обсуждая реакции, протекающие между ковалентными лигандами и реактивными остатками, нельзя не отметить присоединение по Михаэлю [13]. Моделирование связывания ковалентного лиганда, имеющего в своем составе акриламидный фрагмент с цистеином, проведенное Жасимом и др., показывает, что тиолатный анион, выступающий в роли нуклеофила, атакует β -углерод лиганда, опосредуя образование стабилизированного влиянием карбонильной группы карбаниона, который затем подвергается протонированию δ -Н имидазола гистидина (рисунок 4) [14].

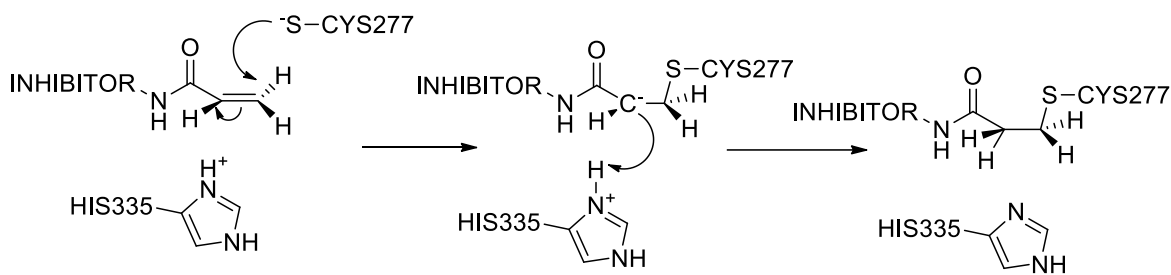


Рисунок 4 – Механизм ковалентного ингибирования с цистеином

Также стоит отметить S_N2 нуклеофильное замещение, нуклеофильное присоединение к кратным связям, реакции, протекающие с раскрытием кольца эпоксидов, конденсацию иминов и др.

Ковалентно реактивные фрагменты могут образовываться в лигандах в ходе метаболических превращений, как, например, аспирин или парацетамол **5**, необратимо ингибирующие циклооксигеназу-1 (англ. COX-1, cyclooxygenase-1) путем ацетилирования серинового остатка активного сайта (рисунок 5) [15-19].

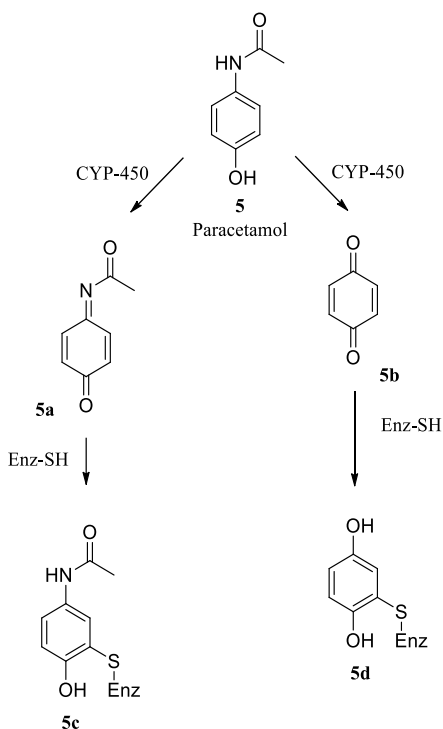


Рисунок 5 – Метаболические превращения парацетамола

При использовании ковалентного ингибирования необходимо понимать все потенциальные риски и выгоды данной стратегии (рисунок 6) [20].

Ковалентные ингибиторы обычно более аффинно связываются со своими мишенями по сравнению со своими нековалентными аналогами, за счет прочности ковалентной химической связи, однако следует помнить о том, что вместе с тем имеет место опасность неселективной модификации других белков. Кроме того, измерение активности таких ингибиторов представляет собой некоторую проблему. В случае нековалентных ингибиторов активность обычно выражается с помощью K_i или IC_{50} , однако для необратимых аналогов значения IC_{50} зависят от времени, так как лиганд конститутивно связан с мишенью. Это затрудняет сравнение их активности [21].



Рисунок 6 – Потенциальные риски и преимущества, связанные с ковалентными ингибиторами

Продолжительное воздействие ковалентных ингибиторов обычно представляется как достоинство, но также может быть и существенным ограничением, особенно если речь идет о действии на мишени с низкой скоростью ресинтеза.

Понимание фармакокинетики и фармакодинамики для ковалентных ингибиторов также затруднено. Как правило лекарства, реализующие ковалентное связывание характеризуются более высокими показателями клиренса [22].

1.2 Подходы к открытию новых ковалентных лигандов

Благодаря развитию инструментальных и вычислительных подходов дизайн новых ковалентных лигандов в последние годы становится все более простым и удобным. Эти совокупные усилия открывают новые горизонты для разработки инновационных лекарственных средств, улучшая точность и эффективность поиска новых ковалентных лигандов. Рассмотрим ключевые инструментальные методы и компьютерные подходы, используемые для открытия таких лигандов.

1.2.1 Инструментальные методы открытия ковалентных лигандов

Инструментальные методы для открытия ковалентных лигандов включают в себя различные приемы, которые позволяют исследовать взаимодействия между лекарством и мишенью. Все эти методы можно разделить на три группы в зависимости от целей исследования: идентификация аминокислот, с которыми может связаться предполагаемое соединение, оценка ингибирования и скрининг с целью выявления хитов.

Среди разработанных инструментов выделяется метод профилирования белков на основе активности (ABPP, *англ.* Activity-based protein profiling), который как позволяет идентифицировать ковалентно-реактивные остатки для дальнейших приложений процессов открытия лекарств, так и проводить

исследования активности отдельных соединений [23]. Зонды, используемые в АВРР, обычно представляют собой молекулы, обладающие двумя ключевыми фрагментами: реактивной группой, связывающейся с реакционноспособными остатками, и репортерной флуорофорной меткой, позволяющей обнаруживать связанные белки с помощью флуоресцентного сканирования в геле [24]. Также зонды часто могут содержать биотин, который необходим стрептавидиновой иммобилизации меченых белков и последующей трипсинизации для анализа ВЭЖХ-МС (рисунок 7).

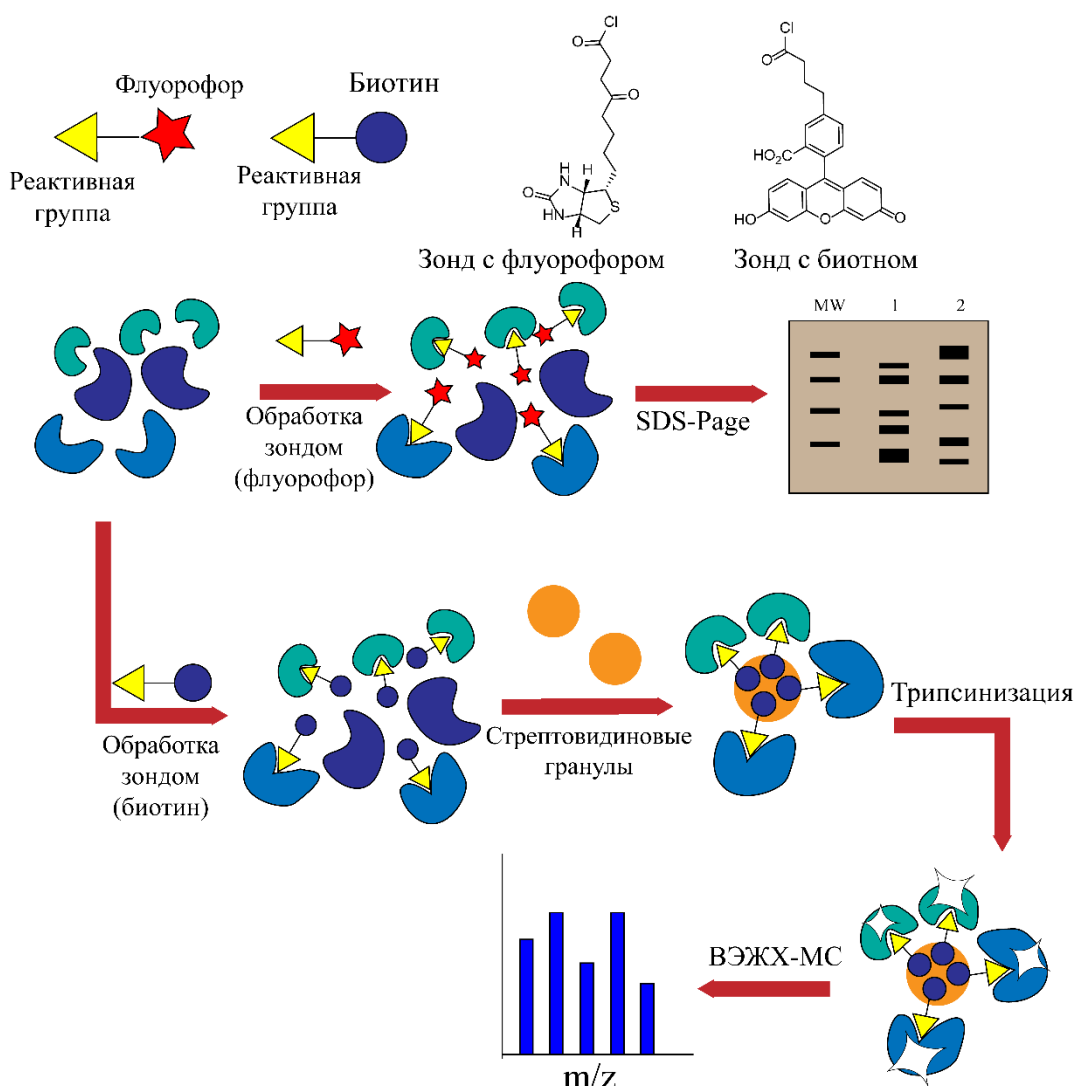


Рисунок 7 – Основы профилирования белка на основе активности (АВРР)

Также стоит упомянуть метод хемопротеомики, основанный на изотопном мечении, который изначально был разработан для идентификации мишеней и отображения реакционных цистеинов в клеточном протеоме [25]. isoTOP-ABPP использует зонд на основе функционализированного алкином йодоацетамида в качестве алкилятора цистеина. Ацетиленовый фрагмент используется для включения репортерного элемента с помощью 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения. Данный элемент также содержит изотопную метку, последовательность, распознаваемую протеазой TEV, и биотин для иммобилизации. Как и в предыдущем методе, образцы обрабатываются IA-алкином, затем подвергаются клик-реакции для присоединения второй части зонда. Меченные белки осаждаются на стрептавидине и отмываются от непрореагировавших протеинов. Биотиновый компонент элиминируется после обработки TEV-протеазой, осуществляется трипсинизация и полученные изотопно-обогащенные пептиды анализируются (рисунок 8) [25].

Метод isoTOP-ABPP может быть использован для профилирования доступных Cys-сайтов в протеоме. Первоначально это было продемонстрировано Бэкусом и соавторами, которые использовали конкурентный метод isoTOP-ABPP для профилирования библиотеки из 60 нацеленных на мишени фрагментов, идентифицируя более 700 фармакологически доступных цистеиновых остатков в протеоме [26]. В аналогичном исследовании Хаккер и соавторы выявили несколько сотен гиперреактивных лизиновых сайтов с использованием пробы с сульфотетрафторфениловым эфиром [27]. Фрагменты, профилированные в этих исследованиях, предоставляют готовые соединения для воздействия на белки интереса.

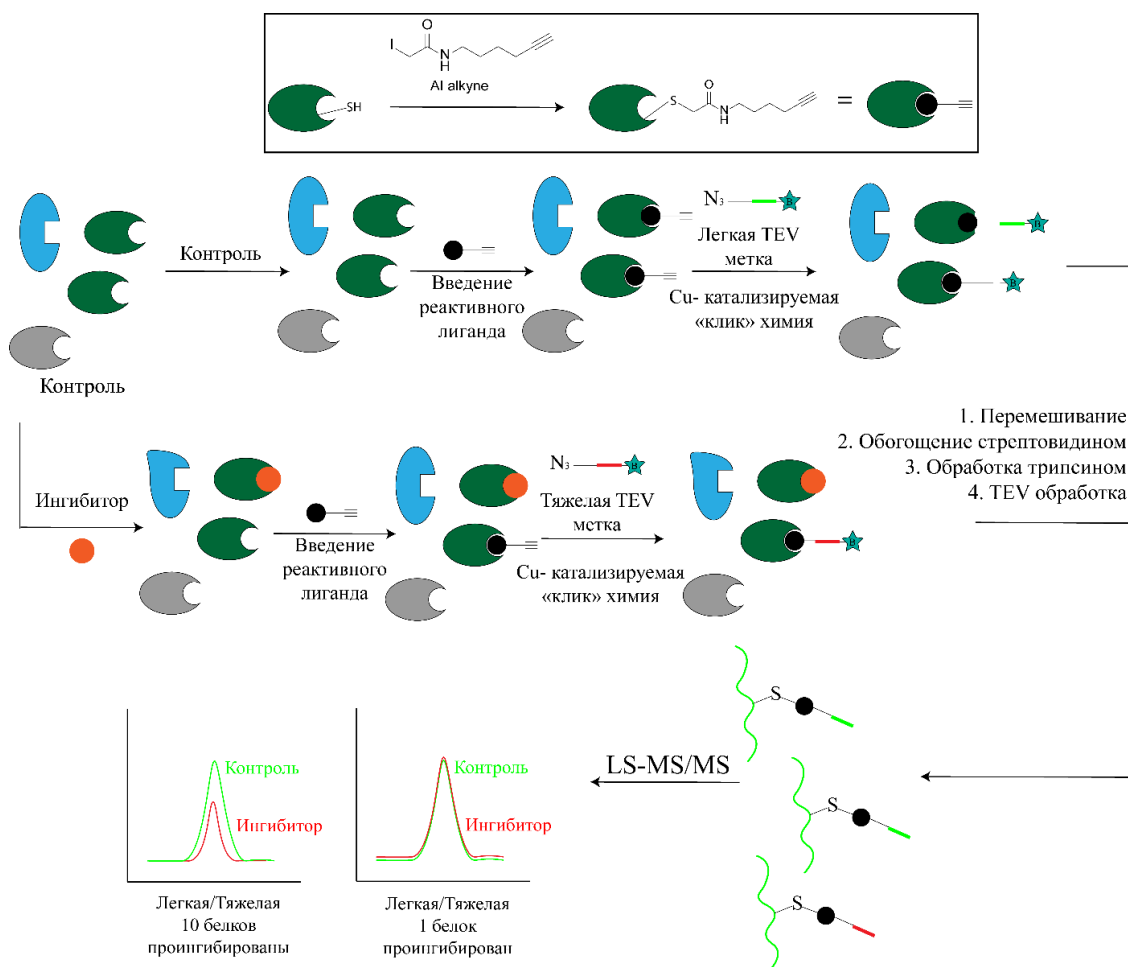


Рисунок 8 – Схема isoTOP-ABPP

Номура, Вард и др. использовали isoTOP-ABPP для поиска возможных реактивных остатков среди E3 лигаз в клетках и обнаружили RNF4, RNF114 и RNF126 (*англ.* Really Interesting New Gene Finger Protein 126) как потенциально лигандируемые новые E3 [28]. В последствии данная работа легла в основу проектов по созданию полноценных рекрутеров для данных ферментов.

Во время разработки ковалентного лиганда убиквитинлигазы RNF4 этим же коллективом авторов был использован ABPP в геле в качестве метода поиска связывающихся с реактивным остатком соединений. Схема исследования представлена на рисунке ниже (рисунок 9). Анализ был основан на конкурентном связывании IA-родаминового зонда и исследуемых соединений (например, 7) с реактивным Cys E3-лигазы [29].

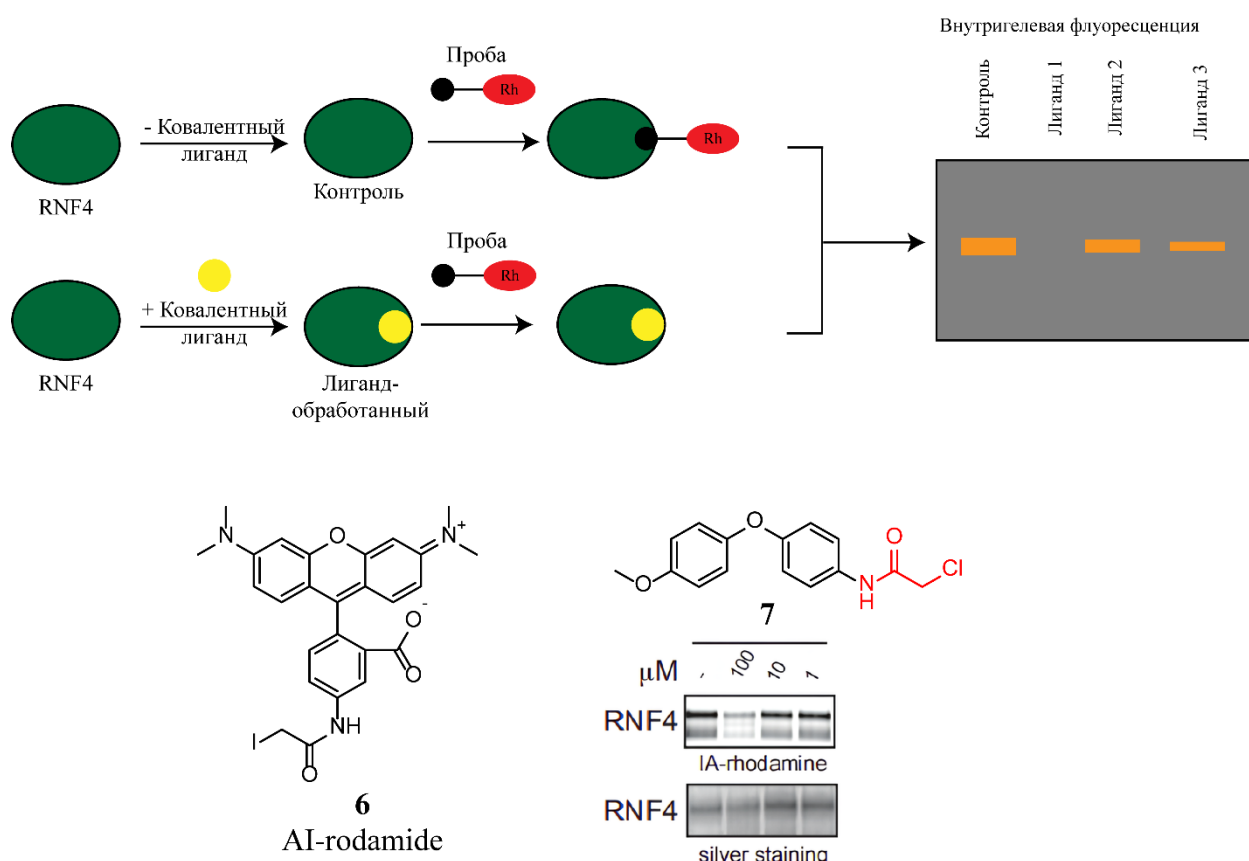


Рисунок 9 – Оценка связывания RNF4 с ингибитором и результат скрининга

1.2.2 Стратегии открытия ковалентных лигандов *in silico*

Докинг – это метод молекулярного моделирования, обеспечивающий быстрый поиск и оценку возможности, места и способа связывания (оптимального соответствия) между лигандом и сайтом связывания биомишени [30]. Он играет ключевую роль в создании лекарств. Однако классический подход к молекулярному докингу позволяет оценивать лишь нековалентные взаимодействия (водородные связи, солевые мостики, π -столкновения) и не подходит для предсказания позы связывания ковалентных лигандов из-за того, что связь такого типа не может описываться с помощью классических межмолекулярных потенциалов, а учет ее энергетики и образования требует явного рассмотрения электронных состояний, а значит, квантовомеханических вычислений [31]. Также важным требованием является наличие информации как о реакционном остатке, так и

о группе лиганда. Для прогнозирования поз были разработаны различные алгоритмы ковалентного докинга.

Например, программное обеспечение для молекулярного моделирования, AutoDock [32], которое применяет метод модификации гибкой боковой цепи (*англ. flexible side chain method*). В данном методе файл координат лиганда модифицируется путем соединения двух атомов целевого остатка в месте алкилирования с идеальной химической геометрией. Затем эти два атома лиганда накладываются на соответствующие атомы в структуре рецептора, чтобы установить ковалентную связь с остатком перед началом докинга. После комплекс рассматривается как полностью гибкая боковая цепь, для моделирования выбранной гибкости рецептора.

Метод двухточечного аттрактора использует улучшенные карты взаимодействия и типы атомов. Боковая цепь целевого остатка отсекается для удаления двух концевых атомов (т.е. C β и O γ на примере серина). Эти два атома присоединены к алкилирующему лиганду в соответствующем месте с идеальной химической геометрией и им присвоены два особых типа атомов (X и Y). Для этих типов атомов создаются две специализированные карты взаимодействия с потенциалом Гаусса (называемым здесь Z – потенциалом, состоящим из двух параметров: ширина (δ , Å) и амплитуда (ϵ , ккал/моль)), сосредоточенным в месте расположения исходных атомов в структуре рецептора, с отрицательным значением вблизи желаемого местоположения и возрастающим до нуля при отдаленные места. Z – потенциал наказывает положения, в которых атомы Y или X находятся за пределами места их ковалентного присоединения, затягивая лиганд в правильное положение [32].

Примером другой программы является CovalentDock, где используется подход боковой цепи [33]. Сначала проводится докинг, так чтобы электрофильный фрагмент лиганда был на расстоянии от аминокислоты рецептора. Затем происходит отбор поз по энергетике (5 – 10 штук) и образуется ковалентная связь. Затем весь белок с связанным лигандом минимизируется, так как программа считает его частью фермента.

Программным решением для ковалентной стыковки, разработанным Schrodinger, является CovDock [34]. Рабочий процесс данного алгоритма представлен на рисунке ниже (рисунок 10).

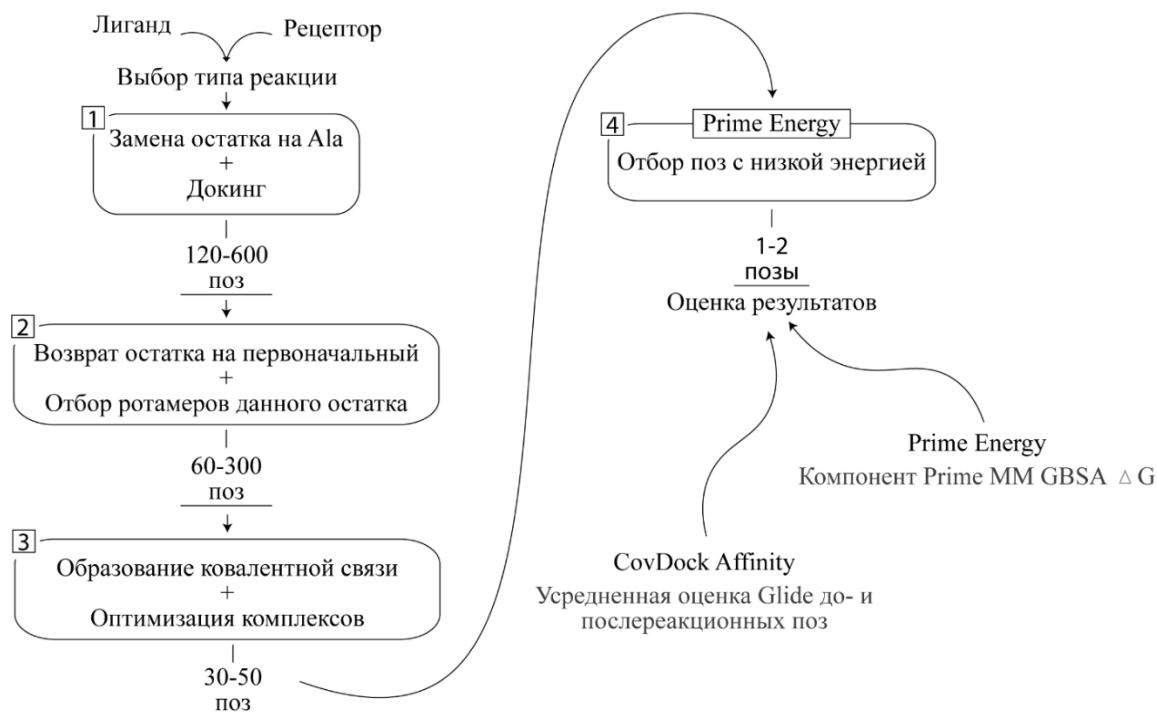


Рисунок 10 – Рабочий процесс CovDock при открытии лекарств

На первом этапе выполняется обычная нековалентная стыковка с помощью алгоритма Glide [34]. При этом реактивный остаток мутируется на аланин для предотвращения образования с ним взаимодействий, а также накладывается позиционное ограничение на расположение в пределах 8 Å от C-β атома реакционноспособного остатка электрофильного фрагмента лиганда относительно реакционноспособной аминокислоты. Среди полученных поз отбираются лишь те, у которых значения скоринга не более чем на 2.5 ккал/моль отличаются от позы, обладающей самой низкой энергией.

На втором этапе мутированному остатку возвращается первоначальный вид и происходит исследование его конформационного пространства путем отбора библиотеки ротамеров.

Затем образуется ковалентная связь, а любые искажения углов и расстояний минимизируются для релаксации структуры с помощью алгоритма Prime. Заключительным этапом является вторая итерация оценки полученных поз с помощью функции Glide в режиме *score-in-place*. Поскольку для образования стабильного комплекса важно, как начальное позиционирование лиганда в сайте относительно реактивного остатка (для успешного протекания реакции, ведущей к связыванию), так и конечная его ориентация, результирующая оценочная функция, названная разработчиком CDock Affinity, представляет собой среднее арифметическое из двух оценок Glide до и после образования связи [34].

1.3 RNF126 как новая E3-лигаза для рекрутирования в подходах направленного протеолиза

Среди всего протеома человека всего лишь около 20% белков могут стать мишенями для классических маломолекулярных ингибиторов, остальная же часть представляет собой недоступные для такого подхода цели и называется *неуловимым протеомом* (англ. undruggable proteome). Часто такие протеины либо не имеют активного сайта вовсе (то есть выполняют функции каркасов), либо он блокируется в ходе белок-белковых взаимодействий или же конкурирует за связывание с нативными субстратами, что оказывается проблематично.

Стратегией действия в таком случае может стать использование концепции направленного протеолиза (TPD, англ. Targeted Protein Degradation), а в частности – PROTAC (англ. PROteolysis TAgeting Chimeras) – химер, направленных на протеолиз. Это инновационный подход в медицинской химии, ориентированный не на блокирование каталитических функций ферментов путем ингибирования, а на уничтожение белков-мишеней в клетке с помощью внутриклеточных механизмов расщепления протеинов. Она обладает потенциалом для применения в качестве терапевтической стратегии

при лечении различных заболеваний, включая онкологические, неврологические и инфекционные [35]. В основе концепции TPD так или иначе лежит работа убиквитин-протеосомной системы (UPS, *англ.* Ubiquitin-proteasome system) (рисунок 11) [36].

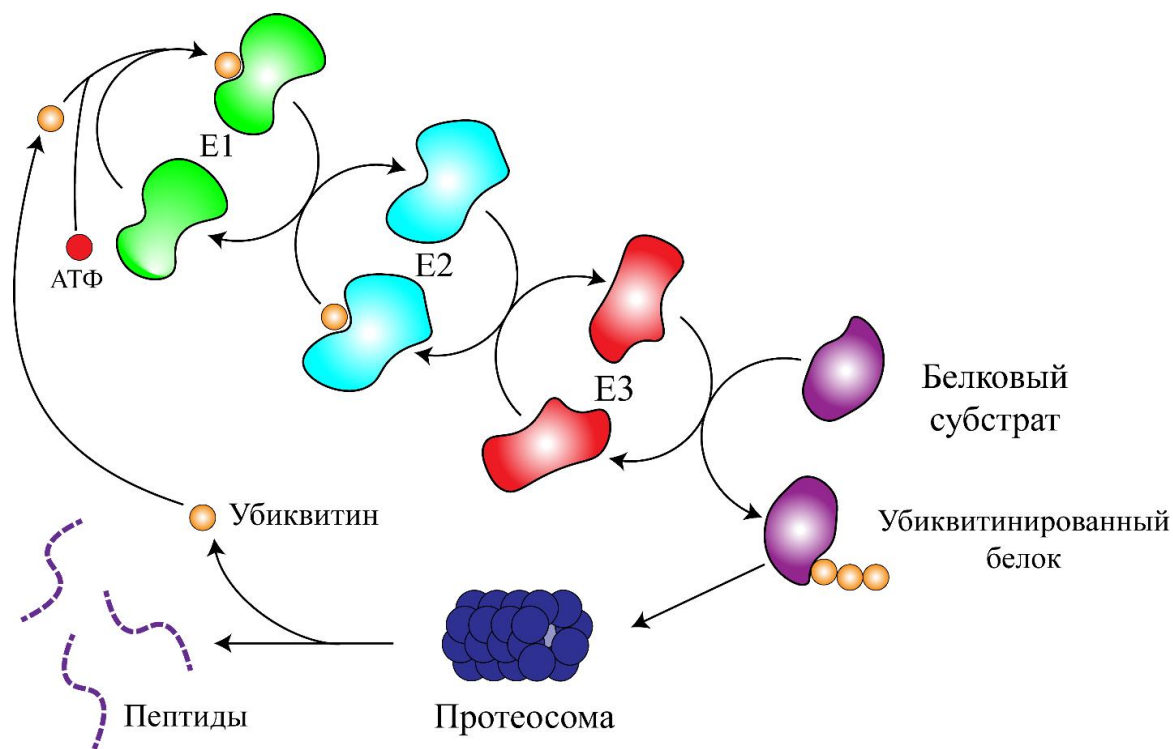


Рисунок 11 – Убиквитин-протеосомная система

Для того, чтобы белок был идентифицирован клеткой как подлежащий деградации он должен быть отмечен цепочкой из четырех других макромолекул - убиквитинов (Ubs, *англ.* Ubiquitines). Процесс присоединения Ub опосредуют три белка, относящихся к классу лигаз. Убиквитинактивирующий фермент E1 связывает свободный убиквитин в цитозоле и катализирует его перенос на убиквитинконъюгирующий белок E2; затем конъюгат E2-Ub присоединяется к третьему члену каскада – убиквитинлигазе E3. Последний опосредует распознавание и связывание субстрата для убиквитинилирования (так называемым POI, *англ.* Protein of Interest) и, когда комплекс Ub-E2-E3-POI оказывается собранным,

катализирует перенос Ub на субстрат. На финальной стадии отмеченный белок подвергается транслокации в протеосому 26S и деградации.

Механизм действия PROTAC заключается в использовании данной системы для разрушения белков-мишеней. Химера включает в свой состав лиганды (рекрутеры) POI и E3, соединенные линкером в единую молекулярную систему. Связывание боёголовков-рекрутеров своих партнеров приводит к индуцированному сближению лигазы и мишени и убиквитинилированию последней [35] (рисунок 12).

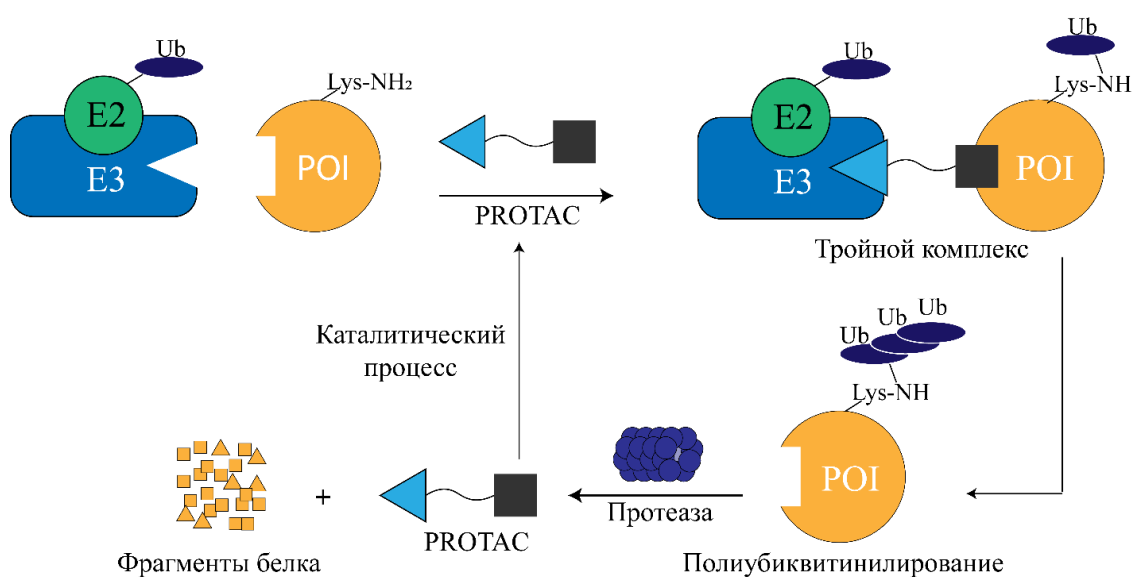


Рисунок 12 – Механизм действия PROTAC

Кроме того, что TPD является практически единственной стратегией действия для мишеней из множества «неуловимых», преимущество PROTAC также заключается в возможности повышения селективности против родственных мишеней.

Для примера ниже представлен ARV-110 – PROTAC, направленный на деградацию рецептора андрогенов, уже начавший клинические испытания для лечения рака простаты у мужчин (рисунок 13) [37].

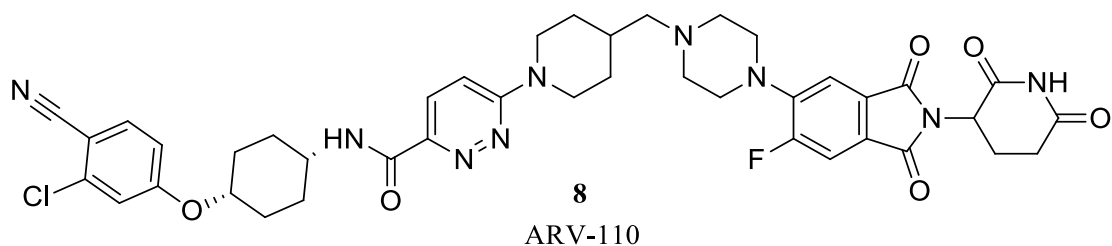


Рисунок 13 – Структура ARV-110

Одним из ключевых элементов PROTAC является рекрутер E3 лигазы. Геном человека кодирует более 600 E3 лигаз, однако лишь немногие из них являются *лигандируемыми*. Самыми часто рекрутируемыми являются VHL, CRBN и MDM2 [38-40]. На рисунке ниже представлены лиганды для связывания с ними (рисунок 14).

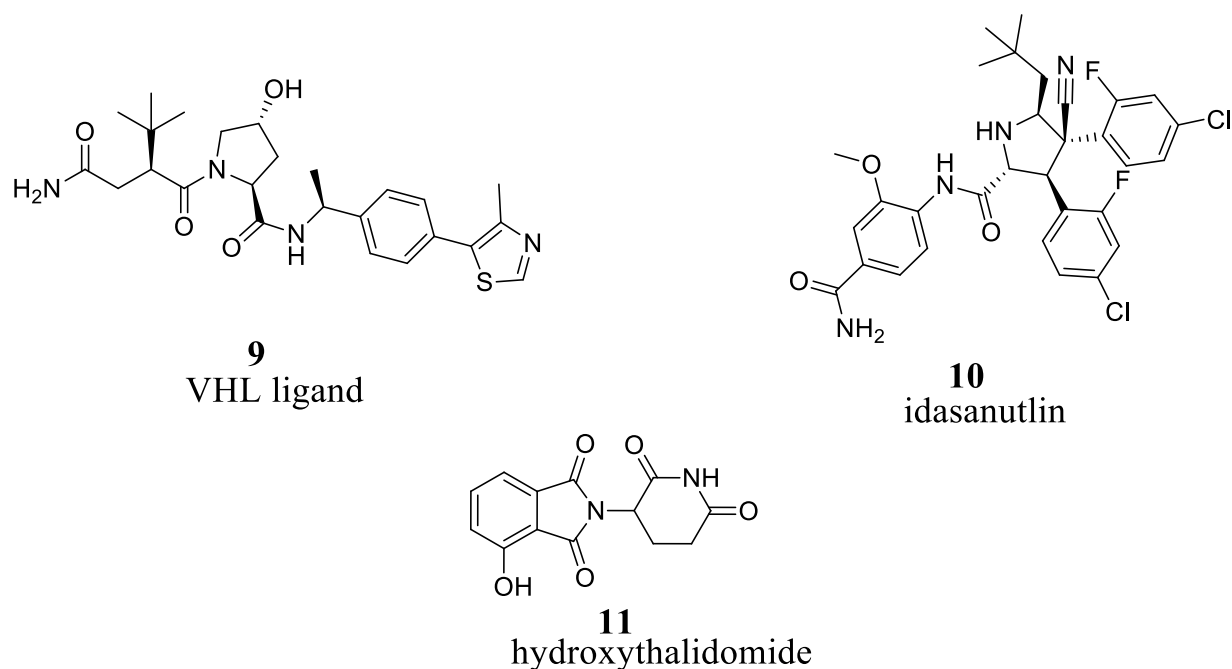


Рисунок 14 – Лиганды для VHL, CRBN и MDM2

Безусловно важной задачей является увеличение количества рекрутируемых лигаз в виду возможности обеспечения тканевой селективности (из-за различных уровней экспрессии), а также расширения

пула деградируемых мишеней (в корне неверно считать, что одна лигаза способна эффективно связываться со всеми возможными POI). Однако нельзя не отметить, что поиск и дизайн новых рекрутеров – сложная задача. До сих пор большая часть из лигандов E3-лигаз представляют собой случайно открытые (например, CRBN [41]) или же полученные в ходе трудоемкого *de novo* дизайна на основе нативных дегронов (например, VHL [42]).

Однако в последнее время неожиданно для всех были обнаружены рекрутеры E3, связывающиеся ковалентно и, кроме того, предложена стратегия рационального дизайна для конструирования и поиска новых лигандов. К числу таких кейсов относятся случаи с открытием рекрутеров RNF4 и RNF126 [11, 43]. О последнем из них речь пойдет ниже.

1.3.1 RNF126. Структура, функции и биологическая роль

Поскольку данная выпускная квалификационная работа во многом посвящена поиску и дизайну новых рекрутеров RNF126, считаю необходимыми рассмотреть структуру данного белка, а также функции, которые он выполняет в клетке.

RNF126 является человеческим белком, кодируемым соответствующим геном (рисунок 15). Он относится к семейству E3-лигаз и является его компонентом в убиквитин-протеасомной системы деградации.

Экспрессия RNF126 регулируется различными сигнальными путями, включая EGFR, ERK, АКТ и NF- κ B [44]. Эта убиквитинлигаза выполняет функции медиаторов восстановления поврежденной ДНК и имеет связь с развитием рака, благодаря важной роли в клеточной пролиферации и репарации поврежденной ДНК [45].

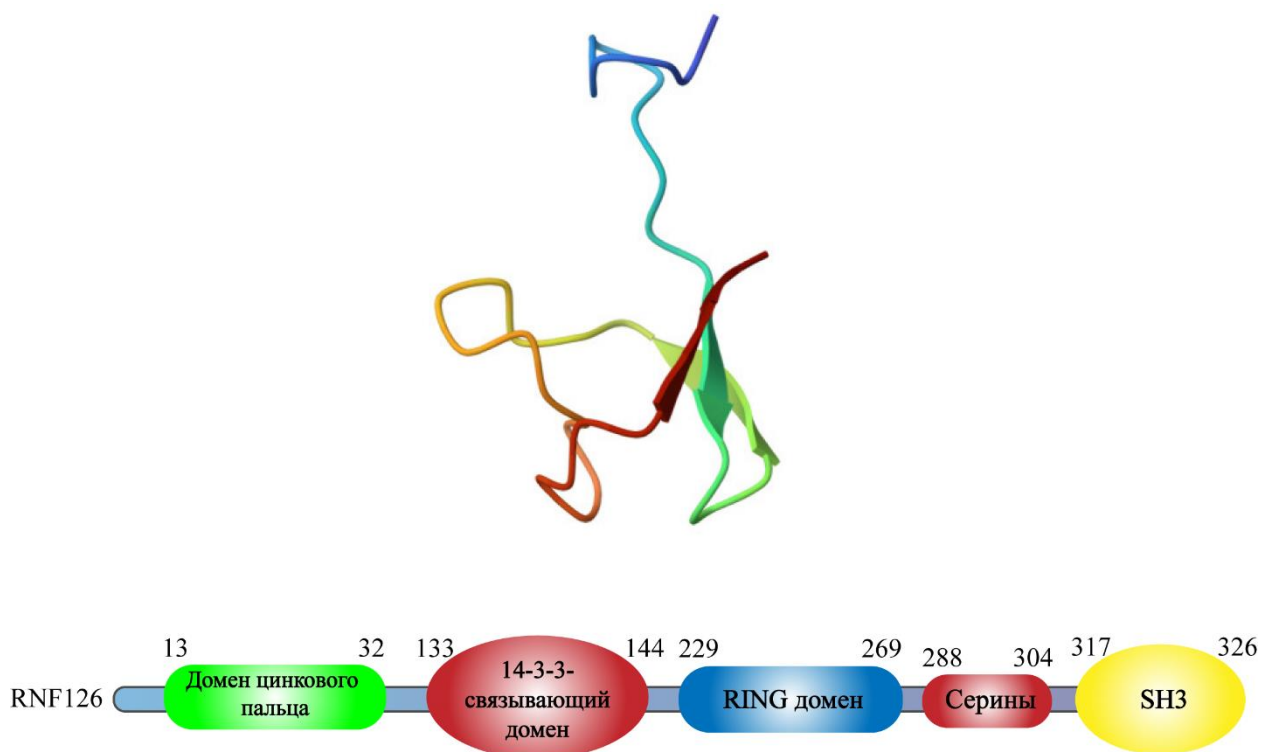


Рисунок 15 – Структура и последовательность RNF126 (PDB: 2N9O)

Реакция на повреждение ДНК (*англ.* DNA Damage Response) включает сложные сигнальные пути, которые временно останавливают клеточный цикл и инициируют процессы восстановления ДНК, обеспечивая стабильность генома и выживаемость клеток [46]. В данном процессе RNF126 моноубиквитилирует фермент AID (*англ.* Activation-induced cytidine deaminase), вызывающий мутации пар оснований от С: G до Т: А, и инициируя соматическую гипермутацию и рекомбинацию переключения классов во время диверсификации антител [47].

Также RNF126 способствует пролиферации клеток молочной железы, предстательной железы и рака желудочно-кишечного тракта, нацеливая ингибитор CDK p21 для деградации [48]. Подобные результаты получены другой группой исследователей для клеток MDA-MB-231 и A549, а также для клеток рака языка SCC9 и SCC25, где ингибирование RNF126 привело к подавлению пролиферации как *in vitro*, так и *in nude* мышах [49]. Также E3-лигаза участвует в эндосомальной сортировке рецепторов клеточной

поверхности (CI-MPR, *англ.* The cation-independent mannose 6-phosphate receptor) и деградации p21 циклин-зависимого ингибитора киназы, тем самым способствуя пролиферации раковых клеток [45].

Также RNF126 играет роль в ингибировании апоптоза, способствуя устойчивости раковых клеток к апоптозу через рекрутирование фермента PDK1 для убиквитин-опосредованной деградации и увеличения метаболического потока цикла карбоновых кислот [50].

BCL2 – ассоциированный атамоген 6 (BAG-6) – убиквитин-подобный белок, который, как первоначально сообщалось, является продуктом нового гена, расположенного внутри главного комплекса гистосовместимости человека. Последующие исследования показали, что большой белок BAG – 6 участвует в ряде клеточных процессов, включая апоптоз, регуляцию генов, синтез белка, контроль качества и деградацию белка. В этом контексте BAG – 6 действует как многофункциональный шаперон, который взаимодействует со своими белками-мишенями для доставки в разные пункты назначения [51].

Недавние исследования выявили RNF126 как растворимую E3-лигазу, которая участвует в BAG6–опосредованном контроле качества. BAG6 распознает мембранные и секреторные белки и рекрутирует RNF126 для убиквитинирования этих гидрофобных клиентов, предназначенных для протеасомной деградации. Считается, что N-концевая область играет важную роль в его взаимодействии с убиквитинподобным-доменом BAG6 [52].

1.3.2 Лиганды RNF126

Основной вклад в расширение химического пространства ковалентных лигандов E3-лигаз внесла научная группа под руководством Даниэля Номуры (Институт иновационной протеомики, Беркли, США). Пытаясь решить проблему сложности поиска и дизайна новых рекрутеров, коллеги в работе 2021 года провели профилирование протеома убиквитинлигаз на предмет нахождения реактивных остатков Cys, на связывание с которыми могли бы быть нацелены будущие лиганды [28].

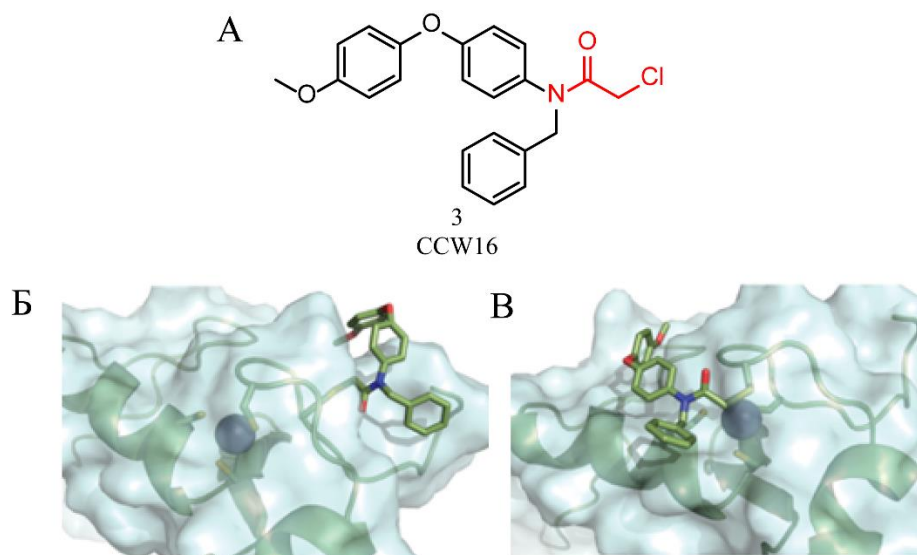
Авторы использовали подход isoTOP-ABPP на основе клик-химии, подробно описанный выше, с IA-ацетиленовым зондом, который конъюгировался с изотопным репортером с помощью клик-реакции азид-алкинового присоединения. Проанализировав спектральные отчеты в общем сложности для 675 E3-лигаз, коллеги определили, что 97% (или 653 белка) из них содержат остатки цистеина, доступные для модификации.

Однако сами же авторы призывают быть осторожными, интерпретируя эти данные, и иметь в виду, что совсем не обязательно обнаруженные Cys содержатся в пригодных для связывания карманах. Кроме того, некоторые E3 могли быть не обнаружены данной системой для анализа из-за низких уровней экспрессии и/или частичного разворачивания/деградации во время лизиса клеток [28]. Тем не менее, полученные данные представлены в таблице ниже (таблица 1).

Таблица 1 – Список реактивных цистеинов в составе E3-лигаз

E3 лигаза	Реакционный цистеин	E3 лигаза	Реакционный цистеин
RNF114	C110	RNF113A	C15
RNF4	C132/C135	RNF123	C461
DCAF16	C177, C179	RNF126	C32
DCAF11	C460	RNF128	C15
FEM1B	C186	RNF130	C320
CRBN	C188, C287	RNF149	C295
VHL	C77	RNF167	C271
RNF2	C72	RNF180	C28

Основываясь на полученных данных, группа Номуры смогла идентифицировать аффинный рекрутер RNF4 – CCW16 – который за счет хлорацетамидного фрагмента способен ковалентно модифицировать остатки цистеина в позициях 132 или 135 E3 лигазы [11]. Структура лиганда, а также результаты молекулярного докинга представлены на рисунке ниже (рисунок 16).



А – структура ковалентного рекрутера RNF4 – CCW16; Б – способ связывания CCW16 с остатком Cys132 RNF4; В – способ связывания CCW16 с остатком Cys135 RNF4.

Рисунок 16 – Структура ковалентного рекрутера RNF4 и моделирование способа его связывания

Интересным является тот факт, что реактивный цистеин участвует в связывании иона цинка, однако авторы отмечают, что исключение этого остатка из координирующей тетрады, видимо, не окажет существенного влияния на структуру и активность лигазы.

Идентификация способного аффинно связываться лиганда происходила с помощью АВРР в геле с использованием IA-родаминового зонда. Сам метод основывается на количественном определении белка, который способен связывать флуоресцентный репортер в присутствии потенциального лиганда, так, как уже было описано ранее (рисунок 9).

Продолжением исследований в области ковалентного рекрутирования E3 группой Номуры можно считать работу [43], в которой коллегам удалось идентифицировать определенный ковалентно-реактивный фрагмент, добавление которого к различным лигандам позволяет добиться деградации связующих их мишеней.

Авторы начали с простой модификации ингибитора CDK4/6 Рибоциклиба (**12**) [43], содержащего невзаимодействующий пиперазин, по данным рентгеноструктурного анализа, ориентированный в область растворителя. Конъюгируя различные фрагменты с азотом данного гетероцикла и оценивая уровень CDK4 в клетках рака шейки матки С33А, коллеги обнаружили производное циннамамида **13**, способное деградировать POI 26S-зависимым образом (рисунок 17). Интересно, что добавление данного мотива к другому ингибитору CDK4 – палбоциклибу [43], не привело к снижению уровней мишени интереса.

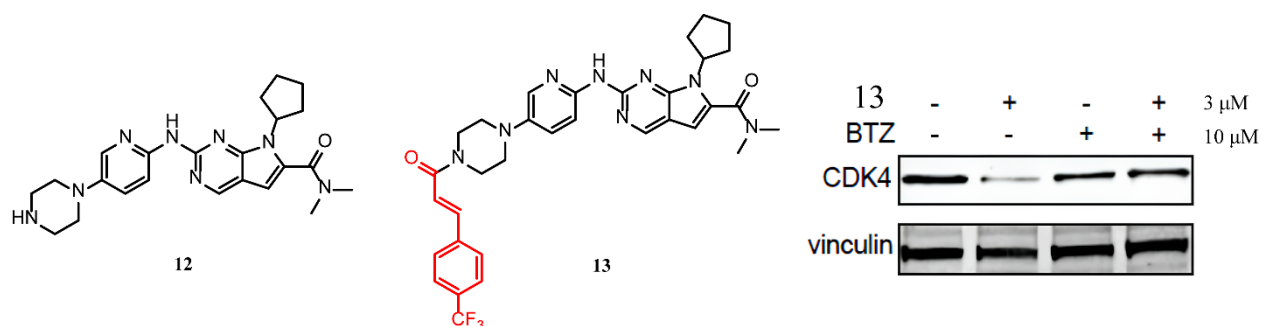


Рисунок 17 – Структуры Рибоциклиба, **13** и оценка деградации CDK4 в клетках С33А

Дальнейшая SAR-оптимизация соединения **13**, привела к **14**, являющегося производным фумаровой кислоты, которое, в отличие от своего циннамамидного аналога, было способно вызывать деградацию CDK4 при меньших концентрациях (1 мкМоль/л против 50 мкМоль/л) (рисунок 18). Кроме того, фумарат при конъюгации с упоминаемым выше палбоциклибом, на удивление, приводил к соединению, способному деградировать мишень интереса, что указывает возможность использования данного мотива в качестве универсального фрагмента, добавление которого в какую-либо молекулу придает ей активность *молекулярного клея*.

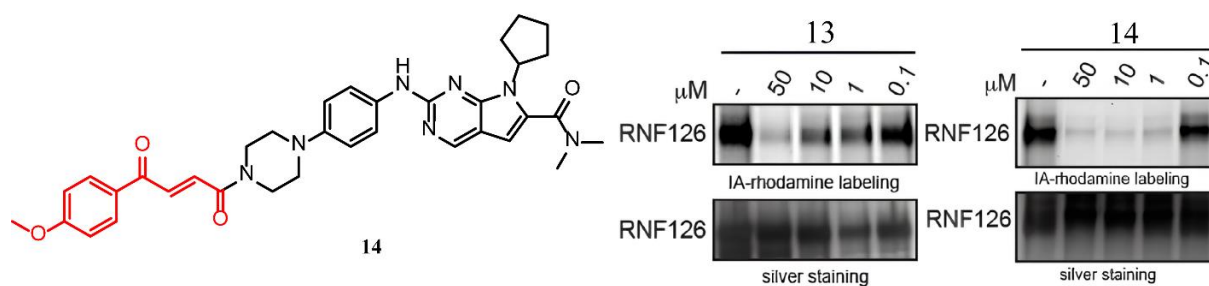


Рисунок 18 – Структура **14** в сравнении с **13** с помощью АВРР на геле

Говоря об этой активности, стоит отметить, что, глядя на зависимость деградации от ингибирования протеасом, авторы изначально предположили E3 – опосредованный механизм. Профилирование протеома с помощью метода isoTOP – АВРР позволило выявить RNF126 в качестве лигазы, которая способна связывать фумаратную бооголовку с остатком Cys32 по механизму присоединения Михаэля.

Номура и коллеги стремились выяснить, наличие какого *минимального* фрагмента требуется в молекуле для того, чтобы аффинно связываться с RNF126. Итеративная деконструкция деградера CDK4 **14**, начавшаяся с *N*–(5–(пиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)пиримидинил-2-аминофумарата **15**, привела к производному пиперазина **16**. Дальнейшие модификации, включающие переход от пиперазина к *N,N*-диэтиламину **17**, опосредовали потерю аффинности (рисунок 19).

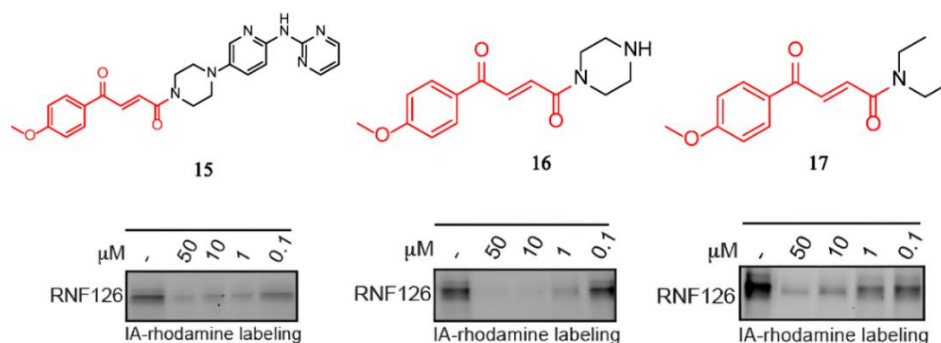


Рисунок 19 – Структуры **15**, **16**, **17** и оценка деградации с помощью АВРР на геле

Таким образом, **16** был определен как минимально-необходимый фрагмент, опосредующий связывание с RNF126. Включение этой фумаровой бооголовки в структуры различных лигандов (как содержащих выходной вектор в виде пиперазина, так и не содержащих), привело к серии деградеров таких мишеней как BRD4 (**18**), AR (**19**), SMARCA2 (**20**), вызывающих заметное снижение уровней этих белков в диапазоне концентраций от 0.1 до 10 μM оль/л и др. (рисунок 20).

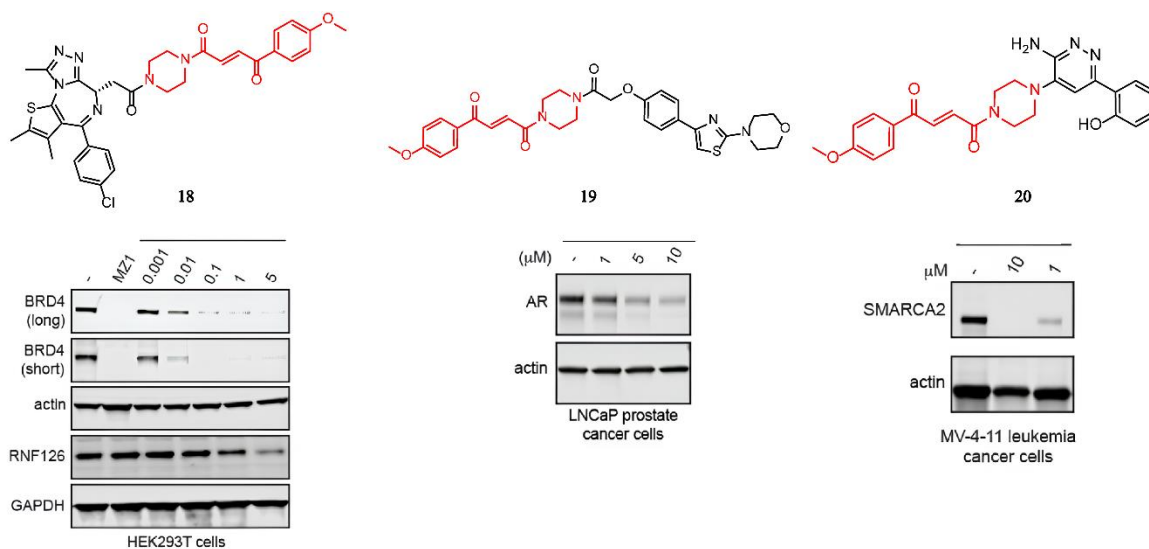


Рисунок 20 – Структуры деградеров **18**, **19**, **20** с оценкой деградации клеток мишеней

В заключение к данному обзору литературы, стоит еще раз отметить важность такой медико-химической концепции, как ковалентное ингибирование. Несмотря на то, что ее использование в дизайне лекарств сопряжено с рядом проблем и трудностей, интерес к ней в академических и промышленных кругах только растет. Особое место эта стратегия заняла в области направленного протеолиза. Лиганды ЕЗ, связывающиеся со своими мишенями ковалентно, на первый взгляд легче поддаются рациональному дизайну, а их создание и тестирование позволит существенно расширить множество рекрутируемых лигаз в обозримом будущем.

2 Результаты и их обсуждение

В настоящее время поиск и дизайн рекрутеров ЕЗ-лигаз является осуществимой, но сложной задачей [53]. Тем не менее, существуют несколько подходов к идентификации и конструированию таких соединений, большая часть из которых была описана выше в литературном обзоре. В данной работе нами был сделан упор на использование *in silico* методов, таких, как ковалентный докинг.

На рисунке ниже представлен общий дизайн исследования, включающий такие этапы как отбор и подготовка структуры белка, генерация библиотеки соединений, нацеленных на связывание с мишенью, ковалентный докинг и анализ полученных данных, а также дополнительное исследование отобранных соединений-хитов с помощью молекулярной динамики (рисунок 21).

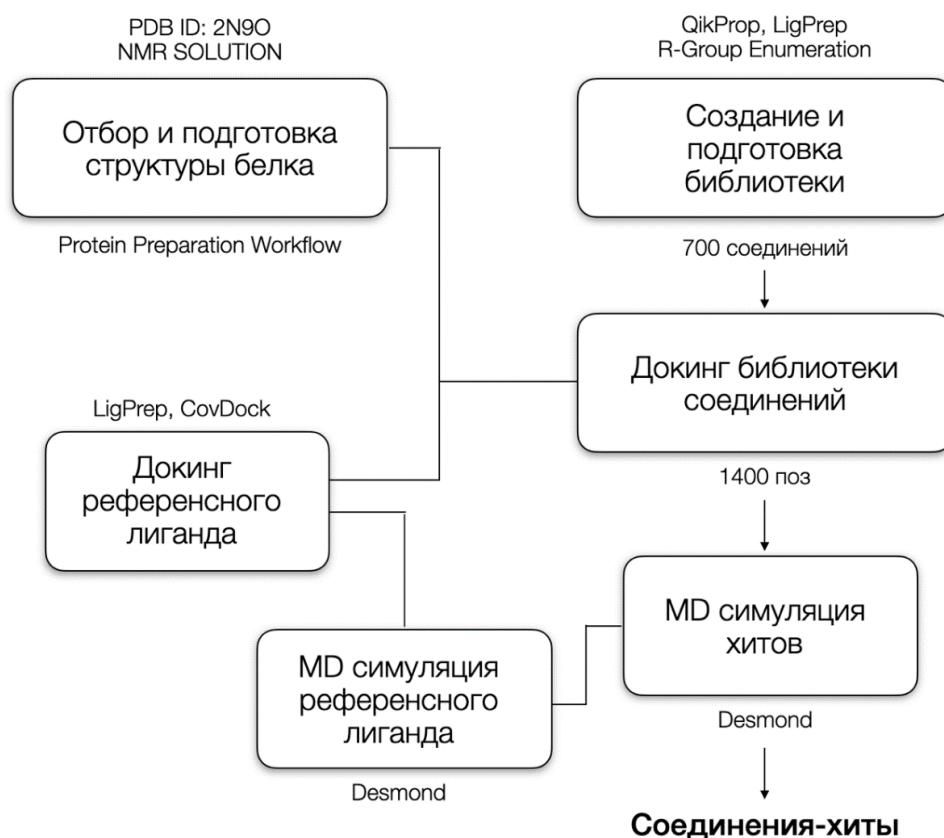


Рисунок 21 – Дизайн исследования

2.1 Подготовка структуры белка

На сегодняшний день в RCSB PDB депонировано три структуры RNF126, причем все из них определены с помощью метода двухмерной спектроскопии ЯМР. Поскольку запись 2N9P содержит комплекс RNF126 – BAG6, структура 2N9O была выбрана нами для дальнейшей работы (таблица 2).

Таблица 2 – Структуры RNF126 в PDB

PDB ID	Метод определения структуры	Организм	Цепь	Конформеров рассчитано	Конформеров представлено
2N9O	ЯМР	<i>Homo sapiens</i>	A – RNF126	100	20
2N9P		<i>Homo sapiens</i>	A – RNF126 B – BAG6		
2ECT		<i>Mus musculus</i>	A – RNF126		

С учетом того, что структуры белков, определенные методом ЯМР, обычно представляют собой ансамбли конформеров, нам было необходимо выбрать один репрезентативный. Как уже упоминалось ранее, ковалентно-реактивным остатком в лигазе RNF126 является Cys в позиции 32 [28]. К нашему облегчению, при наложении всех структур ансамбля выяснилось, что N-концевой домен RING, содержащий целевую аминокислоту, сохраняет одну консервативную конформацию, в отличие от подвижного C-конца белка (рисунок 22).

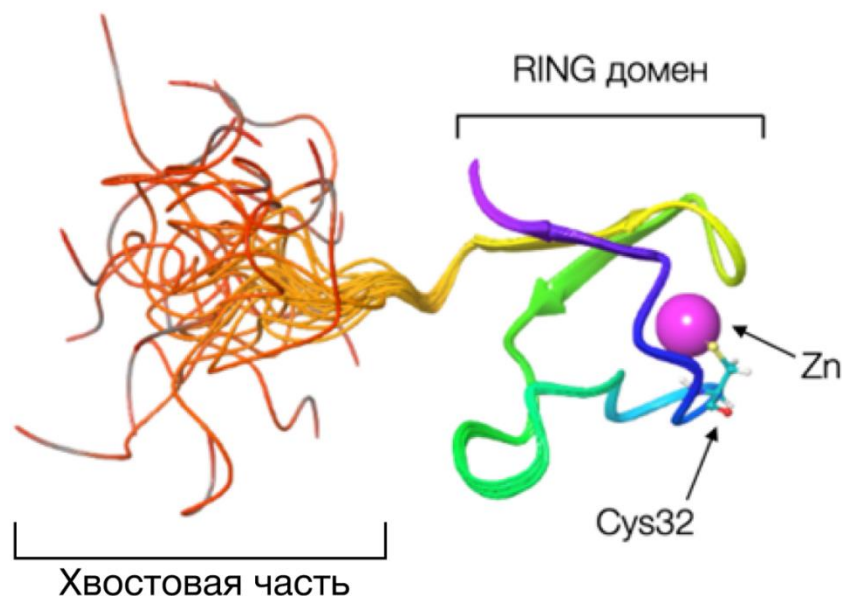


Рисунок 22 – Наложение ансамбля конформеров RNF126

Конформеры были подвергнуты кластеризации с помощью модуля Canvas с получением двух кластеров, содержащих 4 и 16 структур, соответственно. Центр второго кластера был выбран нами в качестве репрезентативной модели для дальнейшей работы.

Структура была подготовлена с помощью модуля Protein Preparation Workflow [54]. Порядки связей были уточнены, атом цинка, координированный Cys13, 16, 29 и 32 удален, тиольные группы восстановлены и все атомы водорода в структуре белка были подвергнуты минимизации с помощью алгоритма Prime [55].

2.2 Создание структур библиотеки

В качестве опорной структуры для создания библиотеки мы использовали единственный рекрутер RNF126, описанный группой Д. Номуры – JP-2-196. Так как коллеги в своей работе никак не исследовали влияние на активность заместителей в бензольном кольце и замены пиперазинового

мотива другими гетероциклами, мы решили сосредоточиться на модификации именно этих фрагментов (рисунок 23).

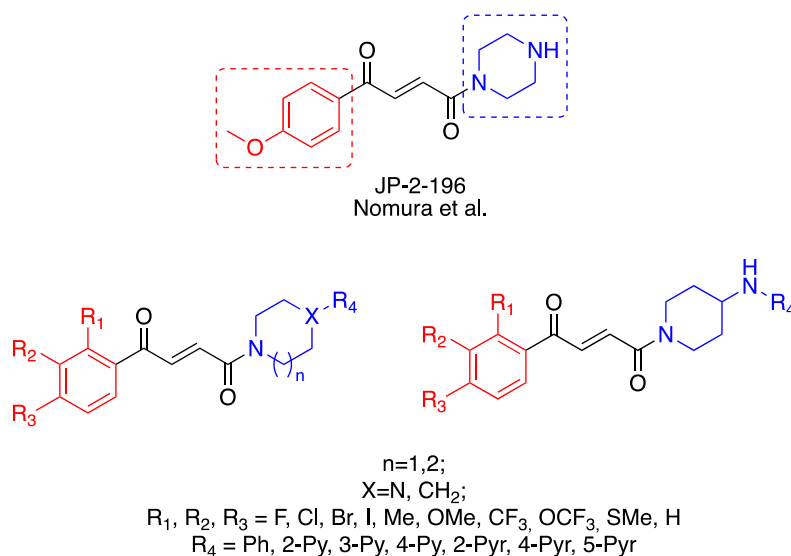
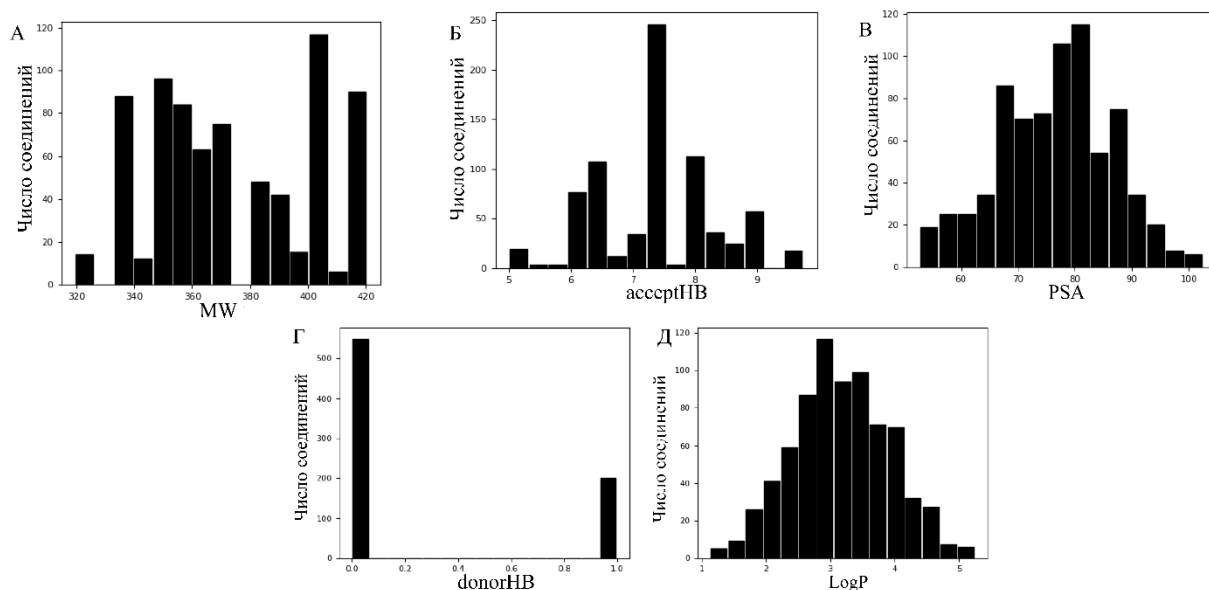


Рисунок 23 – Структуры скрининговой библиотеки

Для создания скринингового набора использовался модуль R-Group Enumeration. Помимо нативного пиперазина, алифатические и гетероциклические производные были представлены диазепином, пиперидином и 4-аминопиперидином, сопряженными с такими заместителями, как бензол, 2-, 3-, 4-пиридирил или 2-, 4-, 5-пиримидинил. В фенильном фрагменте рекрутера RNF126 происходило варьирование классического набора радикалов в *o*-, *m*- и *p*- положениях так, как представлено на рисунке выше (рисунок 23).

Сгенерированная библиотека насчитывала 700 структур, которые были подготовлены с помощью модуля LigPrep [56] по протоколу, включающему генерацию состояний протонирования при pH=7.4±0.2, создание приемлемой начальной геометрии, а также генерацию таутомерных форм.

После генерации библиотеки был произведен расчет физико-химических свойств с помощью модуля QikProp [57]. Графики их распределения представлены на рисунке ниже (рисунок 24).



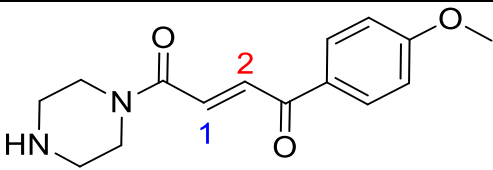
А – Молекулярная масса, Да; Б – число акцепторов водородной связи, шт; В – площадь полярной поверхности, \AA^2 ; Г - число доноров водородной связи, шт; Д – липофильность.

Рисунок 24 – Аннотирование физико-химических свойств библиотеки

2.3 Ковалентный докинг референсного лиганда

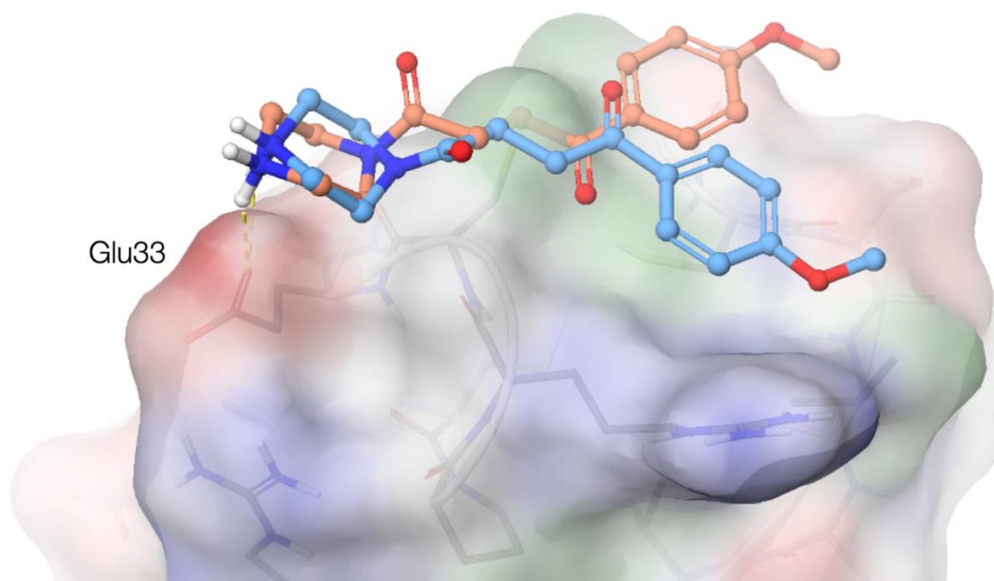
Референсный лиганд был подготовлен по протоколу, описанному выше, и подвергнут ковалентной стыковке с помощью модуля CovDock [34] в режиме точности Pose Prediction с использованием Cys32 в качестве реактивного атома и такого типа реакции, как присоединение по Михаэлю. С учетом того, что данный лиганд содержит два неэквивалентных реакционных центра, алгоритм генерировал по пять поз для каждого региоизомера. Результаты стыковки представлены в таблице ниже. Зеленым цветом выделены соединения-лидеры (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты ковалентного докинга

				
Реактивный атом лиганда	Поза	Prime Energy, ккал/моль	MMGBSA ΔG_{Bind} , ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
1	1	-1289.17	-22.17	-2.277
	2	-1287.82	-21.30	-2.540
	3	-1287.82	-20.44	-2.508
	4	-1289.17	-20.31	-2.432
	5	-1290.83	-19.88	-2.203
2	1	-1294.89	-20.65	-2.468
	2	-1293.96	-20.07	-2.209
	3	-1289.95	-19.99	-2.258
	4	-1293.11	-19.44	-2.472
	5	-1290.39	-19.28	-2.487

На рисунке 25 показаны способы связывания отобранных поз соединения **16** в области домена цинкового пальца. Как можно заметить, пиперазиновый мотив обоих региоизомеров образует водородную связь с Glu33, ориентируясь в положительно заряженную область на поверхности белка. Положение фенильного фрагмента имеет некоторые отличия. Так, лиганд, образующий ковалентную связь через второй атом не укладывается в полость, сформированную возле Cys15.

зеленый — гидрофобные участки
красный — положительно заряженная область
синий — отрицательно заряженная область



Синий – лиганд, образующий ковалентную связь через первый атом; Красный – лиганд, образующий ковалентную связь через второй атом

Рисунок 25 – Способ связывания **16** по двум положениям в домен цинкового пальца

Дополнительно была проведена молекулярно-динамическая симуляция в течение 100 нс с помощью модуля Desmond для первого региоизомера референсного лиганда. На рисунке ниже представлен график зависимости среднеквадратичного отклонения (*англ.* RMSD, The Root Mean Square Deviation) атомов белка и лиганда от времени (Рисунок 28). Как можно отметить, несмотря на довольно высокоамплитудные колебания вплоть до 80 нс, системе удалось войти в равновесное состояние под конец симуляции. Средние значения RMSD на этом участке траектории составили примерно 6.5 Å и 5.4 Å для C_{α} атомов белка и лиганда, соответственно (рисунок 26).

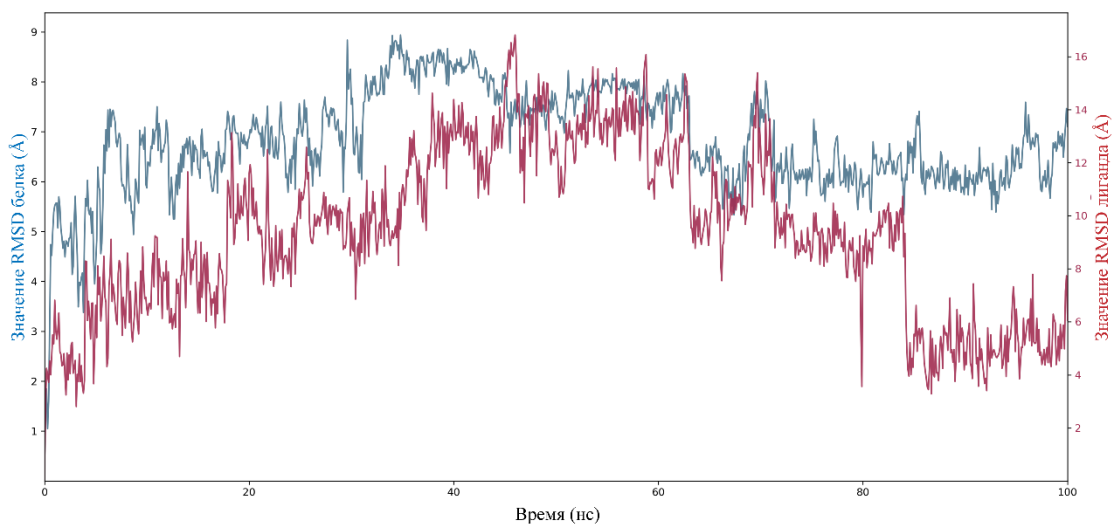


Рисунок 26 – График зависимости RMSD атомов белка (синий) и лиганда (красный)

Анализ конформационного профиля лиганда показывает, что на протяжении всего времени симуляции диэдральные углы принимают значения, соответствующие локальным минимумам на кривых потенциальной энергии. Самую высокую подвижность ожидаемо демонстрируют 4 – метоксифенильный и пиперазиновый фрагменты, отмеченные голубым и темно-зеленым цветом, соответственно (рисунок 27).

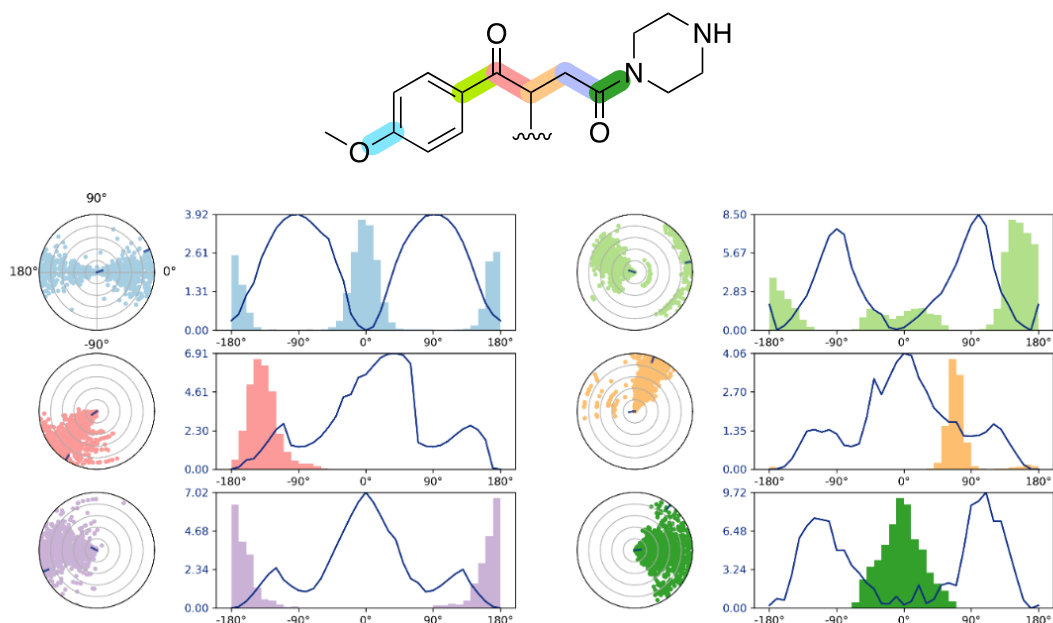


Рисунок 27 – Конформационный профиль лиганда

Анализ траектории позволяет обнаружить, что водородная связь, образующаяся между карбоксильной группой Glu33 и протонированным азотом пиперазина, разрывается уже к третьей пс в следствие движения петли и не образуется вновь (рисунок 28).

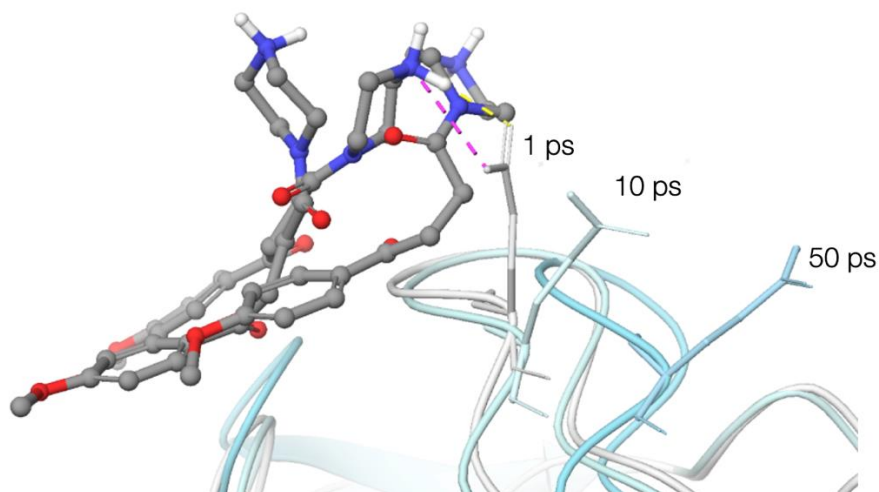


Рисунок 28 – Траектория комплекса, полученная в ходе молекулярно-динамической симуляции

Стоит отметить, что большую часть времени симуляции пиперазиновый фрагмент свободно ориентируется в область сольватации, постоянно взаимодействуя с молекулами воды и практически не контактируя с атомами белка. Подобное расположение в пространстве также представляет собой удобный вектор выхода для конъюгации с лигандами POI. Как упоминалось выше, ароматическая система укладывается в полость, образованную возле Cys15, и сохраняет подобную довольно консервативную ориентацию на протяжении всей молекулярно-динамической симуляции. Иных взаимодействий между остатками белка и лигандом не образуется (рисунок 29).

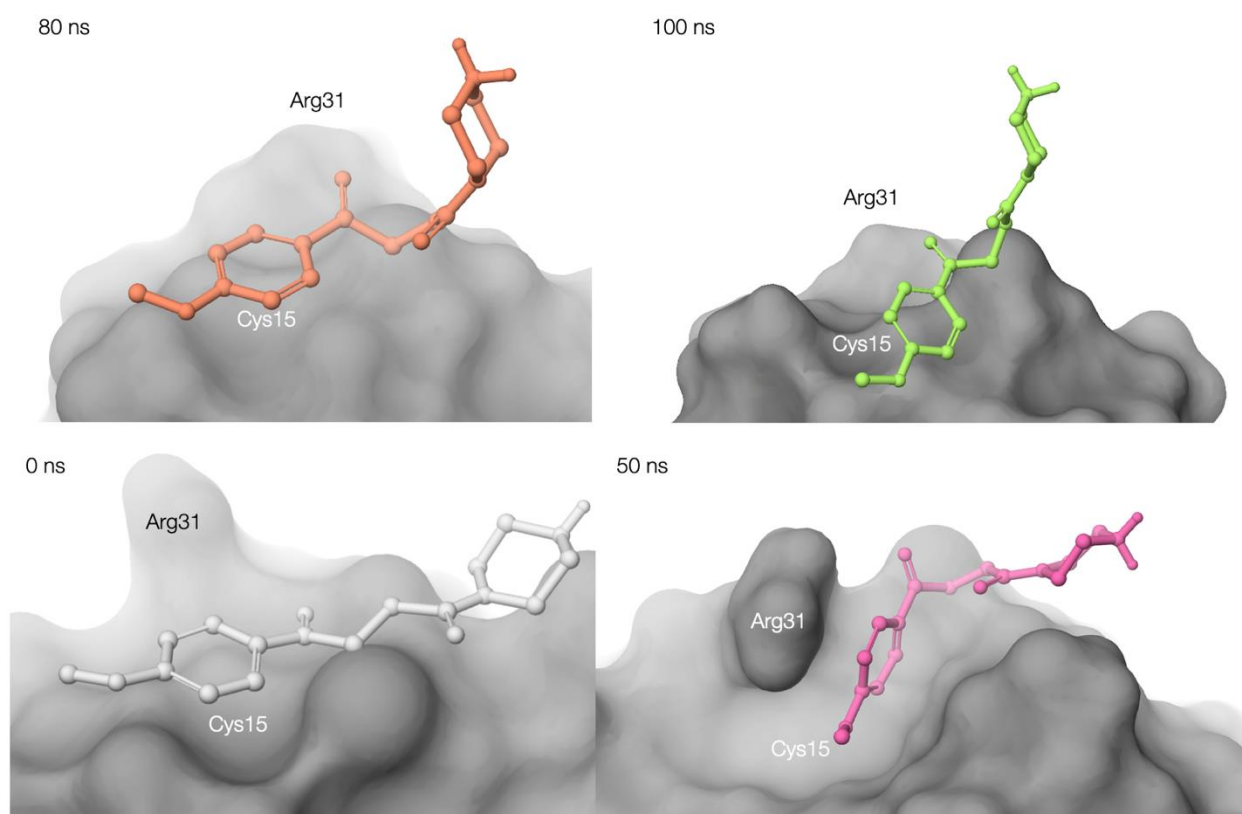


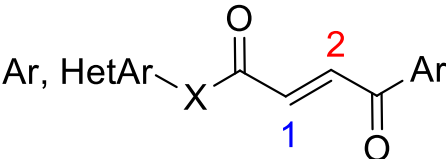
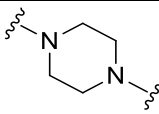
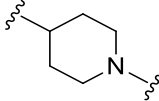
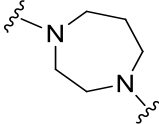
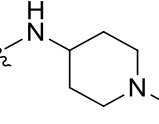
Рисунок 29 – Молекулярно-динамическая симуляция референсного лиганда

2.3.1 Влияние гетероциклического фрагмента на аффинность связывания

Докинг скрининговой библиотеки был проведен с помощью того же модуля CovDock в режиме точности Pose Prediction, алгоритм генерировал по две позы для каждого стыкуемого соединения, суммарно предсказав 1400 поз.

В попытках выяснить, какой из гетероциклических скаффолдов способен генерировать наиболее энергетически выгодные позы, мы рассчитали усредненные значения скоринга для каждого из них (таблица 4).

Таблица 4 – Усредненные значения скоринга для каждого скаффолда

								
X	Реактивный атом лиганда							
	1				2			
	Значения скоринга, ккал/моль (средние значения)							
	Сред. ранг	ΔG_{bind} MM GBSA	CDock Affinity	Prime Energy	Сред. ранг	ΔG_{bind} MM GBSA	CDock Affinity	Prime Energy
	361.52	-22.93	-1.48	-1252.96	329.39	-21.29	-1.32	-1255.24
	490.93	-20.84	-1.28	-1281.05	419.15	-20.66	-1.03	-1283.21
	304.60	-21.02	-1.50	-1269.60	317.51	-20.58	-1.48	-1271.05
	248.68	-22.67	-1.45	-1299.27	335.94	-23.17	-1.54	-1303.06

Рассматривая CDock Affinity в качестве основного элемента нашей оценки, мы пришли к выводу, что в целом хуже всего себя показали производные пиперидина. Среди 1-региоизомеров лидирующими стали соединения с diazepиновым скаффолдом, а среди 2-региоизомеров – с

аминопиперидиновым. Кроме того, рассчитанные значения средних рангов по CDock Affinity косвенно это подтверждают.

Диазепиновый мотив, находясь в ненапряженной конформации, позволяет направить заместители в положении R₄ в область близ Glu33, где с последним возможно образование взаимодействий. В качестве примера приведем способ связывания соединения **21**, диазепиновый фрагмент которого ориентирует 4-пиридилилу так, чтобы образовывать водородную связь с глутаминовой кислотой. (рисунок 30).

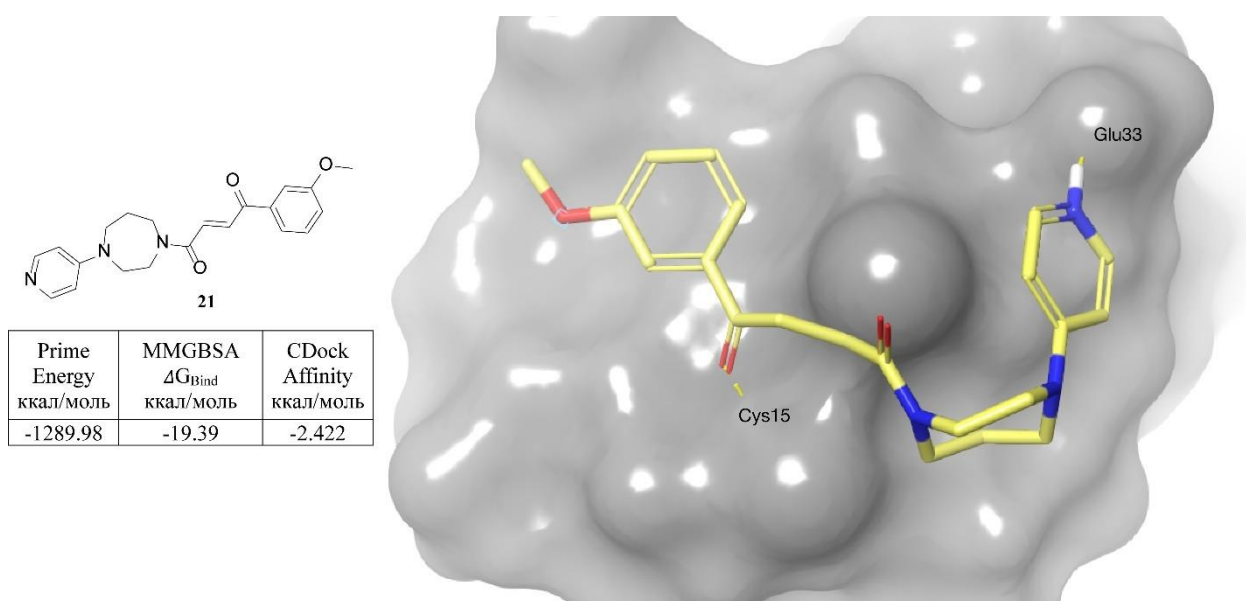


Рисунок 30 – Способ связывания соединения **21** (реактивный атом: 1)

В качестве 2-региоизомера, было отобрано соединение **22**, содержащее 4-амино-пиридилильный скаффолд, за счет которого удается образовать взаимодействие с Cys32 (рисунок 31).

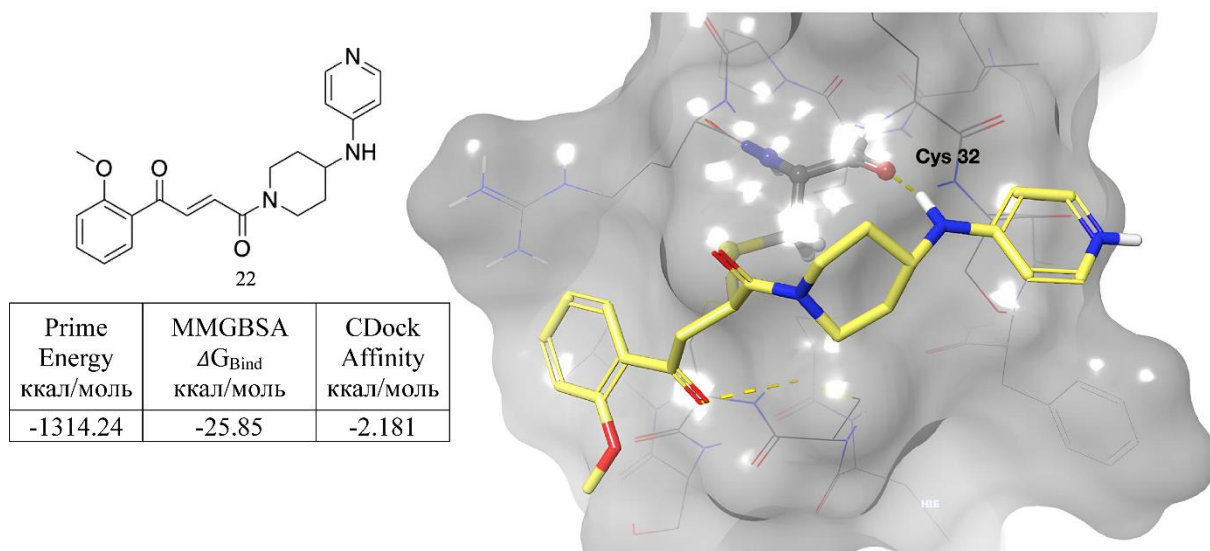


Рисунок 31 – Стыковка **22** на поверхности белка (реактивный атом: 2)

Не спеша вручную просматривать 1400 полученных поз, мы сгенерировали тепловые карты, представленные на рисунках ниже, стремясь идентифицировать возможные визуальные паттерны, соответствующие высоким и низким значениям скоринга по CDock Affinty (рисунок 32).

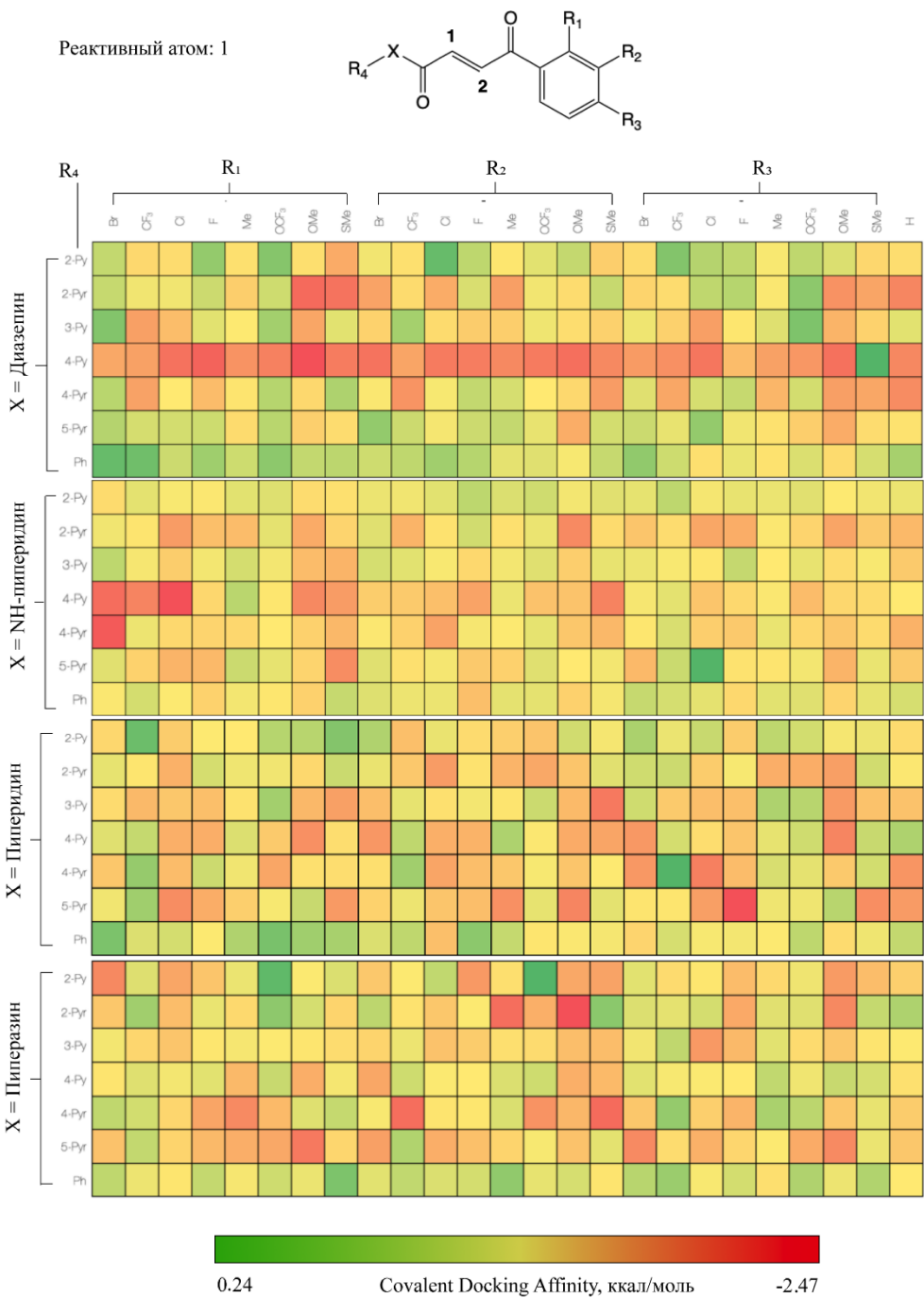


Рисунок 32 – Тепловая карта для 1 атома

Как можно увидеть, наиболее низкоэнергетические значения CDock Affinity имеют соединения, содержащие с 4-пиридинил в положении R₄, как мы уже демонстрировали, из-за образования взаимодействия с Glu. Наиболее

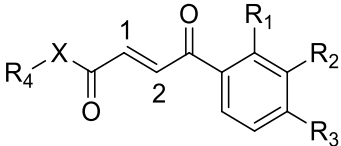
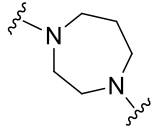
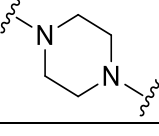
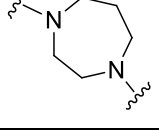
ярко вклад 4-Рy в скоринг прослеживается в случае diaзепинового и пиперидинового скаффолдов.

Говоря про заместителей в арильном кольце, нельзя не отметить соединения, содержащие метоксигруппу, хлор или бром. Зависимость от конкретного положения (*o*-, *m*- или *n*-) установить на первый взгляд не удастся.

Тепловая карта, отражающая результаты скрининга для случая, когда реактивным являлся условный второй атом фумаратного мотива, представлена в приложении А.

В таблицах ниже представлены общие результаты скрининга, ранжированные по значению CDock Affinity. Показаны десять лучших и пять худших соединений для каждого из региоизомеров (таблица 5,6). Полностью результаты докинга представлены в приложении Б.

Таблица 5 – Результаты ковалентного докинга для первого реактивного атома

							
X	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	Prime Energy ккал/моль	MMGBSA ΔG _{bind} ккал/моль	CDock Affinity ккал/моль
1	2	3	4	5	6	7	8
Реактивный атом: 1							
Референсный лиганд					-1287.89	-21.30	-2.540
	4-пу	OMe	H	H	-1284.60	-26.71	-2.688
		F	H	H	-1287.51	-22.18	-2.522
	2-пуr	H	OMe	H	-1252.49	-29.30	-2.478
	2-пуr	OMe	H	H	-1262.34	-24.29	-2.464
	4-пу	H	OMe	H	-1281.98	-19.39	-2.422

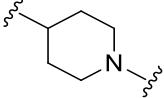
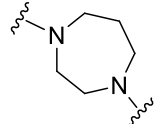
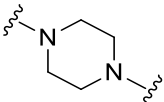
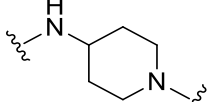
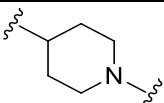
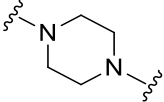
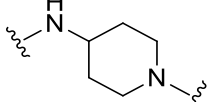
Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8
	4-пу	Cl	H	H	-1319.89	-21.81	-2.400
	4-пу	H	H	OMe	-1281.36	-22.93	-2.397
		Cl	H	H	-1286.90	-24.31	-2.394
	2-пу	H	OCF ₃	H	-1269.70	-14.09	0.134
	5-пуr	H	H	Cl	-1289.50	-19.53	0.173
	4-пуr	H	H	CF ₃	-1269.48	-19.25	0.235

Таблица 6 – Результаты ковалентного докинга для второго реактивного атома

X	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	Prime Energy ккал/моль	MMGBSA ΔG _{Bind} ккал/моль	CDock Affinity ккал/моль
1	2	3	4	5	6	7	8
Реактивный атом: 2							
Референсный лиганд					-1290.39	-19.28	-2.487
	4-пу	H	Cl	H	-1281.48	-25.47	-2.665
		H	OMe	H	-1281.19	-23.62	-2.646
	2-пу	Cl	H	H	-1257.74	-33.94	-2.584
	4-пу	H	H	H	-1254.58	-21.92	-2.562

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8
	2-пу	F	H	H	-1281.37	-28.58	-2.462
	4-пу	H	H	Br	-1279.47	-22.57	-2.455
	2-пуr	OMe	H	H	-1263.22	-24.58	-2.445
	4-пу	H	H	OMe	-1255.74	-24.07	-2.438
	4-пу	H	OMe	H	-1312.55	-22.22	-2.428
	2-пу	H	H	SMe	-1281.64	-26.90	0.912
	4-пу	SMe	H	H	-1258.85	-28.62	1.206
	3-пу	SMe	H	H	-1294.62	-32.71	1.792

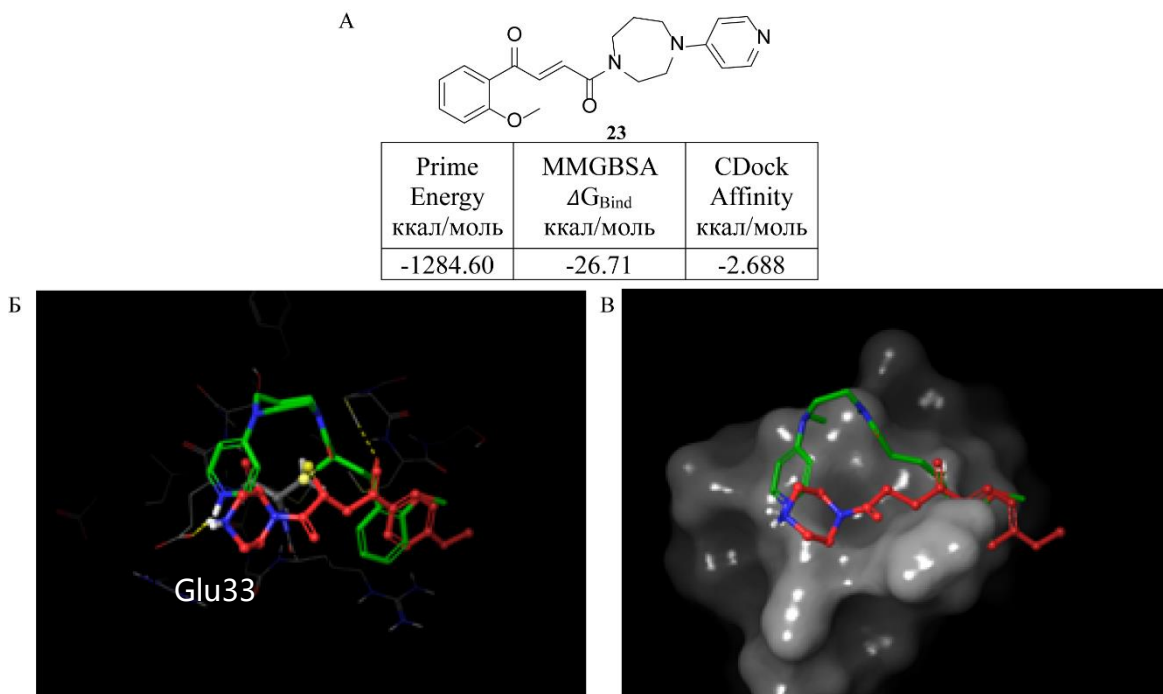
В целом можно отметить, что только одному соединению удалось превзойти референсный лиганд по CDock affinity, однако порядка 215 структур ранжируются выше нативного при сортировке по значению свободной энергии связывания MM-GBSA ΔG_{Bind} .

Как и стоило ожидать, верхние строчки рейтинга занимают лиганды, содержащие 4-пиридинил и иногда 2-пиримидинил в качестве R₄, Cl, OMe и F в качестве R₁, R₂ или R₃, а также diazepin или NH-пиперидин в качестве гетероциклического скелета X.

Как правило, 4-Пу протонирован и все также образует связь с глутаминовой кислотой в позиции 33, чем и можно объяснить столь хорошие значения скоринга этих соединений. Однако, если задумываться о дальнейшей оптимизации лигандов набора, которая будет заключаться в конъюгации их с

различными рекрутерами POI для сборки деградеров, то такая фиксация не играет на руку из-за выходного невыгодного прикрепления прикрепления этого рекрутера, направленного вдоль поверхности белка, а не в зону сольватации. Не стоит, правда, забывать о том, что в расчете CovDock не происходит учета растворителя и явной подвижности лигандов – мы уверены, что молекулярная динамика сможет ответить на вопрос о истинной конформации связки гетероцикла X и R₄.

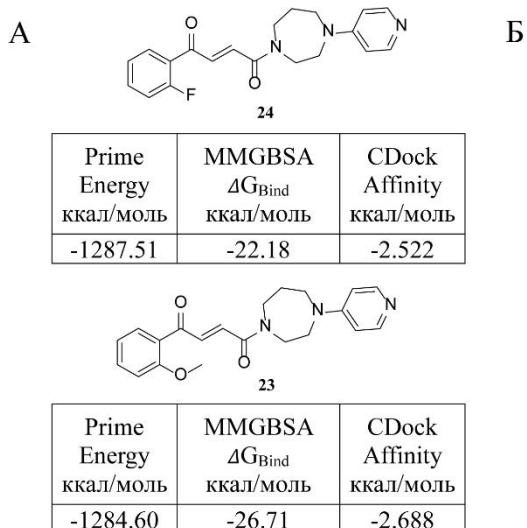
В подтверждение сказанного, приведем способ связывания соединения-лидера **23** в сравнении с референсом (региоизомер: 1) (рисунок 33).



А – структура и значения скоринга; Б – способ связывания; В – стыковка в сайт мишени.

Рисунок 33 – Связывание нативного лиганда (красный) и **23** (зеленый)

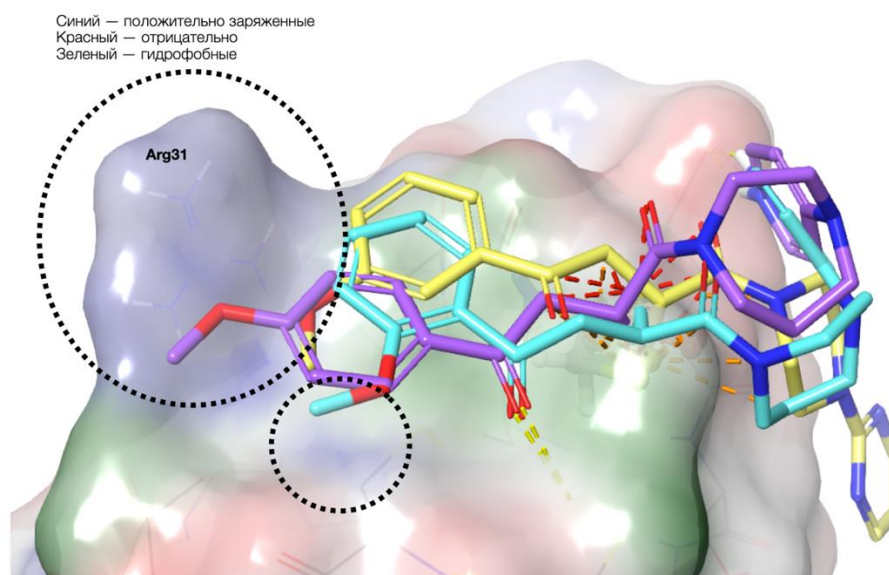
Тоже самое можно сказать про связывание структуры **24**, которое также ориентирует 4-Ру в положение, удобное для взаимодействия с Glu33. На рисунке ниже также можно увидеть, что способ связывания бензольных колец не отличается от нативного (рисунок 34).



А – Структуры и значения скоринга **23** и **24**; Б – способы связывания нативного лиганда и соединения **23** и **24**;

Рисунок 34 – Способы связывания референсного лиганда (красный), **23** (зеленый) и соединения **24** (желтый)

Большая часть лигандов-лидеров, содержащих метоксигруппу, довольно комплиментарно с точки зрения зарядов ориентирует ее в области, отмеченные на рисунке ниже. Представлены способы связывания соединений **23** (CDock Affinity = -2.688 ккал/моль, MM-GBSA ΔG_{Bind} = -26.71 ккал/моль), **25** (CDock Affinity = -2.445 ккал/моль, MM-GBSA ΔG_{Bind} = -24.58 ккал/моль) и **26** (CDock Affinity = -2.646 ккал/моль, MM-GBSA ΔG_{Bind} = -23.62 ккал/моль), все из которых ранжируются выше нативного по значениям (рисунок 35).



Желтый — 23, Голубой — 25, Фиолетовый — 26

Рисунок 35 – Способ связывания 23, 25, 26

С другой стороны, наличие фтор, хлор- или бромзамещения фенила, очевидно, позволяет увеличить вклад гидрофобных взаимодействий с остатками Cys 15 и 16. В качестве примера на рисунке ниже представлен способ связывания соединения 27 (CDock Affinity = -1.942 ккал/моль и MM-GBSA ΔG_{Bind} = -23.62 ккал/моль) (рисунок 36).

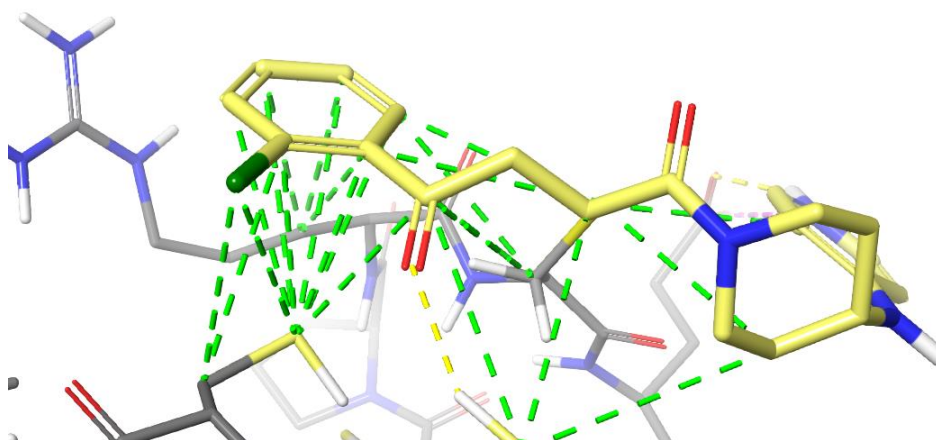


Рисунок 36 – Способ связывания соединения 27; зеленый пунктир – гидрофобные контакты

В заключение вернемся к обсуждению diazepинового фрагмента в соединениях-лидерах. На рисунке ниже видно, что во всех случаях diazepиновый фрагмент и фенильный мотив с различными заместителями сохраняют свое положение в сайте (рисунок 37).

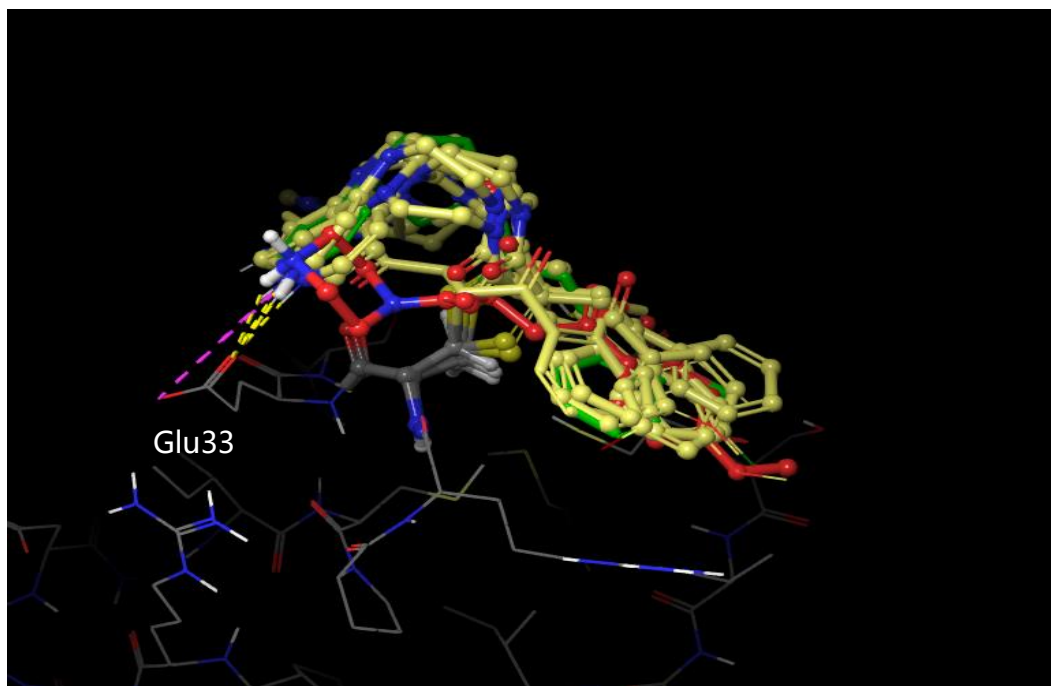
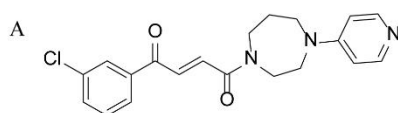


Рисунок 37 – Наложение всех соединений с diazepиновым мотивом и референсного лиганда

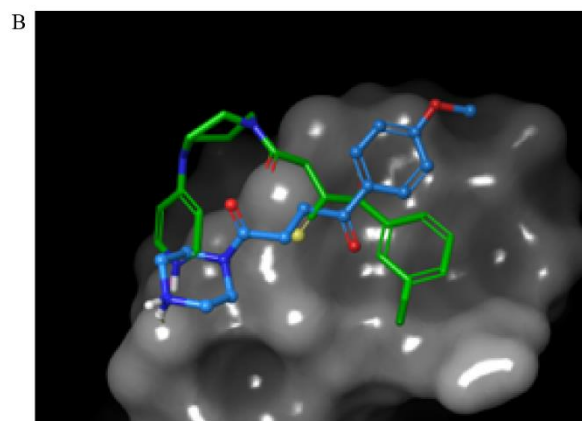
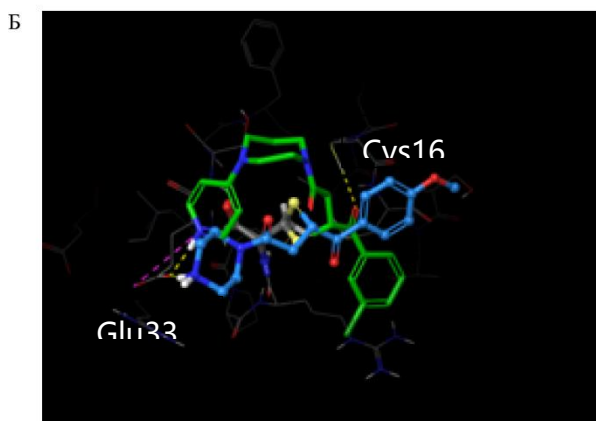
При рассмотрении результатов докинга для случая, когда в качестве реактивного был выбран второй атом, можно заметить, что в верхних строчках рейтинга наиболее часто встречаются два гетероцикла X, а именно diazepин и пиперазин. Стоит отметить, что заместителями для первого чаще всего являются 4-пиридирил и 4-пиримидинил.

При наложении референсного лиганда с соединением **28** – лидером по CDock Affinity, можно заметить, что все взаимодействия, характерные для способа связывания по первому атому, сохраняются. Разница состоит только в расположении бензольного ядра (рисунок 38).



28

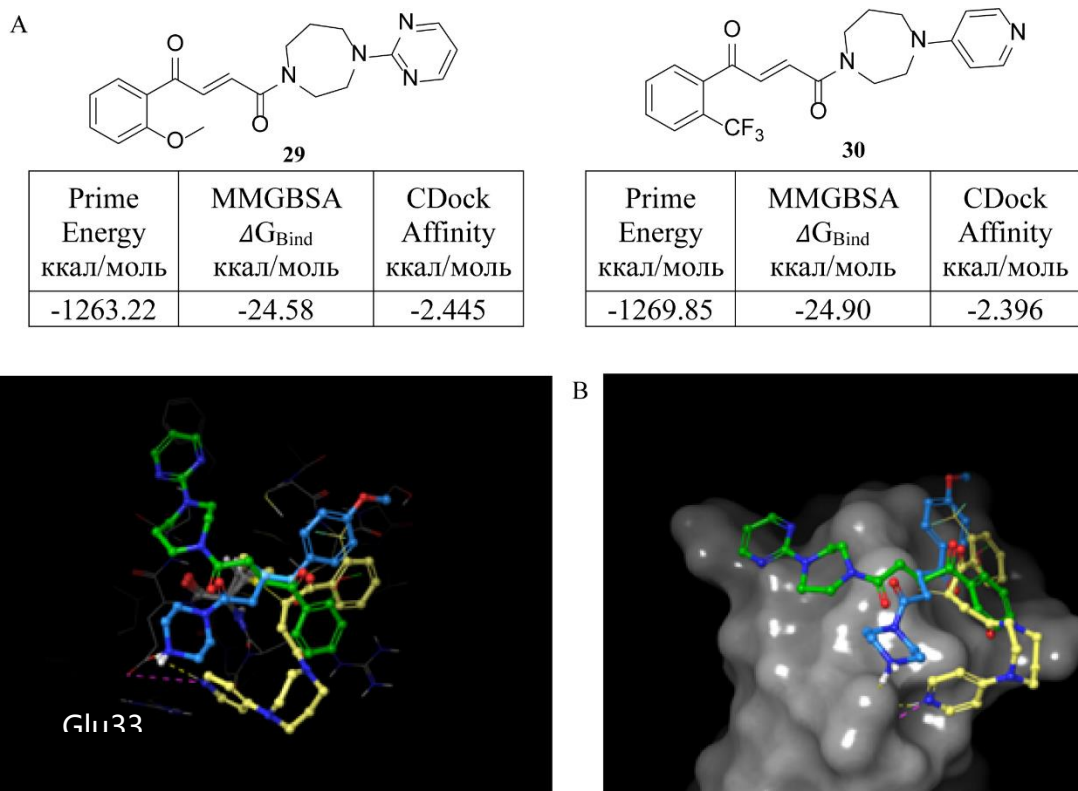
Prime Energy ккал/моль	MMGBSA ΔG_{Bind} ккал/моль	CDock Affinity ккал/моль
-1281.48	-25.47	-2.665



А – структура и значения скоринга; Б – способ связывания; В – стыковка в сайт мишени.

Рисунок 38 – Связывание референсного лиганда (синий) и **28** (зеленый)

Для большинства производных diazepина сохраняется тоже самое расположение лиганда, однако существуют исключения в виде двух структур, содержащих 2-пиримидиновый мотив с метокси-группой в фенильном кольце и 4-пиридиновый с CF_3 в *орто*-положении (рисунок 39). Также стоит отметить, что лиганд с пиридиновым фрагментом ориентируется в противоположную сторону, но все ключевые взаимодействия реализует.



A – структура и значения скоринга соединений; Б – способ связывания; В – стыковка на поверхность мишени.

Рисунок 39 – Наложение нативного лиганда (синий), соединения с **30** (желтый) и **29** (зеленый)

Стоит отметить, что среди лучших соединений встречаются структура, несущие пиперазин в качестве гетероциклического скаффолда (такого же, как и в референсе). Однако ни одному из них не удастся воспроизвести нативную укладку на поверхности белка. В качестве примера на рисунке ниже представлены способы связывания соединений **31** и **32** (рисунок 40).

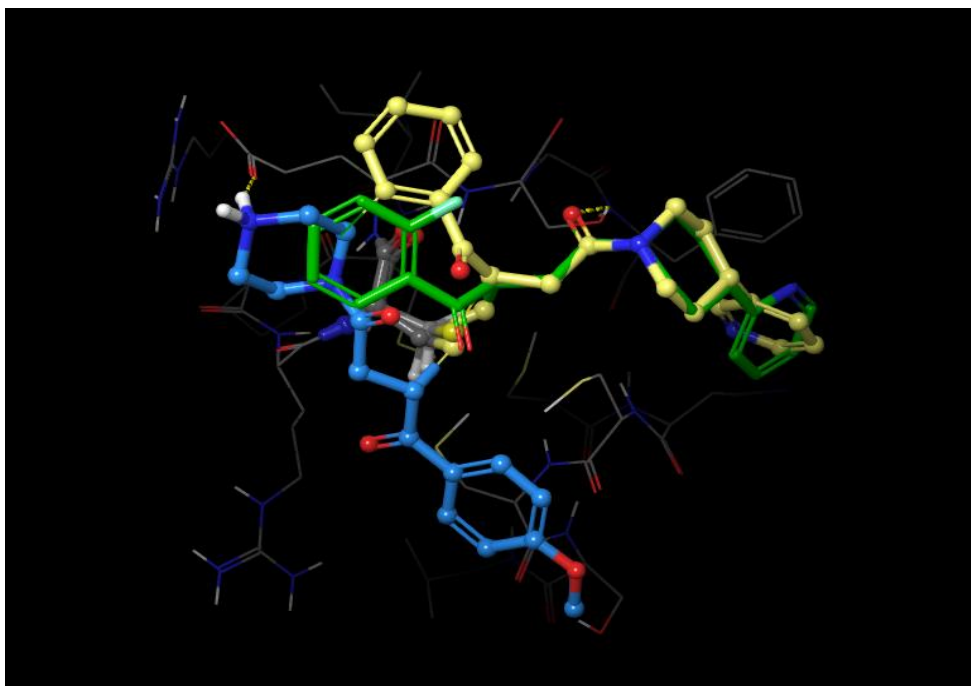


Рисунок 40 – Наложение референсного лиганда (синий) с соединениями, содержащими пиперазиновый скаффолд (**31** – желтый, **32** – зеленый)

Проанализировав результаты стыковки, можно сделать следующие выводы:

– большинство хитов является производными диазепина. За счет своей гибкости он способен ориентировать гетероциклические фрагменты на связывание с соответствующими аминокислотами; обеспечить такую связь лучше других способен 4-пиридинил;

– большая часть хитов демонстрирует схожую с нативным укладку фенильного мотива. Часто встречаемыми заместителями в нем являются OMe, F и Cl;

– проанализированные соединения демонстрируют сопоставимые с референсом значения CDock Affinity, а также превосходят его по значению MM-GBSA ΔG_{Bind} .

Говоря про аутсайдеров, можно отметить соединения **33–36** – все они демонстрируют *положительные* значения CDock Affinity (рисунок 41).

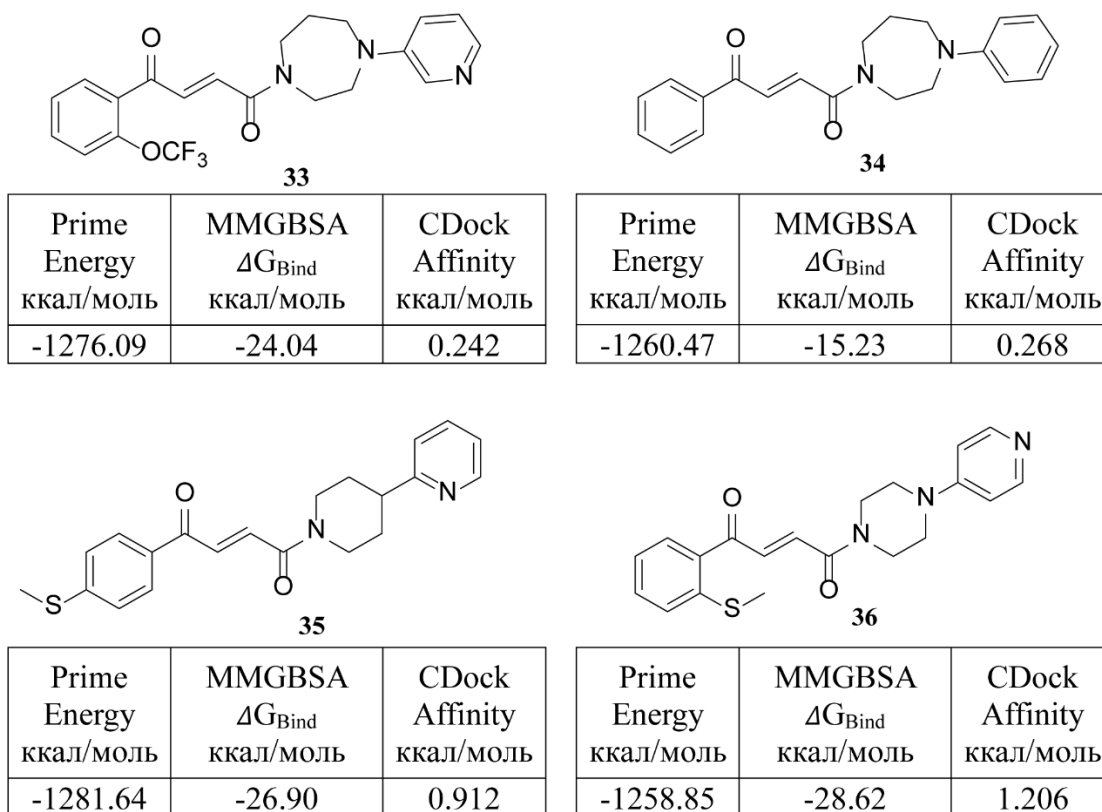


Рисунок 41 – Худшие соединения по значениям CDock Affinity

Все структуры, представленные на рисунке, присоединяются по второму атому двойной связи. При наложении **34** с **16** можно увидеть, что лиганды образуют только ключевое взаимодействие с Cys32, а diazepin напряжен из-за деформации и направлен в область сольватации, не позволяя образовать дополнительные взаимодействия (рисунок 42).

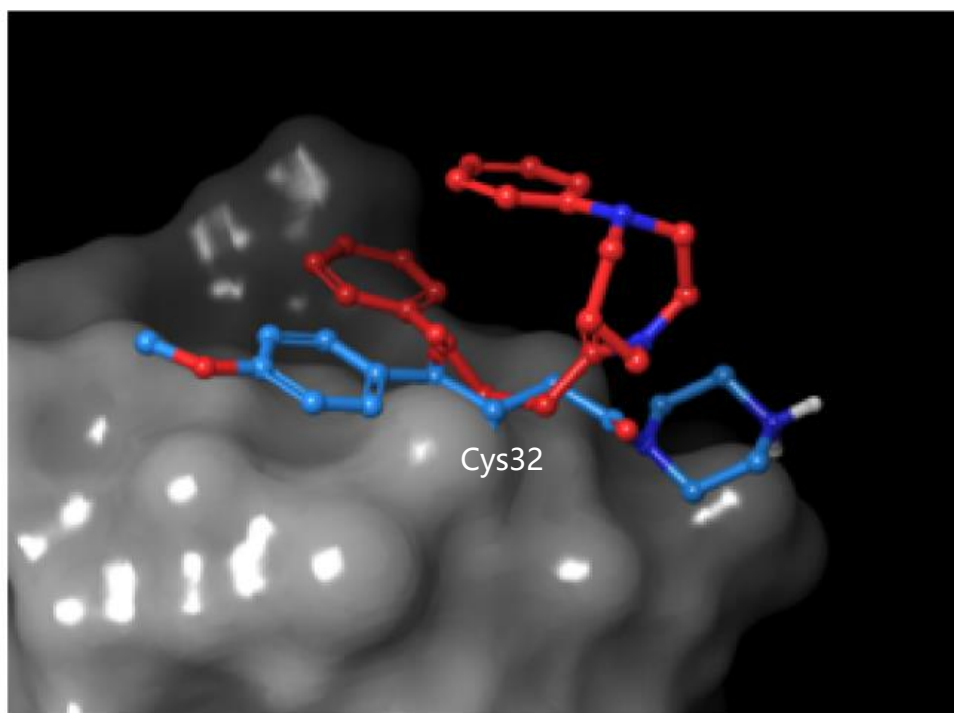


Рисунок 42 – Наложение и способ связывания соединений **34** (красный) и **16** (синий)

2.4 Симуляция молекулярной динамики соединений-хитов

После анализа способов связывания были отобраны три соединения-хита. Два из них – **23** и **28** – ранжировались выше всех только по CDock Affinity, одно – **37** – показывало хороший скоринг по всем трем параметрам (Prime Energy = -1306.27 ккал/моль, MM-GBSA ΔG_{Bind} = -21.03 ккал/моль, CDock Affinity = -2.472 ккал/моль) (рисунок 43).

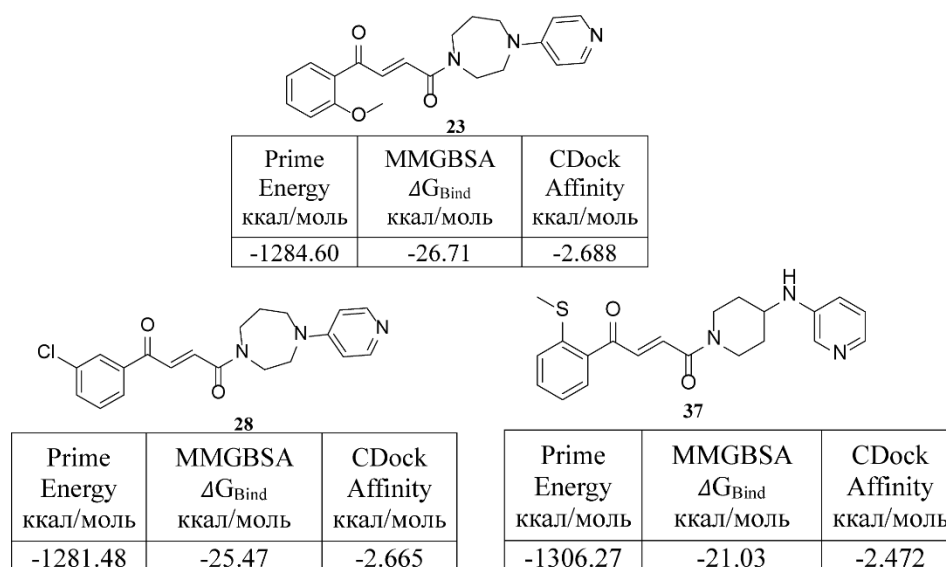


Рисунок 43 – Отобранные соединения для молекулярно-динамической симуляции

Для всех трех соединений была проведена симуляции молекулярной динамики длительностью 100 нс с помощью Desmond [59].

Начать анализ стоит с **28** соединения, которое является абсолютным лидером по показателям CDock Affinity. Кадры траектории были кластеризованы с помощью Desmond Trajectory Clustering, результаты представлены на рисунке ниже. Структура, соответствующая центру лидирующего по размеру кластера, показана зеленым. Можно сделать вывод о том, что фенильный фрагмент (подобно нативному лиганду) связывается рядом с остатком Cys15, однако происходит заглубление ароматического ядра внутрь белка. Диазепин чаще всего ориентирует пиридиновый заместитель вдоль поверхности RNF126. Конформационной консервативности не наблюдается (рисунок 44).

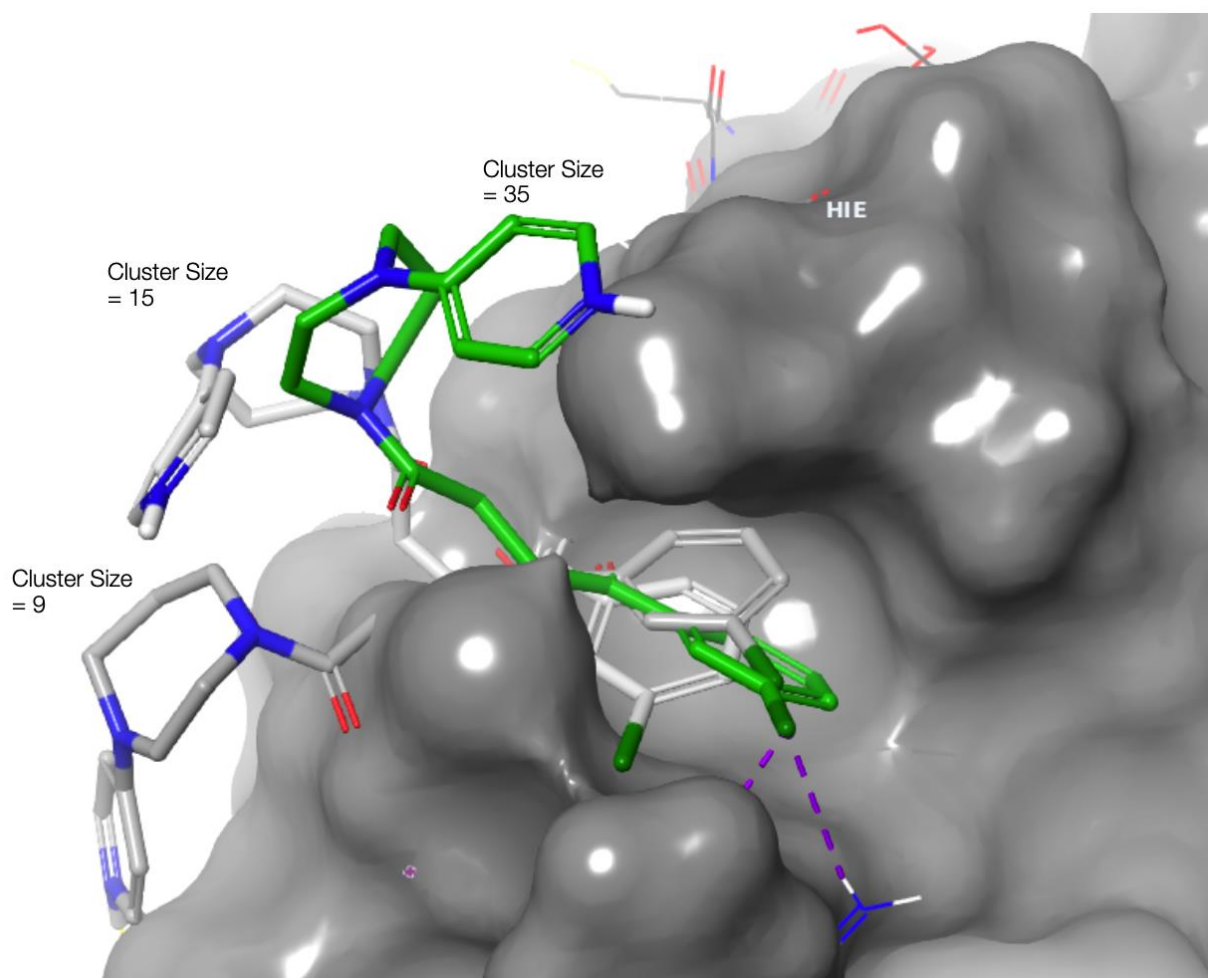


Рисунок 44 – Кластеризация молекулярно-динамической симуляции **28**

RMSD атомных координат белка и **28** показывает, что лиганду не удастся войти в равновесное состояние на протяжении 100 нс. Кроме того, часто колебания RMSD малой молекулы превышают таковые для RNF126. В среднем значения RMSD C_{α} белка и лиганда, полученные в ходе симуляций референсного соединения, и **28** идентичны (рисунок 45).

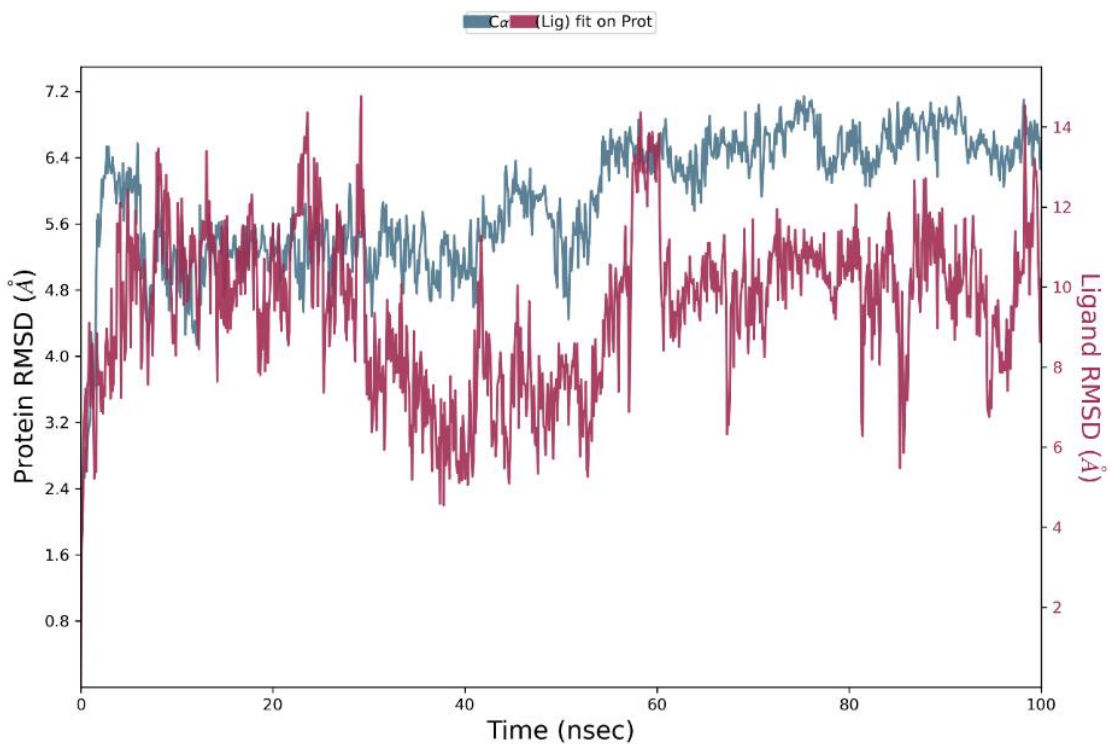


Рисунок 45 – График зависимости RMSD атомов белка (синий) и **28** (красный) от времени симуляции

При рассмотрении конформационного профиля соединения **28** можно заметить, что наиболее подвижными являются м-хлорфенильный и 4-пиридиновый фрагменты, соответственно. Большая часть диэдральных углов обеспечивают торсионный профиль, соответствующий занятию локальных минимумов на кривых потенциальной энергии. Исключение составляют лишь углы 1 и 2 (рисунок 46).

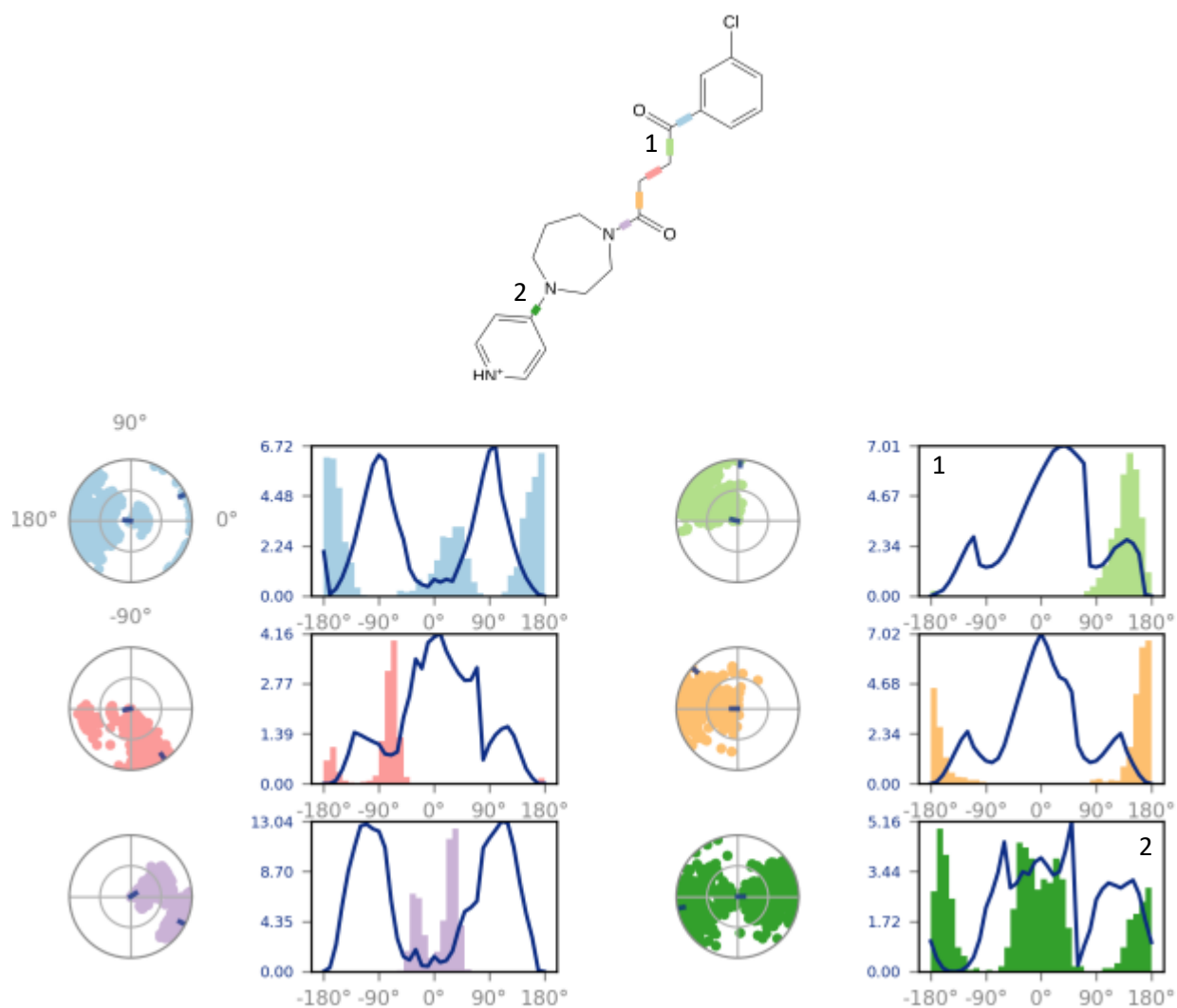


Рисунок 46 – Конформационный профиль **28**

Большую часть времени симуляции соединение **23** демонстрирует следующую динамику – *o*-метоксифенил связывается в небольшой полости на поверхности белка (подобно **28**), а протонированный 4-пиридинил свободно колеблется в области растворителя. (рисунок 47).

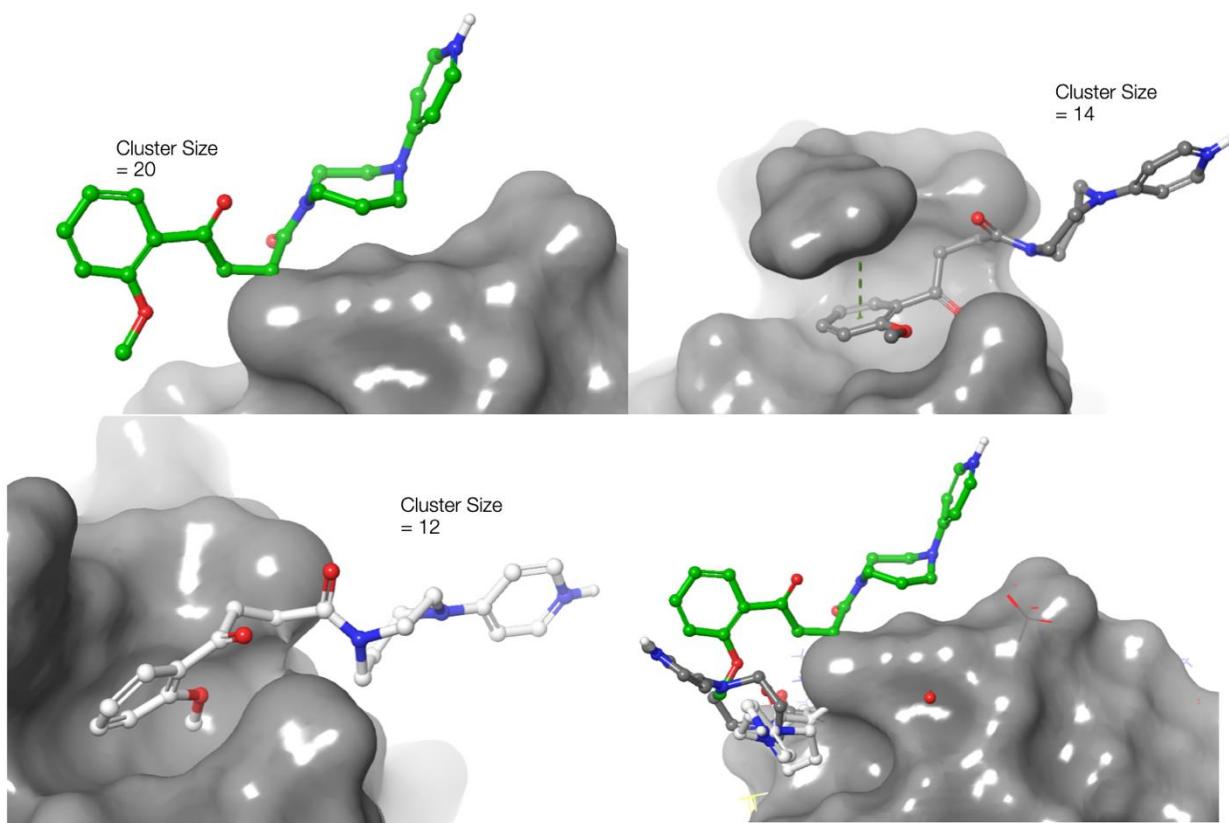


Рисунок 47 – Молекулярная динамика **23**

График зависимости RMSD от времени симуляции показывает, что системе удается стабилизироваться вокруг некоторой средней тепловой структуры. При этом в среднем значения RMSD атомов белка и лиганда ниже, чем таковые для референса (рисунок 48).

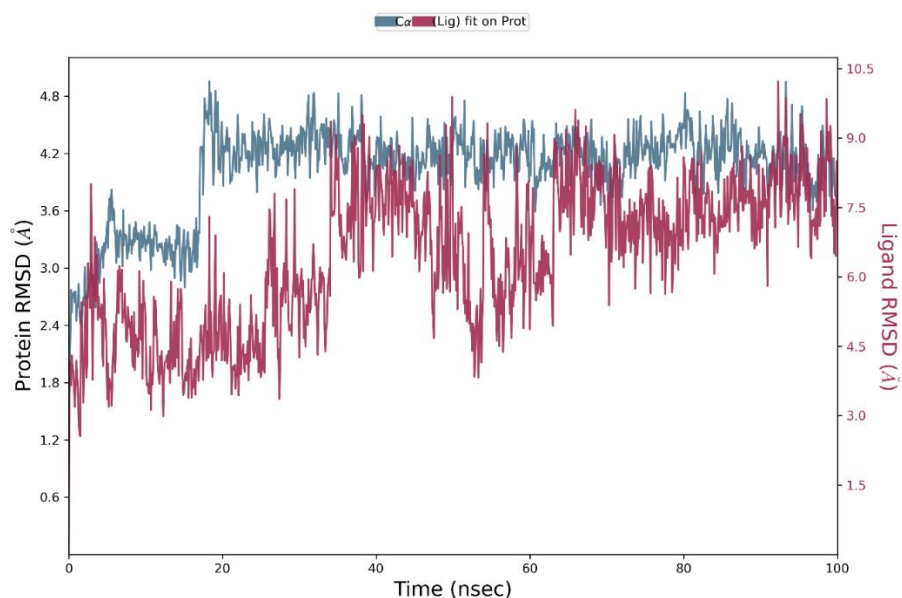


Рисунок 48 – График зависимости RMSD атомов белка (синий) и **23** (красный) от времени симуляции

Конформационный профиль представлен на рисунке ниже. Анализ представленных данных для вращения торсионных углов приводит к тем же выводам, что были сделаны для соединения **28** (рисунок 49).

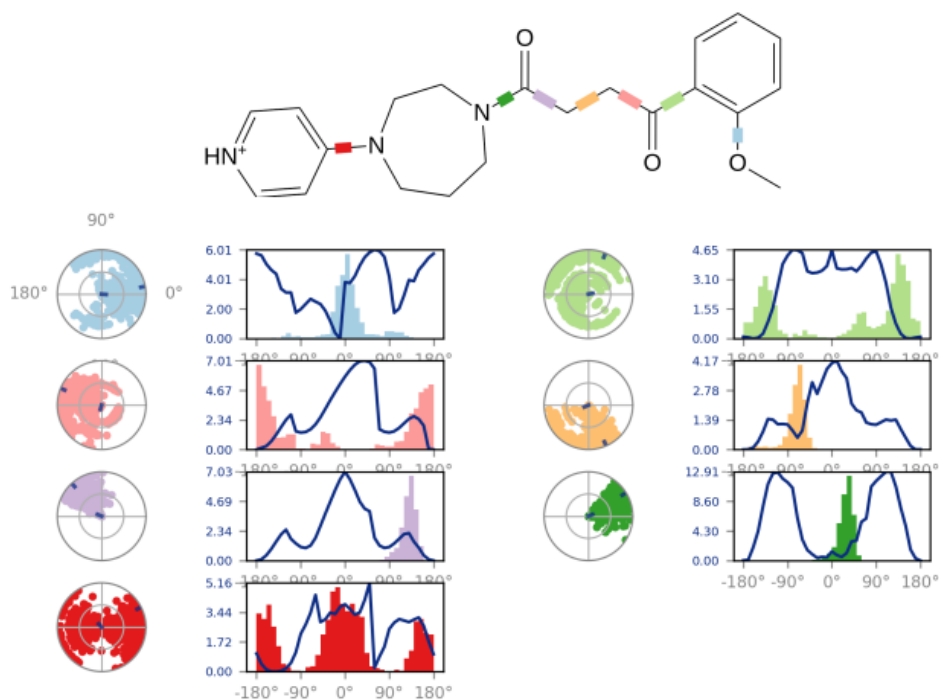


Рисунок 49 – Конформационный профиль **23**

Лиганд **37**, обладающий удовлетворительными значениями скоринга не только по CDock Affinity, но также и по Prime Energy, MM-GBSA ΔG_{Bind} , к сожалению, также не продемонстрировал сходимости в течение 100 нс симуляции, однако средние значения колебаний RMSD по-прежнему остаются ниже таковых для референса (рисунок 50).

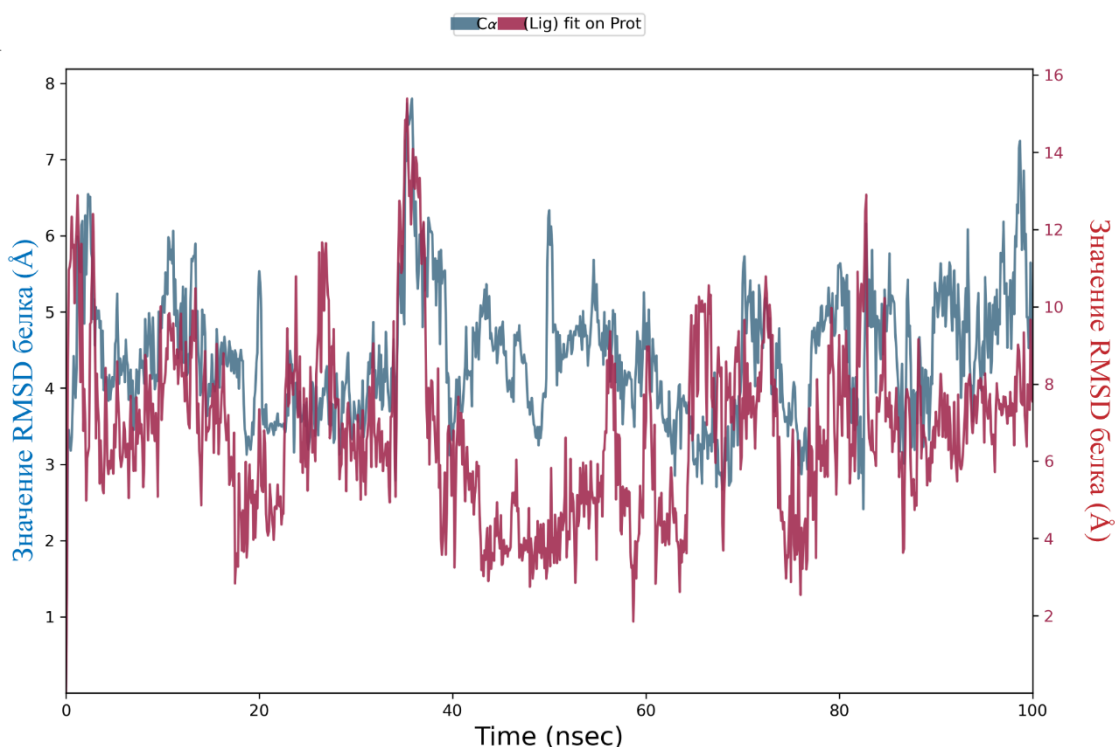


Рисунок 50 – График RMSD белка и конформационный профиль **37**

Полные отчеты по молекулярно-динамической симуляции отобранных соединений представлены в приложении В.

Исходя из анализа результатов симуляции представленных соединений можно сделать следующие выводы:

– наибольший вклад в нековалентную составляющую связывания, видимо, вносит фенильный мотив, укладывающийся в формирующийся в ходе симуляции гидрофобный карман. Вследствие чего, введение относительно неполярных заместителей в этот фрагмент молекулы должно увеличить аффинность;

– гетероциклический фрагмент большую часть времени свободно колеблется в области сольватации, а значит, все же может быть использован для конъюгации остальных мотивов будущих деградеров;

– одно из отобранных соединений-хитов – **23** – помимо того, что обладает хорошим скорингом по результатам ковалентного докинга, демонстрирует образование стабильного комплекса в ходе симуляции, а значит, может быть рекомендовано для дальнейших более точных исследований – например, метадинамики Binding Pose Metadynamic [59].

2.5 PROTAC RNF126-CRBN

В настоящий момент для Центра медицинской химии большой интерес представляет сфера направленного протеолиза белков: разработка и дизайн PROTAC, молекулярных клеев и т. д. Кроме того, реализуется проект, посвященный разработке новых лигандов для такой лигазы, как CRBN. В рамках выполнения данного исследования была предложена концепция интересных молекул — PROTAC CRBN–RNF126 (рисунок 51).

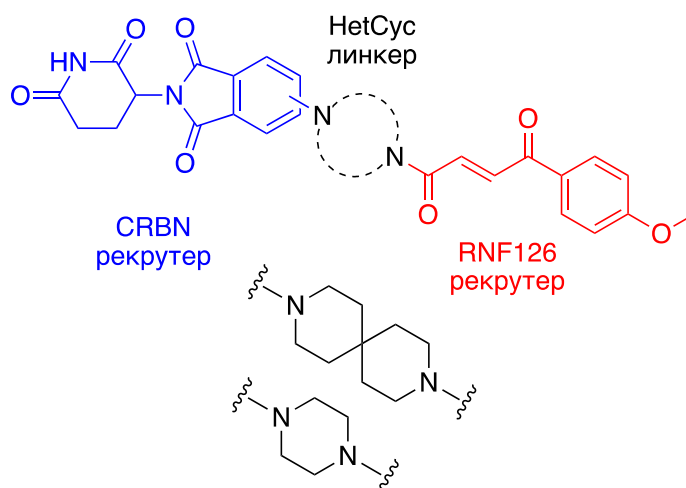


Рисунок 51 – Принципиальное строение деградеров CRBN–RNF126

Как можно увидеть, в качестве лиганда CRBN в таком деградере выступает производное помалидомида, а в качестве рекрутера RNF126 – структура, предложенную Д. Номурой. Линкер включает различные гетероциклические скаффолды – пиперазин или диазоспирундекан.

Согласно нашим ожиданиям, успешное связывание обоих боеголовок со своими мишенями приведет к образованию тройного комплекса CRBN-PROTAC–RNF126. Однако, с учетом того, что оба белка в данном ТК являются E3 лигазами, совершенно не понятно, какая из макромолекул будет в конечном итоге убиквитинилирована и подвергнута деградации.

Разработка таких молекул может представлять интерес для академических исследований – в случае разложения RNF126 полученные PROTAC смогут выступать в роле средств, обеспечивающих химический нокаут данной лигазы в клетках, что также справедливо и для CRBN в противном случае (рисунок 52).

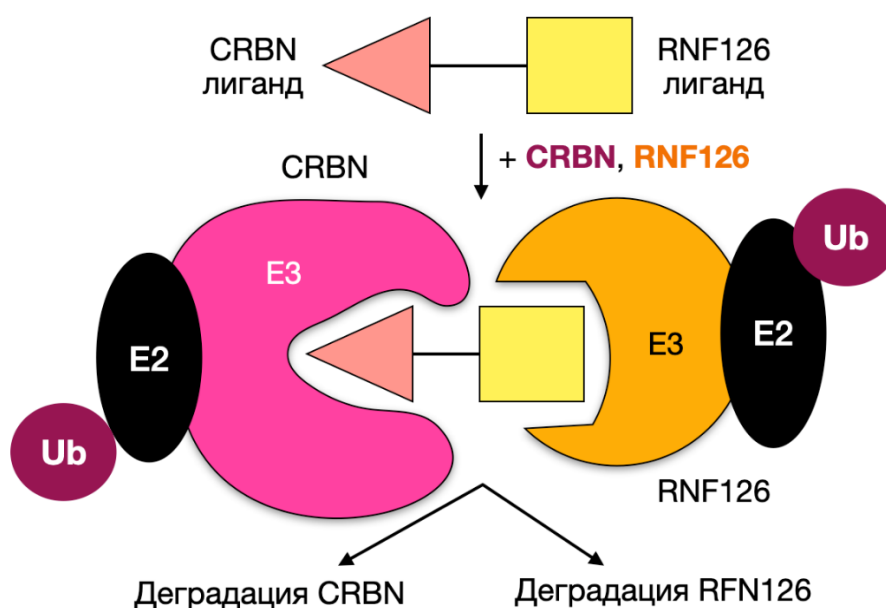


Рисунок 52 – Возможные механизмы действия RNF126–CRBN PROTAC

Мы попытались оценить способы связывания четырех деградеров RNF126–CRBN с RNF126 с помощью ковалентного докинга. Исследуемые PROTACs представлены на рисунке ниже и отличаются типом линкера, а также точкой прикрепления к фталимидному ядру рекрутера cereblona (рисунок 53).

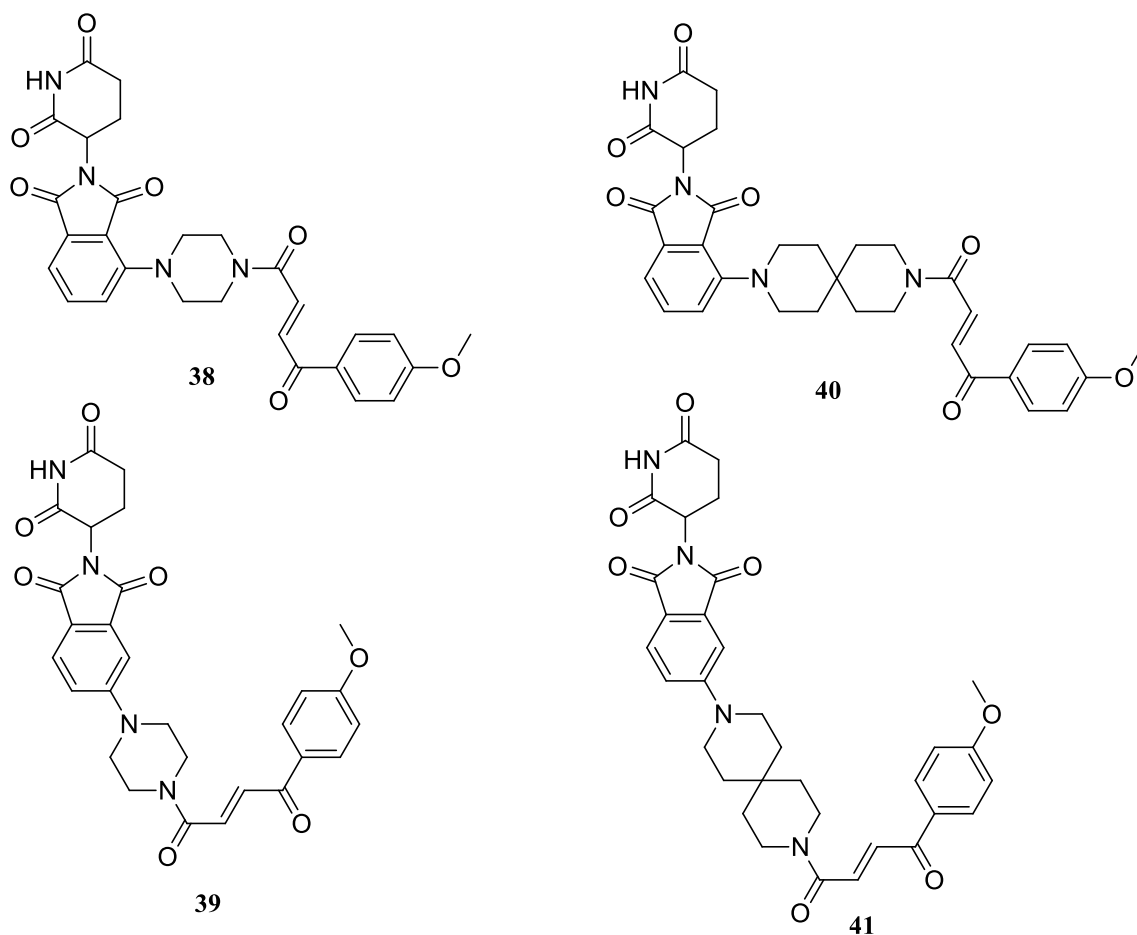
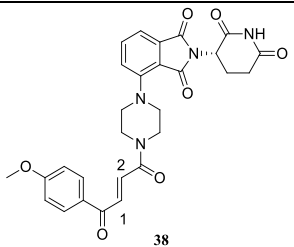
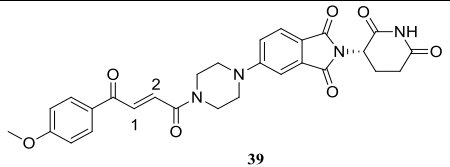
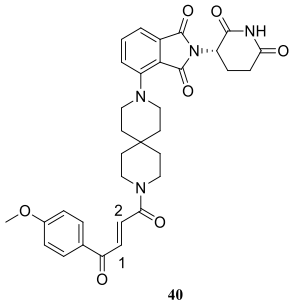
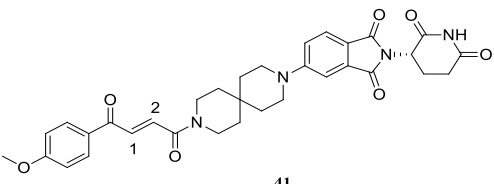


Рисунок 53 – Структуры исследуемых PROTAC RNF126–CRBN

Для каждого из лигандов по-прежнему генерировалось по две позы. Результаты представлены в таблице ниже (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты ковалентного докинга

Структура	Атом	Prime Energy ккал/моль	Δ Prime Energy ккал/моль	MMGBSA ΔG_{Bind} ккал/моль	MMGBSA $\Delta\Delta G_{\text{Bind}}$ ккал/моль	CDock Affinity ккал/моль	Δ CDock Affinity ккал/моль
 38	1	-1312.90	-1317.18	-27.21	-18.86	-1.934	-1.589
	2	-1323.55	-1325.68	-31.11	-29.32	-1.789	-1.101
 39	1	-1317.52	-1324.12	-31.28	-28.12	-1.762	-1.310
	2	-1323.79	-1326.89	-26.48	-24.38	-2.090	-1.709
 40	1	-1321.28	-1323.85	-29.07	-23.19	-2.174	-1.915
	2	-1337.24	-1329.03	-33.91	-22.03	-1.927	-1.692
 41	1	-1331.06	-1331.96	-31.31	-26.78	-2.038	-1.626
	2	-1324.07	-1331.98	-28.88	-23.06	-2.131	-1.474

К сожалению, ни одно соединение не смогло превзойти нативный лиганд по скорингу, однако практически все кроме **39** продемонстрировали лучшие значения энергии минимизированного комплекса Prime Energy и свободной энергии связывания ММ-GBSA ΔG_{Bind} .

Говоря про способы связывания, отметим, что всегда часть молекулы, ответственная за связывание с CRBN, укладывается на поверхность белка и простирается вдоль нее. Лучше всего себя показал PROTAC, имеющий в качестве линкера спироцикл, присоединенный по четвертому положению фталимида (2-региоизомер). Его способ связывания в корне отличается от способа связывания боеголовки Номуры. Глутаримид образует связи с остатками Pro30 и Arg31; с последним также реализуется π -катионное взаимодействие (рисунок 54).

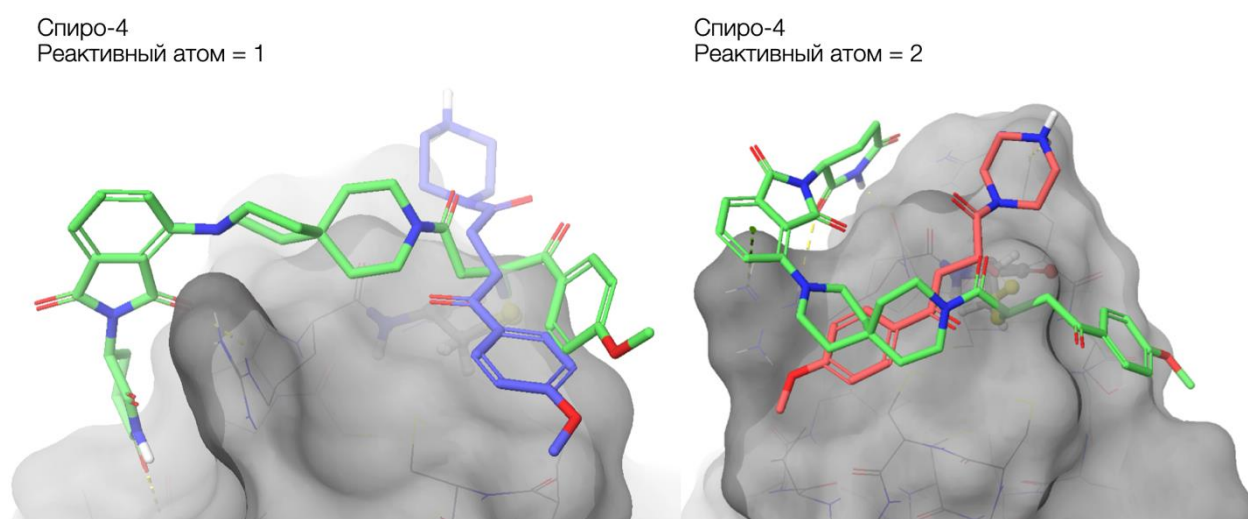


Рисунок 54 – Способы связывания спироциклических PROTACs и нативных боеголовок

Способ связывания производных пиперазина в большей степени схож со способом связывания референсной боеголовки – метокси-фенильные фрагменты ориентированы примерно в одну и ту же область. Соединение **39** в

целом показывает схожую с JP-2-196 укладку, однако является аутсайдером по скорингу (рисунок 55).

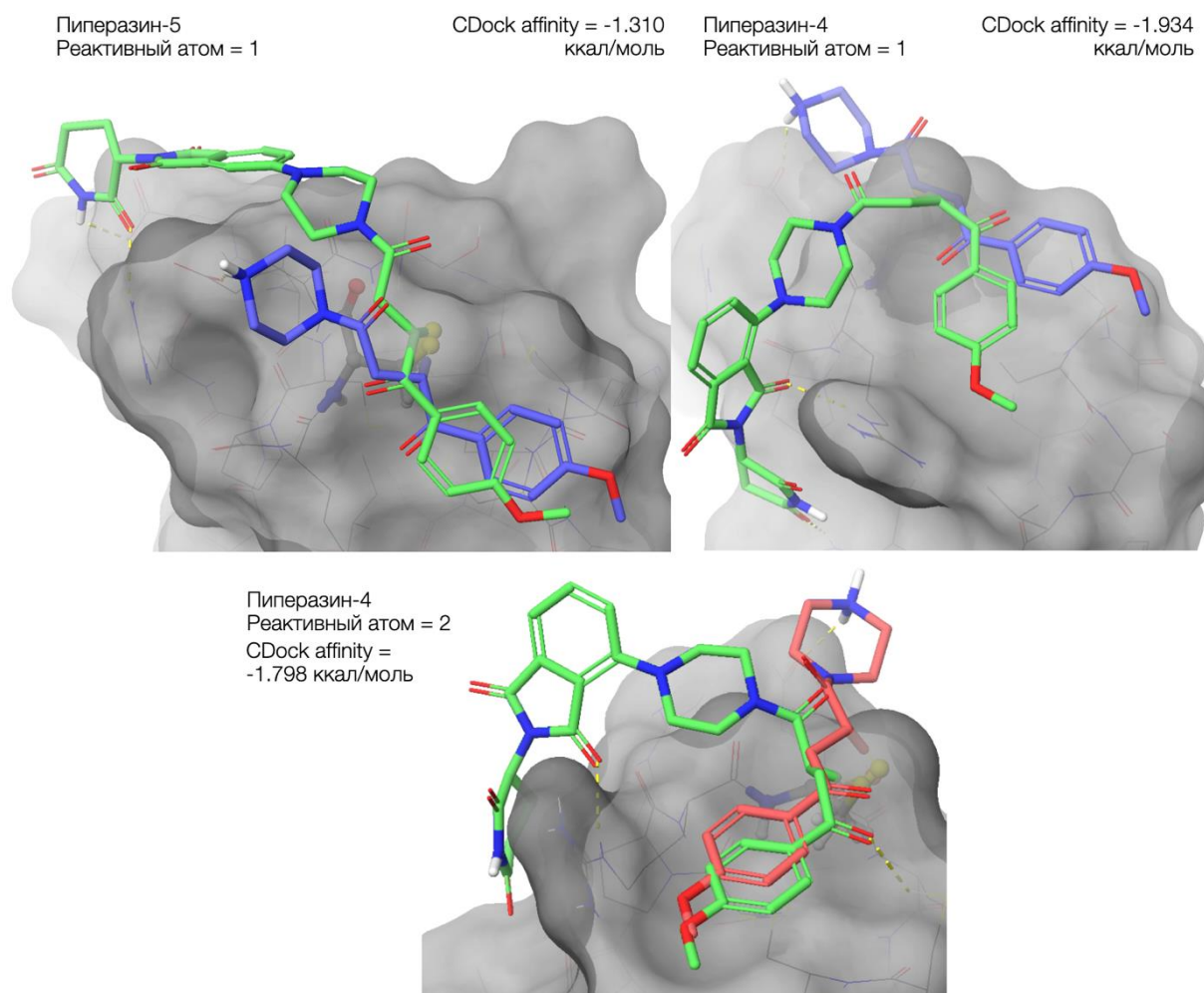


Рисунок 55 – Способы связывания пиперазин-содержащих PROTACs и нативных боеголовок

В целом можно точно утверждать, что исследуемые соединения будут способны связываться с RNF126 за счет образования ковалентной связи. Однако выводы о возможности рекрутирования CRBN в такой комплекс, а также о сопоставимости аффинности связывания относительно референсной боеголовки, сделать на основании только ковалентного докинга весьма затруднительно.

Дополнительно лучшее соединение **40** было подвергнуто молекулярно-динамической симуляции в течение 100 нс. Проанализировав полученную траекторию, можно отметить, что метоксифенильный фрагмент практически всегда находился близ остатка Cys15, как и в случае лиганда Номуры. Мотив, ответственный за рекрутирование CRBN, большую часть времени ориентируется вдоль поверхности RNF (рисунок 56).

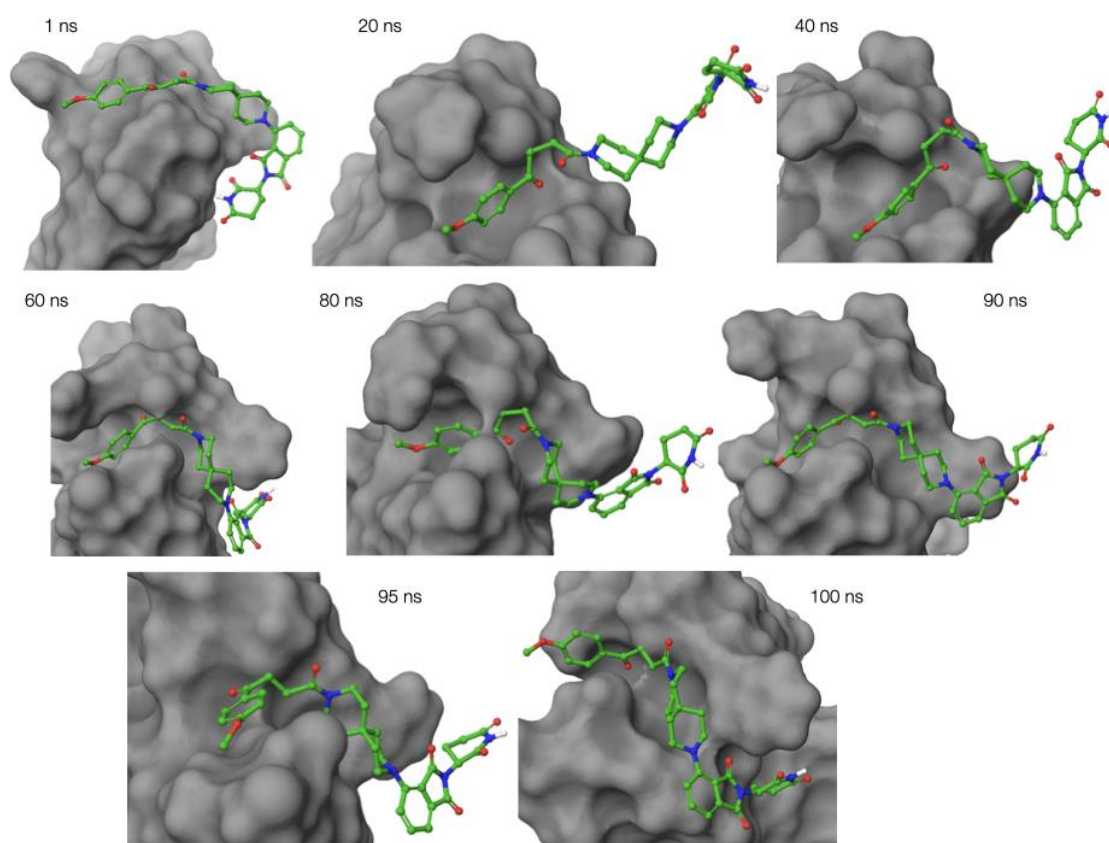
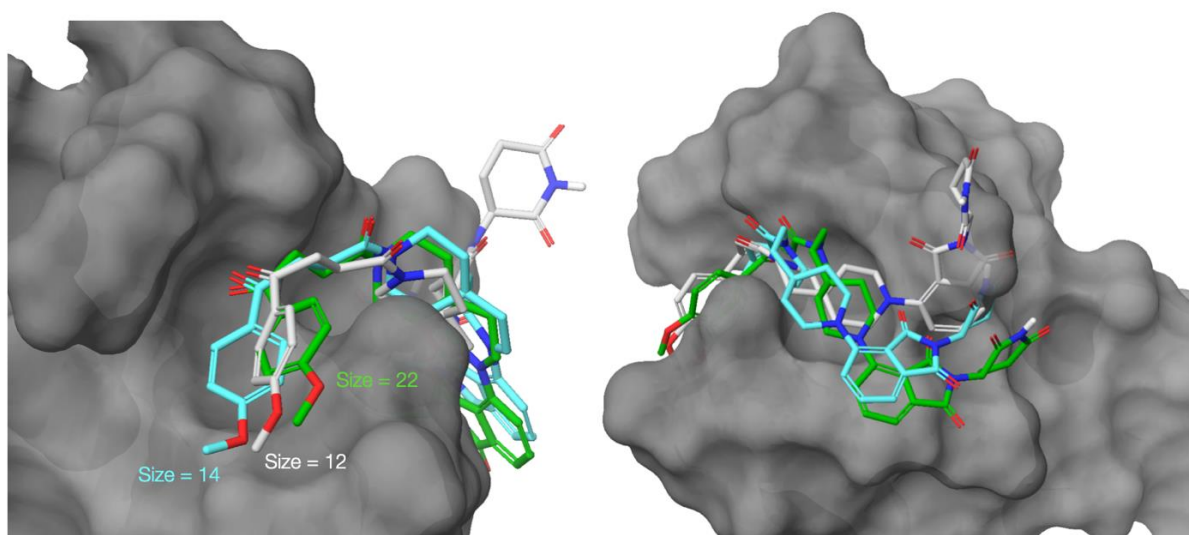


Рисунок 56 – Некоторые кадры, полученные в ходе симуляции **40**

Кластеризация кадров траектории дополнительно подтверждает сказанное выше (рисунок 57).



Зеленый — кластер 1 Голубой — кластер 2 Серый — кластер 3

Рисунок 57— Репрезентативные структуры, полученные после кластеризации кадров траектории

График зависимости RMSD белка и **40** соединения показал комплекс входит в некоторое равновесное состояние начиная с 80 нс. Также важно отметить, что колебания RMSD атомов **40** превышают колебания атомов мишени даже после стабилизации комплекса (рисунок 58).

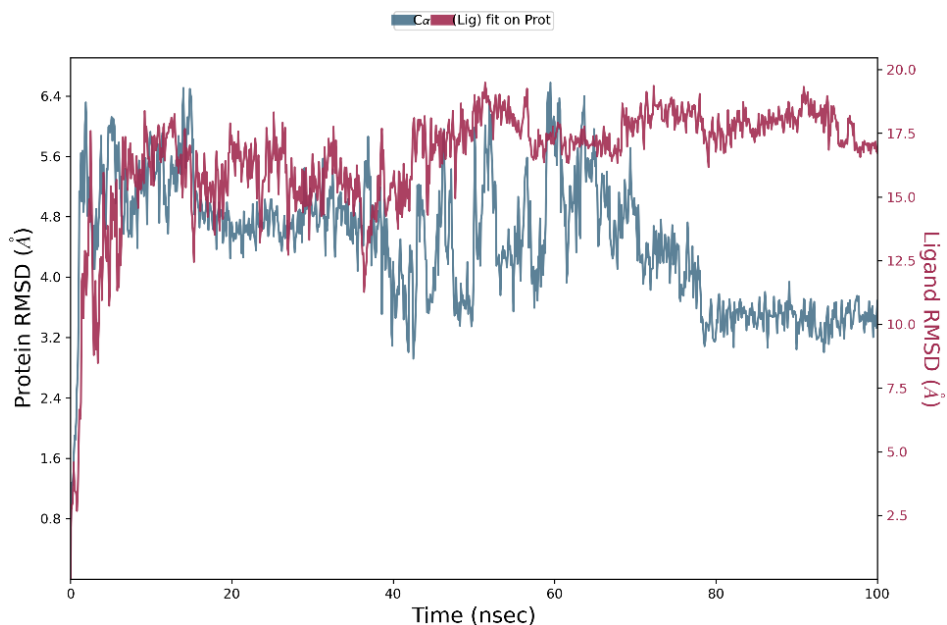


Рисунок 58 — График зависимости RMSD атомов белка и **40**

3 Экспериментальная часть

3.1 Компьютерное моделирование

Подготовку структур белка и лигандов, а также ковалентный докинг проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2022-4 на рабочей станции Mac Pro 2013, снабженной 10 процессорами Intel Xenon E5 (тактовая частота 3.5 ГГц) под управлением ОС Ubuntu 22.04. Симуляции молекулярной динамики осуществляли на рабочей станции, снабженной 64 процессорами AMD Ерус 7513 (тактовая частота 2.6 ГГц) и двумя графическими картами NVIDIA GA102GL (RTX A5000), под управлением ОС Ubuntu 22.04 с помощью все того же пакета Schrodinger.

3.1.1 Подготовка белка

ЯМР структура белка RNF126 (PDB ID: 2N9O) была загружена из Protein Data Bank [61]. Подготовка осуществлялась с помощью модуля ProteinPreparationWorkflow [54]. Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, уточнены порядки связей, состояние протонирования уточнено с использованием алгоритма Epik [61] в диапазоне $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$. Атом Zn, участвующий в координации Cys32, молекулы воды и посторонние гетероатомы удалены. Структура RNF126 была подвергнута дополнительной минимизации с использованием силового поля OPLS4 [62].

3.1.2 Подготовка виртуальной библиотеки

Структуры лигандов были подготовлены с помощью модуля LigPrep [56]; хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования определено с использованием алгоритма Epik [61] в диапазоне $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$. Дополнительно проводился расчет физико-химических свойств с помощью модуля QikProp [57].

3.1.3 Ковалентный докинг

После проведения подготовки все структуры библиотеки, а также известный ковалентный рекрутер JP-2-196 были подвергнуты процедуре ковалентной стыковки с помощью модуля CovalentDocking [34]. В качестве реактивного аминокислотного остатка был выбран Cys32; область стыковки была определена как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с положением Cys. Тип реакции был выбран как «Присоединение по Михаэлю». Стыковка проводилась в режиме точности «Pose Prediction» с дополнительной оценкой свободной энергии связывания методом MM-GBSA [63]. Остальные настройки модуля стыковки были установлены по умолчанию и не изменялись.

3.1.4 Симуляция молекулярной динамики

Молекулярнодинамические симуляции проводились с помощью модуля Desmond [58]. Все исследуемые системы были нейтрализованы добавлением необходимого количества ионов Cl⁻ или Na⁺, дополнительной релаксации комплексов не проводилось. TIP3P [64] была выбрана в качестве модели растворителя, NPT – в качестве канонического ансамбля, а сама симуляция проводилась в течение 60-100 нс с шагом интегрирования в две фс при T=300 К и P=1 атм. Остальные настройки были оставлены по умолчанию и не изменялись. Полученные траектории по завершении расчетов анализировались с помощью модуля Simulation Interaction Diagram.

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

– проведен ковалентный докинг 1-(4-метоксифенил)-4-(пиперазин-1-ил)бут-2-ен-1,4-диона – необратимо связывающегося лиганда RNF126. Обнаружено, что присоединение к реактивному цистеину мишени как по первому (ближний к гетероциклическом фрагменту), так и по второму (ближний к ароматической системе) атомам углерода, формирующим двойную связь в фумаровом фрагменте, дает идентичные позы как по способу связывания, так и по скорингу (CDock Affinity = -1287.82 ккал/моль и MM-GBSA = -21.30 ккал/моль). Молекулярно-динамическая симуляция показала, что 4-метоксифенильный фрагмент относительно неподвижен и связывается в небольшой гидрофобной области на поверхности белка рядом с Cys15, а пиперазиновый мотив свободно колеблется в зоне растворителя. Максимальное RMSD атомов белка составило 6.5 Å, атомов лиганда – 5.4 Å. В качестве направлений для модификации выбрано введение в фенильное кольцо различных заместителей, а также замена гетероциклического скаффолда;

– создана и подготовлена виртуальная комбинаторная библиотека соединений на основе референсного лиганда, содержащая 700 структур, проведен ее ковалентный докинг. Только несколько соединений смогли превзойти нативный лиганд по значению CDock Affinity, однако около сотни структур ранжировались выше референса по значению свободной энергии связывания MM-GBSA ΔG_{bind} . Как правило, в верхних строчках рейтинга можно встретить рекрутеры, содержащие фтор, хлор или метокси-группу в качестве заместителей в фенильном кольце, а также такие гетероциклические мотивы как 1-(пиримидин-5-ил)-1,4-дiazепан, 1-(пиридин-4-ил)-1,4-дiazепан или *N*-(пиперидин-4-ил)пиридин-4-амин. В качестве хитов отобраны три соединения – **23** с *o*-OMe заместителем в фенильном кольце (CDock Affinity = -2.688 ккал/моль, MM-GBSA = -26.71 ккал/моль), **28** с *m*-Cl заместителем

(CDock Affinity = -2.665 ккал/моль, MM-GBSA = -25.47 ккал/моль) и **37** с *o*-SMe радикалом (CDock Affinity = -2.472 ккал/моль, MM-GBSA = -26.71 ккал/моль). Проведена молекулярно-динамическая симуляция идентифицированных лидеров. Только одно из отобранных соединений-хитов – **23** – демонстрирует образование стабильного комплекса в ходе симуляции (RMSD $C\alpha \sim 4.4 \text{ \AA}$) и может быть рекомендовано для дальнейших более точных *in silico* исследований, синтеза и тестирования;

– проведена ковалентная стыковка библиотеки деградеров RNF126-CRNB, включающих в структуру талидомидный остов в роли рекрутера CRBN, и 4-(4-метоксифенил)-4-оксобут-2-еноновый мотив в качестве рекрутера RNF126, соединенные через пиперазиновый или 3,9-дiazоспиро[5.5]ундекановый линкеры. В целом все соединения продемонстрировали лучший скоринг по MM-GBSA ΔG_{Bind} , чем нативный лиганд, но никому по-прежнему не удалось превзойти последний по значениям CDock Affinity (лучшее (**40**) CDock Affinity = -2.174 ккал/моль, худшее (**39**) CDock Affinity = -1.762 ккал/моль). Лидирующими оказалось соединение **40** – производное спироцикла, присоединенного к четвертому положению фталимидного остова. Можно отметить, что вероятнее всего, все соединения будут способны связываться с RNF126, однако сделать вывод об силе этого связывания относительно референса не удалось.

Список используемой литературы и используемых источников

1. Baillie T. A. Targeted covalent inhibitors for drug design // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2016. – V. 55. – №. 43. – P. 13408-13421.
2. Quach D. et al. Strategic design of catalytic lysine-targeting reversible covalent BCR-ABL inhibitors // *Angewandte Chemie*. – 2021. – V. 133. – №. 31. – P. 17268-17274.
3. Martín-Gago P. et al. Covalent protein labeling at glutamic acids // *Cell Chemical Biology*. – 2017. – V. 24. – №. 5. – P. 589-597.
4. Powers J. C. et al. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases // *Chemical Reviews*. – 2002. – V. 102. – №. 12. – P. 4639-4750.
5. Bender A. T. et al. Ability of Bruton's tyrosine kinase inhibitors to sequester Y551 and prevent phosphorylation determines potency for inhibition of Fc receptor but not B-cell receptor signaling // *Molecular Pharmacology*. – 2017. – V. 91. – №. 3. – P. 208-219.
6. Gu C. et al. Chemical proteomics with sulfonyl fluoride probes reveals selective labeling of functional tyrosines in glutathione transferases // *Chemistry & Biology*. – 2013. – V. 20. – №. 4. – P. 541-548.
7. Liu Q. et al. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome // *Chemistry & Biology*. – 2013. – V. 20. – №. 2. – P. 146-159.
8. Ábrányi-Balogh P. et al. A road map for prioritizing warheads for cysteine targeting covalent inhibitors // *EJMECH*. – 2018. – V. 160. – P. 94-107.
9. Adams J., Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade™(Bortezomib) // *Cancer investigation*. – 2004. – V. 22. – №. 2. – P. 304-311.
10. Cameron F., Sanford M. Ibrutinib: first global approval // *Drugs*. – 2014. – V. 74. – P. 263-271.
11. Ward C. C. et al. Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3 ligase recruiter for targeted protein degradation applications // *ACS Chemical Biology*. – 2019. – V. 14. – №. 11. – P. 2430-2440.

12. Shirley M. Dacomitinib: first global approval // *Drugs*. – 2018. – V. 78. – P. 1947-1953.
13. Michael A. On the addition of sodium acetacetic ether and analogous sodium compounds to unsaturated organic ethers // *JACS*. – 1887. – V. 9. – P. 115.
14. Jasim M. H., Rathbone D. L. Reaction profiling of a set of acrylamide-based human tissue transglutaminase inhibitors // *JMGM*. – 2018. – V. 79. – P. 157-165.
15. Singh J. et al. The resurgence of covalent drugs // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2011. – V. 10. – №. 4. – P. 307-317.
16. Roth G. J., Stanford N., Majerus P. W. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin // *PNAS*. – 1975. – V. 72. – №. 8. – P. 3073-3076.
17. Loll P. J., Picot D., Garavito R. M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase // *Nature Structural Biology*. – 1995. – V. 2. – №. 8. – P. 637-643.
18. Baillie T. A. The contributions of Sidney D. Nelson to drug metabolism research // *Drug Metabolism Reviews*. – 2015. – V. 47. – №. 1. – P. 4-11.
19. Yocum R. R., Rasmussen J. R., Strominger J. L. The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase // *JBC*. – 1980. – V. 255. – №. 9. – P. 3977-3986.
20. Lonsdale R., Ward R. A. Structure-based design of targeted covalent inhibitors // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – V. 47. – №. 11. – P. 3816-3830.
21. Singh J. et al. The resurgence of covalent drugs // *Nature reviews Drug discovery*. – 2011. – V. 10. – №. 4. – P. 307-317.
22. Shibata Y., Chiba M. The role of extrahepatic metabolism in the pharmacokinetics of the targeted covalent inhibitors afatinib, ibrutinib, and neratinib // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2015. – V. 43. – №. 3. – P. 375-384.
23. Heal W. P., Dang T. H. T., Tate E. W. Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – V. 40. – №. 1. – P. 246-257.

24. Jessani N. et al. Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness // PNAS. – 2002. – V. 99. – №. 16. – P. 10335-10340.
25. Weerapana E. et al. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes // Nature. – 2010. – V. 468. – №. 7325. – P. 790-795.
26. Backus K. M. et al. Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems // Nature. – 2016. – V. 534. – №. 7608. – P. 570-574.
27. Hacker S. M. et al. Global profiling of lysine reactivity and ligandability in the human proteome // Nature Chemistry. – 2017. – V. 9. – №. 12. – P. 1181-1190.
28. Belcher B. P., Ward C. C., Nomura D. K. Ligandability of E3 ligases for targeted protein degradation applications // Biochemistry. – 2021. – V. 62. – №. 3. – P. 588-600.
29. Ward C. C. et al. Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3 ligase recruiter for targeted protein degradation applications // ACS Chemical Biology. – 2019. – V. 14. – №. 11. – P. 2430-2440.
30. Зефирова О. Н. и др. Глоссарий русскоязычных терминов в медицинской химии // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019. – V. 12. – P. 2381-2395.
31. Chaskar P., Zoete V., Röhrig U. F. Toward on-the-fly quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) docking: development and benchmark of a scoring function // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2014. – V. 54. – №. 11. – P. 3137-3152.
32. Morris G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // Journal of Computational Chemistry. – 2009. – V. 30. – №. 16. – P. 2785-2791.
33. Ouyang X. et al. CovalentDock: automated covalent docking with parameterized covalent linkage energy estimation and molecular geometry constraints // Journal of Computational Chemistry. – 2013. – V. 34. – №. 4. – P. 326-336.

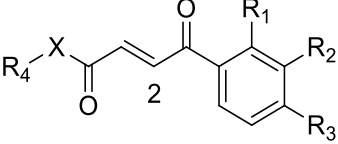
34. Zhu K. et al. Docking covalent inhibitors: a parameter free approach to pose prediction and scoring // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2014. – V. 54. – №. 7. – P. 1932-1940.
35. Zou Y., Ma D., Wang Y. The PROTAC technology in drug development // *Cell Biochemistry and Function*. – 2019. – V. 37. – №. 1. – P. 21-30.
36. Kleiger G., Mayor T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin–proteasome system // *Trends in cell biology*. – 2014. – V. 24. – №. 6. – P. 352-359.
37. Troup R. I., Fallan C., Baud M. G. J. Current strategies for the design of PROTAC linkers: a critical review // *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*. – 2020. – V. 1. – №. 5. – P. 273.
38. Diehl C. J., Ciulli A. Discovery of small molecule ligands for the von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligase and their use as inhibitors and PROTAC degraders // *Chemical Society Reviews*. – 2022. – V. 51. – №. 19. – P. 8216-8257.
39. Wang C. et al. Developments of CRBN-based PROTACs as potential therapeutic agents // *EJMC*. – 2021. – V. 225. – P. 113749.
40. Hines J. et al. MDM2-recruiting PROTAC offers superior, synergistic antiproliferative activity via simultaneous degradation of BRD4 and stabilization of p53 // *Cancer Research*. – 2019. – V. 79. – №. 1. – P. 251-262.
41. Franks M. E., Macpherson G. R., Figg W. D. Thalidomide // *The Lancet*. – 2004. – V. 363. – №. 9423. – P. 1802-1811.
42. Testa A. et al. 3-Fluoro-4-hydroxyprolines: synthesis, conformational analysis, and stereoselective recognition by the VHL E3 ubiquitin ligase for targeted protein degradation // *JACS*. – 2018. – V. 140. – №. 29. – P. 9299-9313.
43. Toriki E. S. et al. Rational chemical design of molecular glue degraders // *ACS Central Science*. – 2023. – V. 9. – №. 5. – P. 915-926.
44. Zhang R. et al. Roles of RNF126 and BCA2 E3 ubiquitin ligases in DNA damage repair signaling and targeted cancer therapy // *Pharmacological Research*. – 2020. – V. 155. – P. 104748.
45. Kryzstofinska E. M. et al. Structural and functional insights into the E3 ligase, RNF126 // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 26433.

46. Carrassa L., Damia G. DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy // *Cancer Treatment Reviews*. – 2017. – V. 60. – P. 139-151.
47. Delker R. K. et al. Solubility-based genetic screen identifies RING finger protein 126 as an E3 ligase for activation-induced cytidine deaminase // *PNAS*. – 2013. – V. 110. – №. 3. – P. 1029-1034.
48. Zhi X. et al. E3 ubiquitin ligase RNF126 promotes cancer cell proliferation by targeting the tumor suppressor p21 for ubiquitin-mediated degradation // *Cancer Research*. – 2013. – V. 73. – №. 1. – P. 385-394.
49. Wang L. et al. E3 Ubiquitin ligase RNF126 regulates the progression of tongue cancer // *Cancer Medicine*. – 2016. – V. 5. – №. 8. – P. 2043-2047.
50. Carrassa L., Damia G. DNA damage response inhibitors: Mechanisms and potential applications in cancer therapy // *Cancer Treatment Reviews*. – 2017. – V. 60. – P. 139-151.
51. Binici J., Koch J. BAG-6, a jack of all trades in health and disease // *CMLS*. – 2014. – V. 71. – P. 1829-1837.
52. Rodrigo-Brenni M. C., Gutierrez E., Hegde R. S. Cytosolic quality control of mislocalized proteins requires RNF126 recruitment to Bag6 // *Molecular Cell*. – 2014. – V. 55. – №. 2. – P. 227-237.
53. Mi D. et al. Current advances of small molecule E3 ligands for proteolysis-targeting chimeras design // *EJMC*. – 2023. – P. 115444.
54. Protein Preparation Guide Schrodinger Suite 2012 Update 2, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
55. Prime Schrödinger Release 2023-4: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.
56. LigPrep 3.4 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
57. QikProp 4.4 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.

58. Desmond 4.2 User Manual, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. – P. 166.
59. Fusani L. Exploring ligand stability in protein crystal structures using binding pose metadynamics / L. Fusani, D. S. Palmer, D. O. Somers et al. // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2020. – Vol. 60, № 3. – P. 1528-1539.
60. RCSB Protein Data Bank (PDB). URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения: 13.03.2024)
61. Epik 3.2 User Manual, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. –P. 64.
62. PLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space / C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi et al. // *J. Chem. Theory Comput.* – 2021. – Vol. 17, № 7. – P. 4291-4300.
63. Feig M. Implicit solvation based on generalized Born theory in different dielectric environments / M. Feig, W. Im, C. L. Brooks et al. // *J. Chem. Phys.* – 2004. – Vol. 120, № 2. – P. 903-911.
64. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins / A. D. MacKerell, Jr., D. Bashford, M. Bellott et al. // *J. Phys. Chem. B.* – 1998. – Vol. 102, № 18. – P. 3586-3616.

Приложение А
Тепловая карта для 2 положения

Таблица А.1 – Значение CDock Affinity для 2 замещенных скаффолдов

																										
X – Диазепин																										
R ₄	R ₁								R ₂								R ₃								H	
	Br	CF ₃	Cl	F	Me	OCF ₃	OMe	SMe	Br	CF ₃	Cl	F	Me	OCF ₃	OMe	SMe	Br	CF ₃	Cl	F	Me	OCF ₃	OMe	SMe		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
2-Py	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	
2-Pyr	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	
3-Py	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	
4-Py	Orange	Yellow	Red	Orange	Orange	Orange	Red	Yellow	Orange	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	
4-Pyr	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Green	Orange	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Green	Green	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	
5-Pyr	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Yellow	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Green	Yellow	
Ph	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	
X – Пиперидин-NH																										
2-Py	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	
2-Pyr	Orange	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	
3-Py	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	
4-Py	Yellow	Orange	Red	Orange	Yellow	Yellow	Red	Orange	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	
4-Pyr	Orange	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	
5-Pyr	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	

Продолжение Приложения А

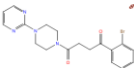
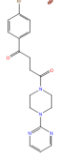
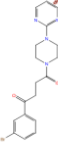
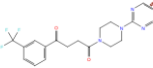
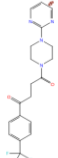
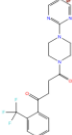
Продолжение таблицы А.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Ph																										
X – Пиперидин																										
2-Py																										
2-Pyr																										
3-Py																										
4-Py																										
4-Pyr																										
5-Pyr																										
Ph																										
X – Пиперазин																										
2-Py																										
2-Pyr																										
3-Py																										
4-Py																										
4-Pyr																										
5-Pyr																										
Ph																										

Приложение Б

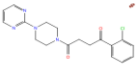
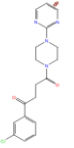
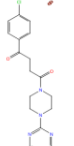
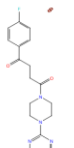
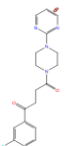
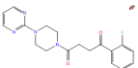
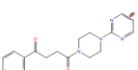
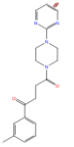
Результаты стыковки сгенерированной библиотеки

Таблица Б.1 – Результаты стыковки сгенерированной библиотеки

Структура	Реактивный атом лиганда					
	1			2		
	Prime Energy ккал/моль	MMGBSA ΔG_{Bind} ккал/моль	CDock Affinity ккал/моль	Prime Energy ккал/моль	MMGBSA ΔG_{Bind} ккал/моль	CDock Affinity ккал/моль
1	2	3	4	5	6	7
	-1253.01	-20.66	-1.557	-1250.06	-17.33	-2.234
	-1249.37	-20.08	-1.064	-1244.43	-19.30	-1.640
	-1246.17	-24.75	-0.808	-1245.49	-23.98	-1.685
	-1234.63	-17.47	-1.374	-1241.73	-21.00	-1.060
	-1235.23	-24.32	-1.128	-1232.67	-21.46	-1.258
	-1238.57	-15.65	-0.579	-1243.58	-20.77	-1.120

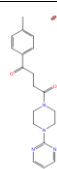
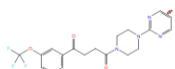
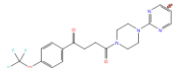
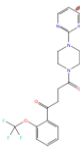
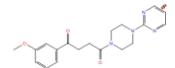
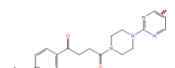
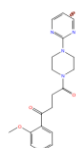
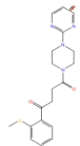
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1253.25	-26.18	-1.630	-1250.88	-26.17	-1.728
	-1251.96	-15.54	-1.555	-1250.35	-22.19	-1.738
	-1248.86	-18.16	-1.004	-1248.90	-24.68	-2.056
	-1252.55	-24.83	-1.771	-1247.47	-24.68	-1.853
	-1251.02	-15.61	-1.306	-1249.29	-21.44	-2.002
	-1253.88	-25.59	-1.166	-1247.06	-14.24	-2.105
	-1249.96	-24.42	-0.694	-1241.96	-11.46	-0.840
	-1258.51	-21.54	-2.229	-1258.83	-22.34	-1.079

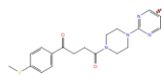
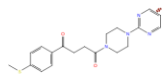
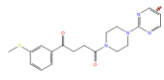
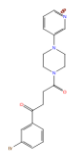
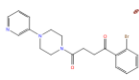
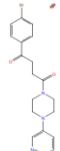
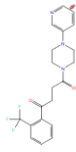
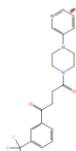
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1255.36	-14.63	-1.099	-1251.82	-20.83	-1.645
	-1263.20	-30.44	-1.729	-1255.99	-21.67	-2.015
	-1255.71	-23.32	-1.092	-1260.29	-20.28	-1.358
	-1256.21	-15.71	-0.416	-1256.90	-20.08	-1.333
	-1252.49	-29.30	-2.474	-1252.93	-29.41	-2.188
	-1251.07	-23.85	-2.016	-1250.35	-26.64	-2.018
	-1245.59	-11.68	-1.005	-1254.61	-20.68	-1.201
	-1247.38	-20.60	-1.468	-1249.90	-17.72	-1.516

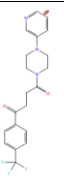
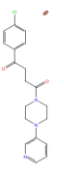
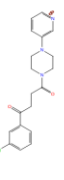
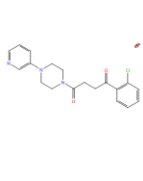
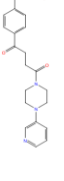
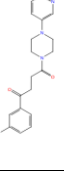
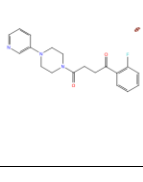
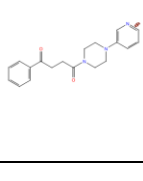
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1257.74	-25.79	-0.883	-1252.74	-26.02	-1.949
	-1257.74	-25.79	-0.883	-1252.74	-26.02	-1.949
	-1259.95	-25.92	-0.385	-1252.90	-21.67	-1.333
	-1255.18	-24.98	-1.475	-1251.46	-19.92	-1.292
	-1253.74	-12.70	-1.239	-1249.61	-23.31	-1.522
	-1252.94	-16.07	-1.228	-1244.80	-24.83	-1.323
	-1237.36	-22.06	-1.459	-1238.91	-22.30	-1.116
	-1240.20	-24.09	-1.190	-1232.84	-29.84	-1.799

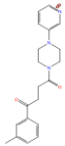
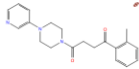
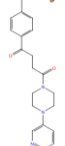
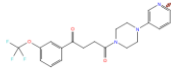
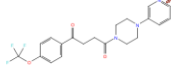
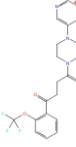
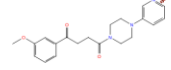
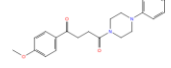
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1233.94	-22.12	-0.843	-1230.63	-23.57	-1.615
	-1254.03	-16.17	-1.897	-1245.35	-25.40	-1.519
	-1256.19	-26.07	-1.599	-1253.80	-20.67	-1.459
	-1252.81	-15.42	-1.573	-1249.42	-25.48	-1.131
	-1247.95	-14.14	-1.657	-1239.87	-20.80	-0.648
	-1254.79	-22.21	-1.530	-1244.71	-33.27	-2.083
	-1252.64	-24.06	-1.338	-1247.15	-17.27	-1.117
	-1250.33	-23.24	-1.324	-1240.13	-25.30	-1.885

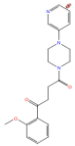
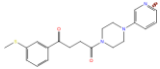
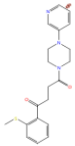
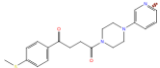
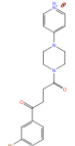
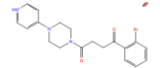
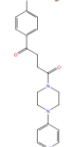
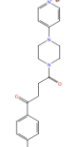
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1257.85	-25.87	-1.399	-1248.06	-22.46	-1.242
	-1247.24	-26.66	-1.257	-1241.51	-14.29	-1.034
	-1251.74	-22.75	-1.108	-1250.56	-22.80	-0.860
	-1258.54	-12.80	-1.420	-1253.41	-22.44	-1.125
	-1260.44	-22.29	-1.416	-1250.93	-17.87	-1.305
	-1258.61	-14.16	-1.310	-1251.85	-19.45	-1.222
	-1257.20	-17.86	-1.620	-1248.00	-22.34	-1.621
	-1253.12	-25.88	-1.562	-1248.89	-28.53	-1.684

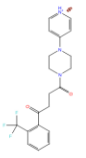
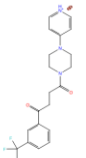
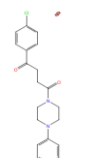
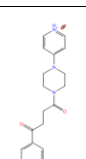
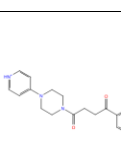
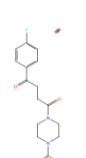
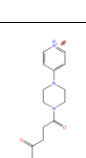
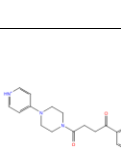
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1248.88	-13.81	-1.354	-1255.53	-21.41	-1.631
	-1251.66	-28.88	-1.629	-1254.42	-24.06	-1.610
	-1254.13	-14.22	-1.407	-1249.64	-28.21	-1.651
	-1255.48	-26.65	-1.357	-1246.70	-25.02	-1.214
	-1265.58	-14.69	-1.790	-1254.60	-25.08	-1.372
	-1265.50	-25.08	-1.364	-1259.90	-21.79	-1.243
	-1263.86	-26.41	-1.111	-1254.54	-25.26	-1.137
	-1251.13	-13.63	-1.270	-1244.99	-20.51	-1.556

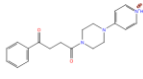
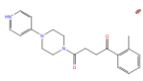
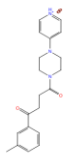
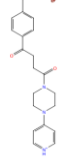
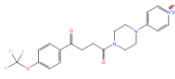
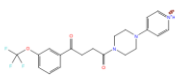
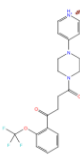
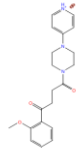
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1252.74	-18.62	-1.078	-1246.98	-23.33	-1.028
	-1251.64	-13.30	-0.953	-1246.49	-18.91	-1.665
	-1264.99	-27.09	-1.305	-1255.81	-22.52	-2.040
	-1264.15	-27.79	-1.297	-1255.48	-25.60	-1.559
	-1266.87	-24.99	-1.242	-1260.72	-24.33	-1.298
	-1264.60	-25.10	-1.335	-1254.21	-21.57	-2.065
	-1263.97	-26.06	-1.333	-1255.99	-23.57	-1.395
	-1260.73	-11.27	-1.111	-1256.97	-16.09	-2.154

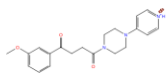
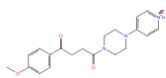
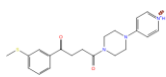
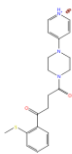
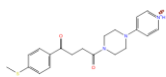
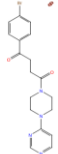
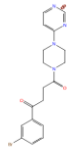
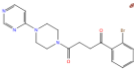
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1259.54	-24.86	-1.391	-1251.58	-21.92	-2.562
	-1256.90	-24.64	-1.656	-1257.02	-26.54	-1.331
	-1265.51	-28.51	-1.053	-1262.17	-23.30	-2.208
	-1268.76	-27.07	-0.854	-1264.54	-25.87	-1.780
	-1266.79	-23.77	-1.213	-1262.31	-24.10	-0.943
	-1268.41	-24.59	-0.953	-1264.12	-23.99	-0.870
	-1262.74	-19.00	-0.902	-1263.95	-24.47	-1.424
	-1262.41	-21.14	-1.739	-1257.56	-26.63	-1.450

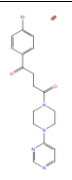
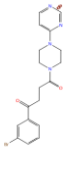
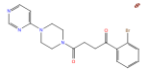
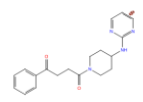
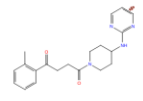
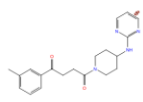
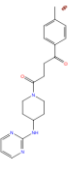
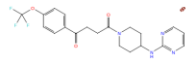
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1261.94	-25.87	-1.728	-1255.00	-26.84	-1.348
	-1265.12	-26.07	-0.901	-1255.74	-24.07	-2.438
	-1262.70	-21.80	-1.650	-1254.26	-25.81	-1.278
	-1261.62	-15.32	-1.250	-1258.85	-28.62	1.206
	-1255.89	-17.60	-1.007	-1263.14	-27.68	-1.076
	-1256.97	-12.86	-1.555	-1251.20	-21.25	-1.488
	-1260.46	-23.80	-1.281	-1256.02	-19.43	-1.018
	-1262.18	-19.65	-0.844	-1256.36	-18.44	-1.917

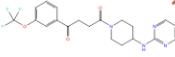
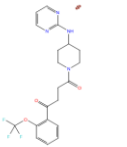
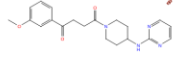
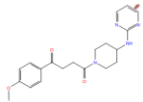
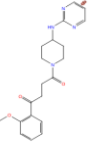
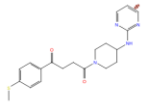
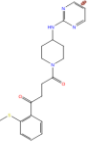
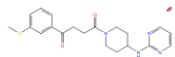
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1256.97	-12.86	-1.555	-1251.20	-21.25	-1.488
	-1260.46	-23.80	-1.281	-1256.02	-19.43	-1.018
	-1262.18	-19.65	-0.844	-1256.36	-18.44	-1.917
	-1294.45	-18.34	-1.798	-1293.35	-21.58	-1.909
	-1294.98	-25.68	-1.789	-1296.70	-21.21	-1.802
	-1302.37	-26.87	-1.600	-1300.09	-21.82	-0.402
	-1303.64	-20.15	-1.525	-1299.66	-16.36	-1.105
	-1308.10	-22.59	-1.660	-1302.84	-23.24	-1.572

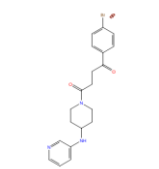
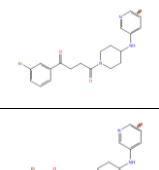
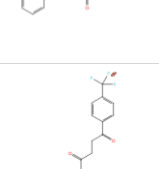
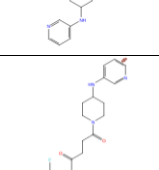
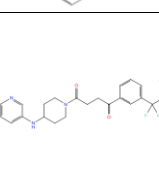
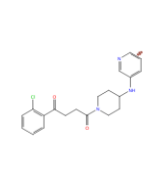
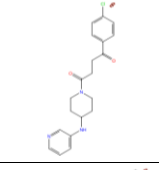
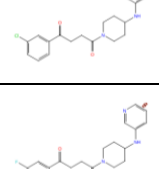


Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1310.68	-25.19	-1.383	-1305.47	-23.29	-1.633
	-1306.54	-15.54	-1.317	-1303.88	-34.12	-2.010
	-1304.66	-22.44	-2.059	-1298.78	-22.88	-1.845
	-1302.73	-27.32	-1.906	-1297.62	-16.22	-1.923
	-1299.70	-27.44	-1.884	-1300.25	-27.22	-1.934
	-1303.61	-24.77	-1.712	-1300.43	-25.01	-1.742
	-1304.23	-27.93	-1.661	-1304.43	-26.89	-2.118
	-1301.39	-23.52	-1.629	-1302.65	-24.37	-1.675

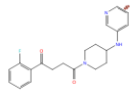
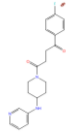
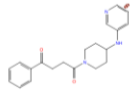
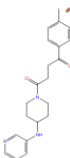
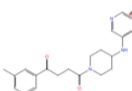
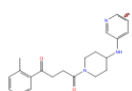
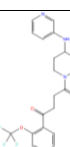
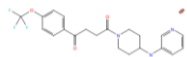
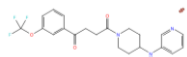
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1294.19	-26.92	-1.396	-1291.71	-19.69	-1.465
	-1295.78	-27.39	-1.175	-1292.55	-27.08	-1.387
	-1295.65	-24.78	-0.964	-1293.06	-20.05	-1.653
	-1279.55	-18.94	-1.497	-1276.69	-18.13	-0.799
	-1286.09	-25.21	-1.483	-1281.49	-18.85	-1.336
	-1284.82	-26.26	-1.303	-1281.78	-21.31	-1.238
	-1297.53	-20.49	-1.702	-1294.91	-26.67	-1.636
	-1295.31	-25.89	-1.570	-1291.94	-27.63	-1.546
	-1295.88	-27.86	-1.495	-1294.60	-17.61	-1.277
	-1296.02	-27.52	-1.637	-1293.08	-26.53	-1.431

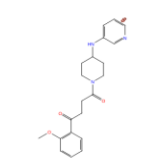
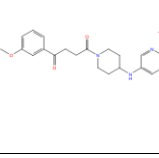
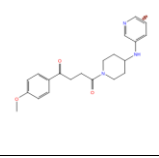
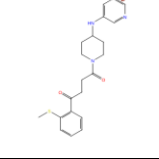
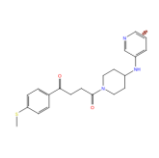
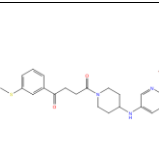
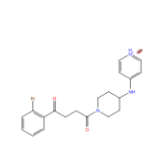
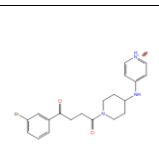
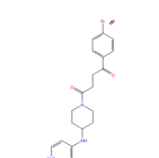
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1294.50	-27.20	-1.460	-1293.19	-23.65	-1.271
	-1297.43	-18.29	-1.025	-1291.44	-27.22	-1.466
	-1289.26	-20.34	-1.775	-1287.65	-20.21	-1.259
	-1298.45	-22.31	-1.556	-1296.26	-22.54	-1.396
	-1295.41	-26.00	-1.463	-1293.16	-24.24	-0.951
	-1291.36	-28.59	-1.166	-1284.27	-25.63	-1.372
	-1307.37	-24.85	-1.458	-1297.24	-22.94	-0.838
	-1305.03	-29.51	-1.360	-1297.50	-27.77	-1.455
	-1299.04	-21.44	-1.280	-1299.95	-24.48	-1.330

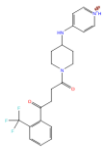
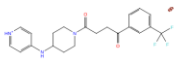
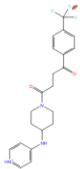
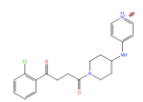
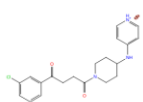
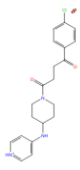
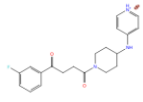
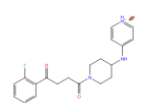
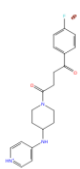
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1294.26	-29.86	-1.786	-1292.81	-27.31	-1.792
	-1296.03	-24.27	-1.688	-1290.03	-29.51	-1.739
	-1298.12	-27.22	-1.623	-1291.08	-27.88	-1.543
	-1302.78	-30.56	-1.827	-1294.62	-32.71	1.792
	-1295.69	-28.32	-1.502	-1293.15	-26.50	-1.584
	-1295.71	-23.80	-1.347	-1294.17	-28.46	-1.438
	-1318.69	-22.27	-2.226	-1314.56	-21.24	-1.299
	-1315.98	-23.30	-1.699	-1311.73	-23.77	-1.902
	-1314.65	-21.32	-1.484	-1309.20	-14.90	-1.702

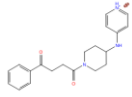
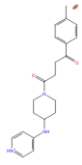
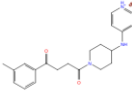
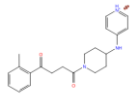
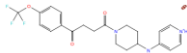
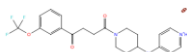
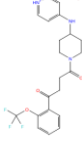
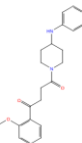
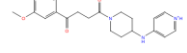
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1303.78	-20.60	-2.094	-1303.67	-19.04	-1.844
	-1302.38	-23.14	-1.709	-1296.45	-20.16	-1.533
	-1296.13	-20.24	-1.306	-1299.43	-22.59	-1.234
	-1319.89	-21.81	-2.400	-1317.33	-25.42	-2.172
	-1320.74	-26.55	-1.771	-1314.91	-23.39	-1.512
	-1316.73	-23.48	-1.736	-1313.09	-23.36	-1.539
	-1315.84	-22.45	-1.917	-1314.10	-21.46	-1.504
	-1317.26	-26.39	-1.647	-1311.56	-20.99	-1.942
	-1315.04	-26.46	-1.641	-1312.17	-21.98	-1.434

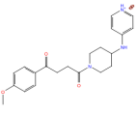
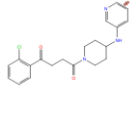
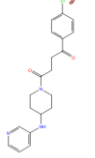
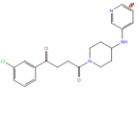
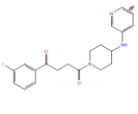
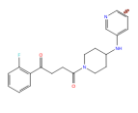
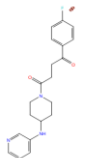
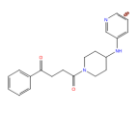
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1311.73	-26.35	-1.551	-1309.65	-21.48	-1.468
	-1319.33	-22.90	-1.515	-1314.33	-18.19	-1.753
	-1318.42	-23.82	-1.386	-1313.09	-20.65	-1.870
	-1313.52	-22.62	-0.920	-1303.88	-20.90	-1.399
	-1322.07	-25.37	-1.793	-1316.83	-27.18	-1.323
	-1322.11	-17.77	-1.764	-1320.90	-24.91	-1.553
	-1322.88	-20.95	-1.571	-1318.79	-17.85	-1.136
	-1319.81	-31.26	-2.069	-1314.24	-25.85	-2.181
	-1316.48	-24.53	-1.752	-1312.55	-22.22	-2.428

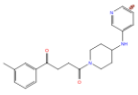
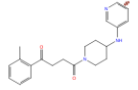
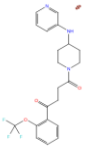
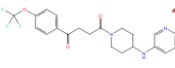
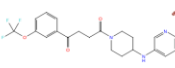
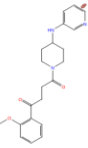
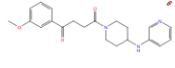
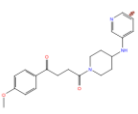
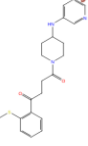
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1316.50	-22.62	-1.648	-1311.29	-24.87	-1.821
	-1297.53	-20.49	-1.702	-1294.91	-26.67	-1.636
	-1295.31	-25.89	-1.570	-1291.94	-27.63	-1.546
	-1295.88	-27.86	-1.495	-1294.60	-17.61	-1.277
	-1296.02	-27.52	-1.637	-1293.08	-26.53	-1.431
	-1294.50	-27.20	-1.460	-1293.19	-23.65	-1.271
	-1297.43	-18.29	-1.025	-1291.44	-27.22	-1.466
	-1289.26	-20.34	-1.775	-1287.65	-20.21	-1.259

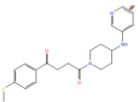
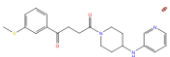
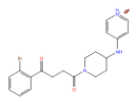
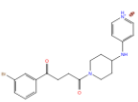
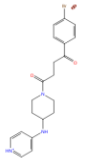
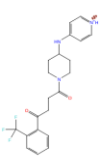
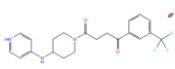
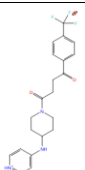
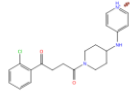
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1295.41	-26.00	-1.463	-1293.16	-24.24	-0.951
	-1291.36	-28.59	-1.166	-1284.27	-25.63	-1.372
	-1307.37	-24.85	-1.458	-1297.24	-22.94	-0.838
	-1305.03	-29.51	-1.360	-1297.50	-27.77	-1.455
	-1299.04	-21.44	-1.280	-1299.95	-24.48	-1.330
	-1294.26	-29.86	-1.786	-1292.81	-27.31	-1.792
	-1296.03	-24.27	-1.688	-1290.03	-29.51	-1.739
	-1298.12	-27.22	-1.623	-1291.08	-27.88	-1.543
	-1302.78	-30.56	-1.827	-1294.62	-32.71	1.792

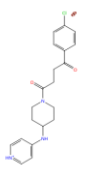
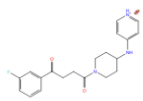
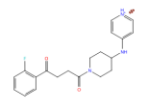
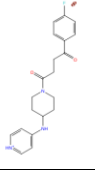
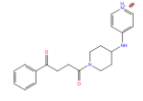
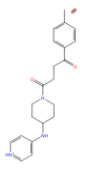
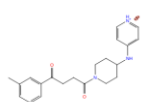
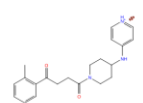
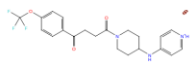
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1295.69	-28.32	-1.502	-1293.15	-26.50	-1.584
	-1295.71	-23.80	-1.347	-1294.17	-28.46	-1.438
	-1318.69	-22.27	-2.226	-1314.56	-21.24	-1.299
	-1315.98	-23.30	-1.699	-1311.73	-23.77	-1.902
	-1314.65	-21.32	-1.484	-1309.20	-14.90	-1.702
	-1303.78	-20.60	-2.094	-1303.67	-19.04	-1.844
	-1302.38	-23.14	-1.709	-1296.45	-20.16	-1.533
	-1296.13	-20.24	-1.306	-1299.43	-22.59	-1.234
	-1319.89	-21.81	-2.400	-1317.33	-25.42	-2.172

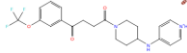
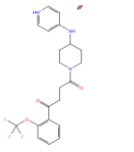
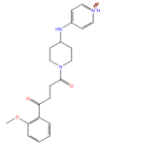
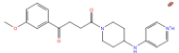
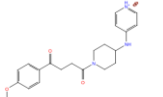
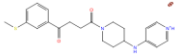
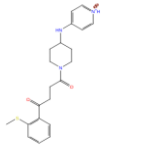
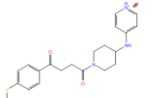
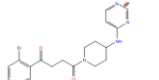
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1316.73	-23.48	-1.736	-1313.09	-23.36	-1.539
	-1315.84	-22.45	-1.917	-1314.10	-21.46	-1.504
	-1317.26	-26.39	-1.647	-1311.56	-20.99	-1.942
	-1315.04	-26.46	-1.641	-1312.17	-21.98	-1.434
	-1311.73	-26.35	-1.551	-1309.65	-21.48	-1.468
	-1319.33	-22.90	-1.515	-1314.33	-18.19	-1.753
	-1318.42	-23.82	-1.386	-1313.09	-20.65	-1.870
	-1313.52	-22.62	-0.920	-1303.88	-20.90	-1.399
	-1322.07	-25.37	-1.793	-1316.83	-27.18	-1.323

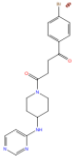
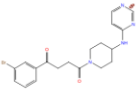
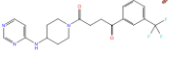
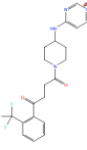
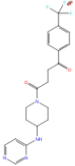
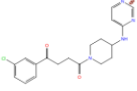
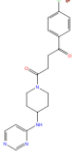
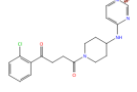
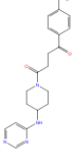
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1322.11	-17.77	-1.764	-1320.90	-24.91	-1.553
	-1322.88	-20.95	-1.571	-1318.79	-17.85	-1.136
	-1319.81	-31.26	-2.069	-1314.24	-25.85	-2.181
	-1316.48	-24.53	-1.752	-1312.55	-22.22	-2.428
	-1316.50	-22.62	-1.648	-1311.29	-24.87	-1.821
	-1319.68	-23.41	-2.100	-1317.31	-26.69	-1.974
	-1320.72	-23.24	-1.957	-1317.02	-25.34	-1.335
	-1317.71	-23.42	-1.628	-1312.47	-21.65	-1.886
	-1306.57	-17.91	-2.338	-1303.84	-18.95	-1.622

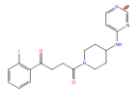
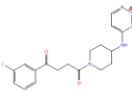
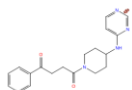
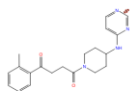
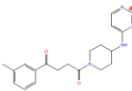
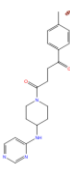
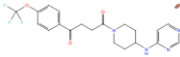
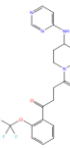
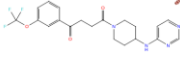
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1304.59	-20.39	-1.568	-1297.76	-18.66	-1.767
	-1305.74	-22.12	-1.518	-1300.38	-22.21	-1.537
	-1291.25	-20.17	-1.683	-1288.79	-20.99	-1.098
	-1294.55	-14.22	-1.402	-1290.76	-18.06	-1.451
	-1291.47	-19.64	-1.214	-1290.35	-18.42	-1.448
	-1309.20	-20.41	-1.917	-1299.88	-17.95	-1.761
	-1305.68	-20.89	-1.694	-1297.82	-19.95	-1.631
	-1307.63	-16.83	-1.638	-1303.72	-19.10	-1.506
	-1303.56	-19.36	-1.716	-1301.42	-17.87	-1.579

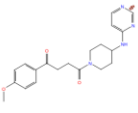
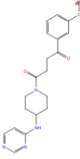
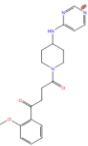
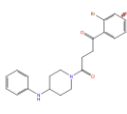
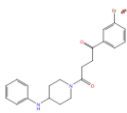
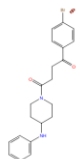
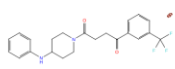
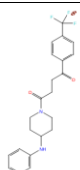
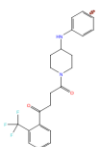
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1311.27	-21.22	-1.662	-1300.63	-18.77	-1.896
	-1307.32	-16.79	-1.480	-1300.61	-17.91	-1.487
	-1300.80	-19.82	-1.845	-1298.74	-19.54	-1.235
	-1300.33	-27.43	-1.650	-1299.81	-17.37	-2.067
	-1306.64	-21.27	-1.533	-1305.59	-20.12	-0.952
	-1311.87	-21.55	-1.369	-1303.88	-14.13	-1.068
	-1316.36	-20.55	-1.654	-1305.76	-23.26	-1.658
	-1313.07	-18.66	-1.561	-1312.90	-26.11	-1.835
	-1312.02	-22.65	-1.331	-1309.92	-25.89	-1.506

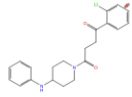
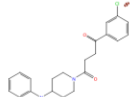
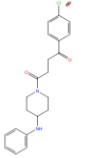
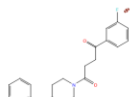
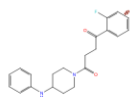
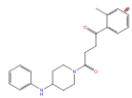
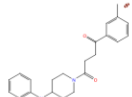
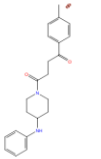
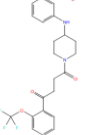
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1308.54	-24.89	-1.727	-1300.59	-24.28	-1.684
	-1312.42	-27.30	-1.725	-1304.46	-18.38	-1.995
	-1306.53	-29.62	-1.678	-1304.17	-27.03	-1.837
	-1309.56	-22.02	-1.515	-1305.48	-17.53	-1.395
	-1303.76	-26.23	-1.265	-1301.90	-26.46	-1.423
	-1303.79	-18.52	-1.030	-1299.64	-24.57	-1.064
	-1295.15	-25.37	-1.404	-1291.00	-21.26	-1.248
	-1289.64	-22.23	-1.177	-1288.40	-18.60	-0.879
	-1297.33	-26.07	-1.170	-1294.88	-22.37	-1.151

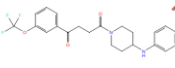
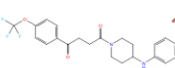
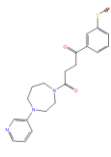
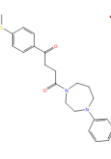
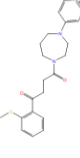
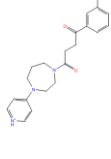
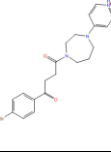
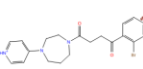
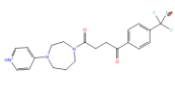
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1309.31	-22.95	-1.527	-1306.19	-18.01	-1.598
	-1310.67	-27.82	-1.388	-1302.77	-26.70	-1.409
	-1304.98	-18.17	-1.324	-1300.02	-21.61	-1.210
	-1307.54	-21.65	-1.770	-1301.19	-19.58	-1.140
	-1304.35	-12.86	-1.671	-1300.34	-22.76	-1.036
	-1300.32	-28.16	-1.451	-1294.80	-19.01	-1.357
	-1312.69	-27.76	-1.319	-1304.37	-28.08	-1.255
	-1307.79	-21.03	-1.304	-1300.40	-19.68	-1.107
	-1310.51	-21.93	-1.573	-1305.66	-21.01	-1.352

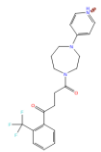
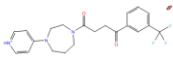
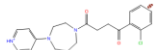
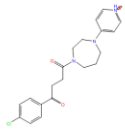
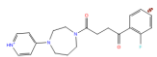
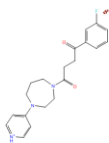
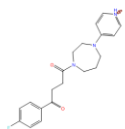
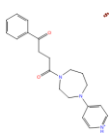
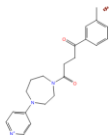
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1307.84	-15.75	-1.316	-1314.65	-24.69	-0.975
	-1311.31	-24.70	-1.277	-1305.29	-23.36	-1.343
	-1268.20	-23.98	-1.625	-1266.13	-28.52	-1.589
	-1273.77	-28.35	-1.625	-1271.52	-12.41	-1.666
	-1268.07	-17.47	-1.267	-1271.02	-29.69	-1.830
	-1279.73	-18.71	-2.380	-1277.45	-22.26	-1.803
	-1281.41	-21.42	-2.055	-1279.47	-22.57	-2.455
	-1286.09	-14.55	-1.942	-1285.05	-18.56	-2.112
	-1270.87	-18.15	-2.136	-1266.88	-21.79	-2.230

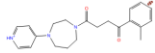
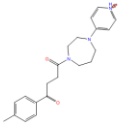
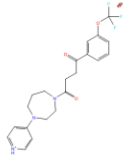
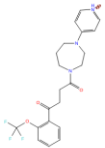
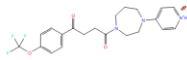
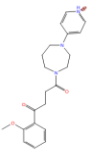
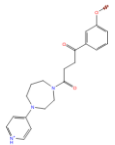
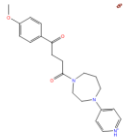
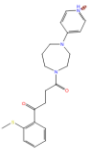
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1265.02	-17.54	-1.999	-1269.85	-24.90	-2.396
	-1270.82	-22.65	-1.975	-1263.91	-20.67	-1.227
	-1286.90	-24.31	-2.394	-1285.50	-22.94	-1.866
	-1279.17	-22.12	-2.351	-1278.59	-23.29	-1.839
	-1287.51	-22.18	-2.522	-1283.98	-24.45	-2.238
	-1283.79	-18.91	-2.288	-1278.64	-22.00	-1.853
	-1284.27	-21.31	-1.790	-1276.84	-20.11	-2.266
	-1279.35	-20.50	-2.212	-1277.59	-24.21	-2.254
	-1287.21	-22.68	-2.197	-1285.33	-18.18	-1.656

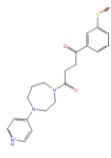
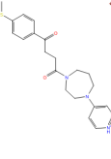
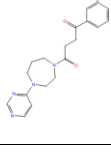
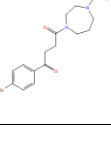
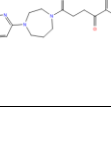
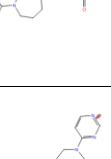
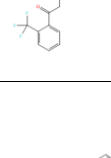
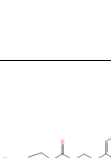
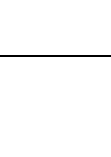
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1278.79	-16.42	-2.109	-1278.90	-18.12	-2.154
	-1286.62	-23.73	-2.001	-1281.53	-22.91	-1.783
	-1286.40	-20.89	-2.307	-1285.75	-20.16	-2.128
	-1292.26	-25.66	-2.268	-1290.24	-23.19	-1.895
	-1288.30	-22.67	-2.080	-1285.87	-18.88	-1.137
	-1284.60	-26.71	-2.688	-1280.45	-18.60	-1.238
	-1281.98	-19.39	-2.422	-1281.19	-23.62	-2.646
	-1281.36	-22.93	-2.397	-1279.82	-23.95	-1.837
	-1287.61	-19.89	-2.303	-1280.78	-15.18	-2.462

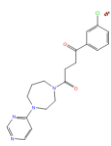
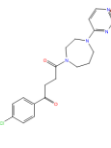
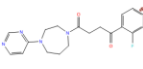
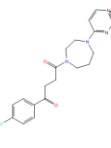
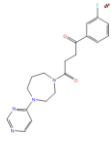
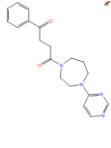
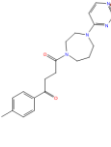
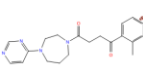
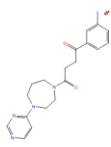
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1282.86	-21.04	-2.195	-1284.25	-22.76	-1.061
	-1283.64	-16.18	-0.279	-1280.66	-18.35	-2.331
	-1277.26	-15.75	-1.424	-1272.69	-14.17	-0.956
	-1275.93	-21.13	-1.263	-1272.69	-14.17	-0.956
	-1277.01	-12.08	-1.011	-1277.61	-26.20	-2.124
	-1256.17	-22.93	-2.100	-1258.95	-20.03	-1.213
	-1265.29	-24.99	-1.986	-1266.88	-16.91	-1.538
	-1259.58	-25.29	-1.947	-1261.31	-24.70	-1.839
	-1280.03	-24.69	-1.451	-1282.08	-18.12	-1.395

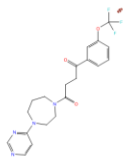
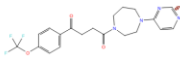
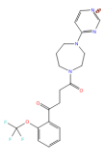
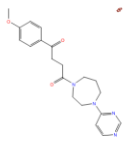
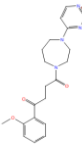
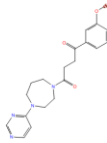
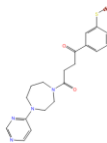
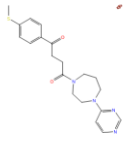
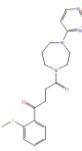
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1272.96	-13.77	-1.402	-1272.64	-22.49	-2.007
	-1273.64	-15.13	-1.203	-1275.45	-20.52	-1.365
	-1274.50	-17.01	-1.792	-1279.95	-15.21	-1.598
	-1273.04	-22.61	-1.092	-1271.71	-13.37	-1.096
	-1275.23	-10.46	-1.068	-1279.23	-17.59	-1.541
	-1271.96	-21.65	-2.165	-1273.17	-16.63	-1.568
	-1278.32	-25.40	-1.838	-1281.61	-18.33	-1.681
	-1275.14	-18.47	-1.476	-1269.72	-24.39	-1.967
	-1278.19	-17.30	-1.204	-1274.56	-26.49	-1.988

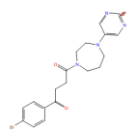
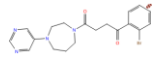
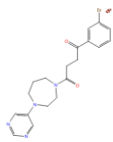
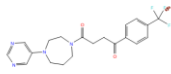
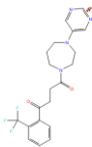
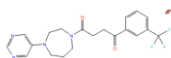
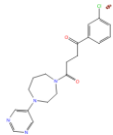
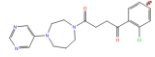
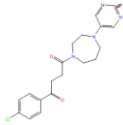
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1285.32	-17.74	-1.451	-1283.68	-20.97	-1.636
	-1282.16	-16.66	-1.181	-1282.39	-16.18	-1.261
	-1284.48	-21.19	-0.992	-1282.40	-17.46	-1.565
	-1272.59	-25.18	-2.019	-1273.70	-14.03	-1.554
	-1273.41	-17.38	-1.566	-1271.18	-27.21	-2.359
	-1273.95	-22.08	-1.566	-1274.02	-20.60	-0.756
	-1275.92	-26.11	-2.042	-1275.86	-24.04	-2.117
	-1275.58	-26.80	-1.947	-1276.21	-22.89	-2.019
	-1277.63	-14.79	-0.937	-1274.64	-21.66	-0.571

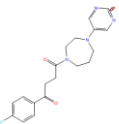
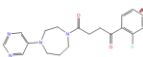
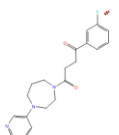
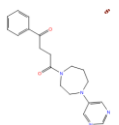
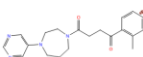
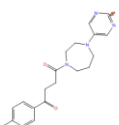
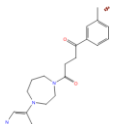
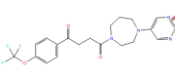
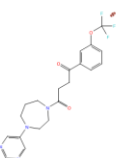
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1265.80	-23.55	-1.115	-1264.56	-18.44	-1.476
	-1275.88	-20.53	-0.983	-1270.50	-27.59	-1.427
	-1269.51	-20.66	-0.752	-1268.26	-25.72	-1.335
	-1255.07	-17.00	-1.310	-1254.90	-19.11	-1.079
	-1254.13	-21.79	-1.191	-1253.74	-18.66	-1.323
	-1249.73	-18.73	-1.134	-1255.62	-17.89	-1.165
	-1267.16	-22.43	-1.387	-1270.61	-19.46	-1.658
	-1280.08	-19.01	-1.177	-1273.49	-24.19	-1.908
	-1272.90	-21.41	-0.761	-1264.89	-19.03	-1.659

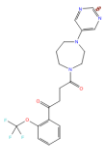
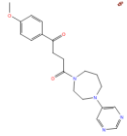
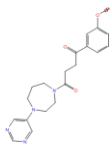
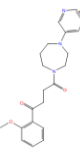
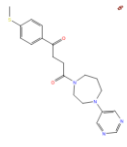
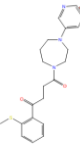
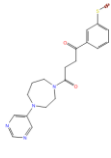
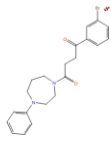
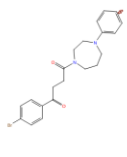
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1265.38	-17.86	-1.356	-1266.81	-13.61	-1.405
	-1269.93	-12.02	-1.144	-1269.64	-22.39	-1.810
	-1264.64	-18.20	-1.128	-1268.11	-21.21	-1.216
	-1262.80	-21.84	-1.494	-1260.60	-23.91	-1.596
	-1265.43	-22.93	-1.555	-1262.10	-18.45	-1.098
	-1272.05	-22.79	-1.503	-1269.16	-19.31	-1.856
	-1271.84	-18.06	-1.080	-1267.87	-18.81	-1.815
	-1276.27	-24.90	-1.651	-1270.88	-23.91	-1.624
	-1273.63	-17.92	-1.310	-1272.92	-20.23	-1.284

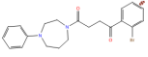
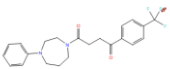
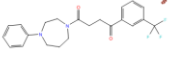
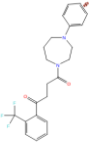
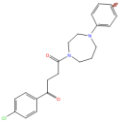
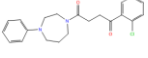
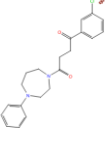
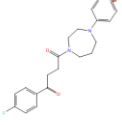
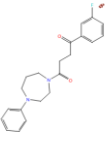
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1272.77	-10.85	-1.014	-1267.13	-13.42	-0.793
	-1267.31	-25.08	-1.914	-1263.37	-26.69	-1.618
	-1271.48	-25.31	-1.903	-1267.16	-25.43	-1.931
	-1266.50	-11.58	-1.638	-1267.36	-20.86	-0.768
	-1271.75	-25.48	-1.543	-1265.54	-20.37	-0.739
	-1275.11	-24.32	-1.537	-1272.17	-21.56	-0.760
	-1270.49	-23.74	-1.176	-1267.85	-20.26	-1.732
	-1266.92	-30.50	-1.146	-1261.59	-27.52	-0.902
	-1264.69	-10.99	-0.741	-1264.69	-13.12	-1.120

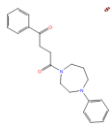
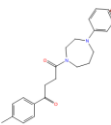
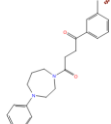
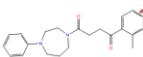
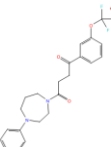
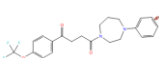
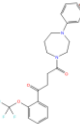
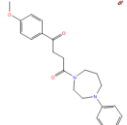
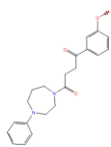
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1271.23	-14.97	-0.434	-1271.24	-11.79	-0.774
	-1254.63	-20.22	-1.136	-1250.65	-13.67	-1.409
	-1246.83	-13.94	-1.054	-1246.15	-23.94	-1.516
	-1255.23	-8.57	-0.498	-1255.59	-25.68	-1.532
	-1261.07	-13.05	-1.522	-1266.18	-13.87	-1.286
	-1272.88	-18.81	-1.131	-1270.38	-15.01	-1.061
	-1265.93	-18.19	-0.848	-1265.56	-15.71	-1.486
	-1266.15	-17.77	-1.325	-1264.07	-21.56	-1.221
	-1260.57	-8.56	-0.993	-1263.68	-21.88	-1.315

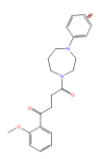
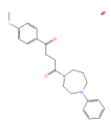
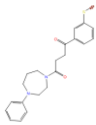
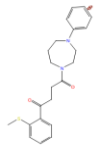
Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1262.47	-18.49	-0.891	-1260.47	-15.23	0.268
	-1264.64	-23.84	-1.491	-1267.55	-22.38	-0.685
	-1268.92	-18.35	-1.293	-1268.97	-18.51	-1.195
	-1261.63	-22.49	-1.137	-1258.86	-20.18	-0.905
	-1274.20	-14.82	-1.262	-1269.22	-15.10	-0.919
	-1280.36	-17.30	-1.232	-1267.77	-18.33	-1.002
	-1272.74	-16.40	-0.711	-1273.48	-17.96	-1.010
	-1267.75	-23.45	-1.554	-1262.61	-16.27	-0.788
	-1268.13	-26.08	-1.405	-1264.20	-29.04	-0.564

Продолжение Приложения Б

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4	5	6	7
	-1266.02	-23.43	-1.071	-1264.90	-22.42	-0.734
	-1268.23	-25.96	-1.203	-1264.74	-22.38	-0.904
	-1271.10	-24.91	-1.093	-1271.06	-19.92	-1.629
	-1269.69	-23.90	-1.031	-1270.92	-19.53	-1.022

Приложение В
Отчеты молекулярнодинамической симуляции

Отчет В.1. Молекулярнодинамическая симуляция референсного соединения

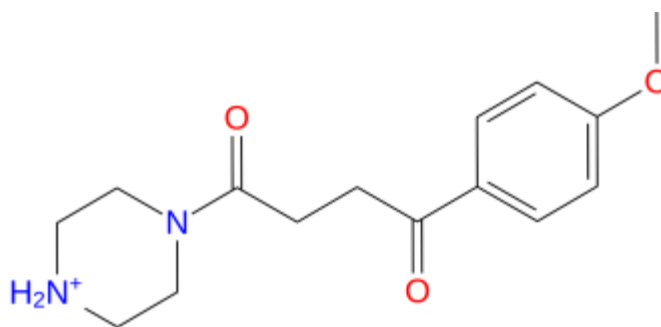


Рисунок В.1.1 – Структура референсного лиганда

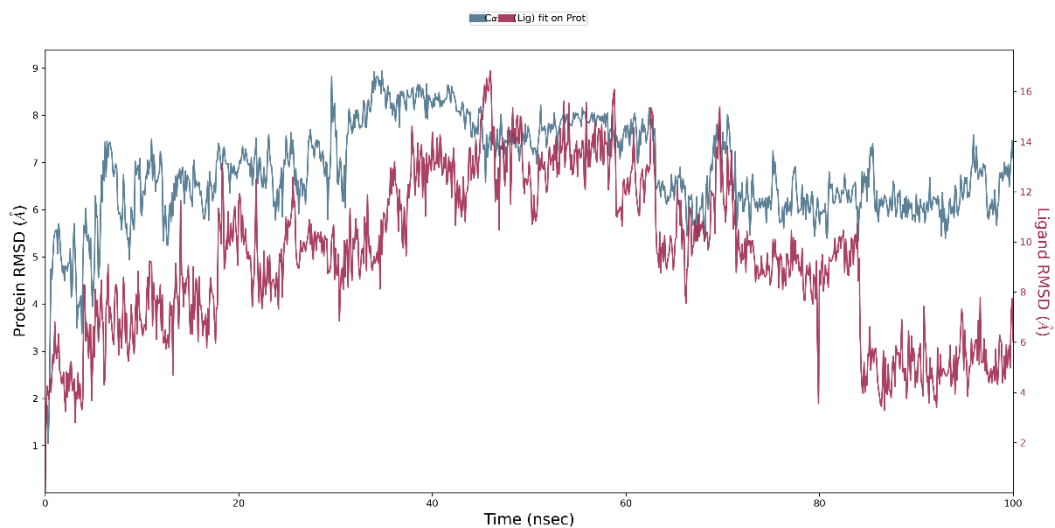


Рисунок В.1.2 – График зависимости RMSD

Продолжение Приложения В

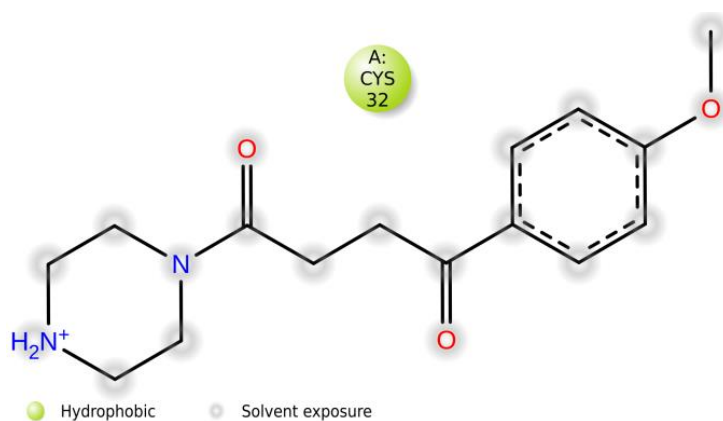


Рисунок В.1.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда с остатками белка

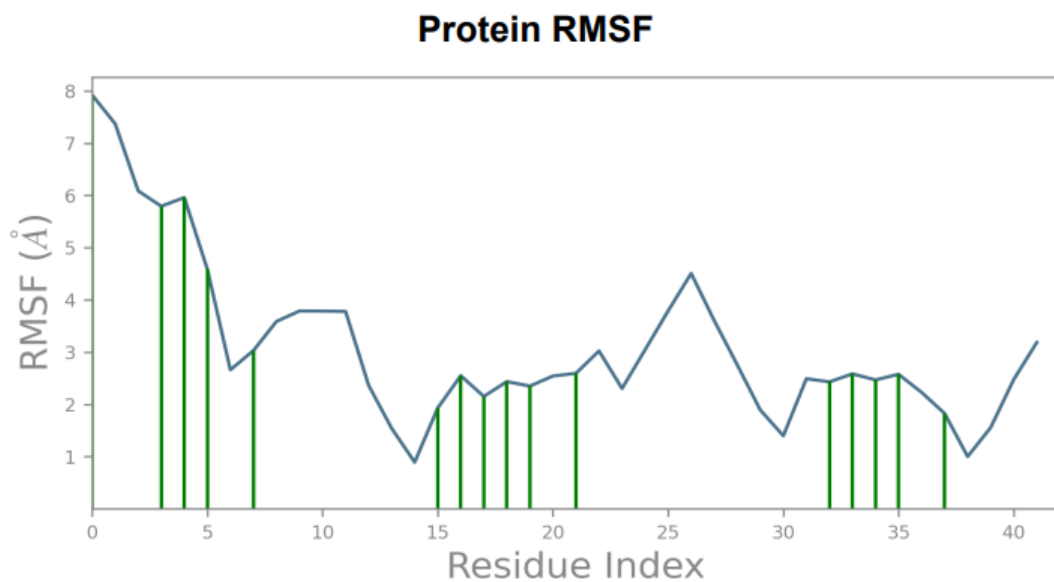


Рисунок В.1.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

Продолжение Приложения В

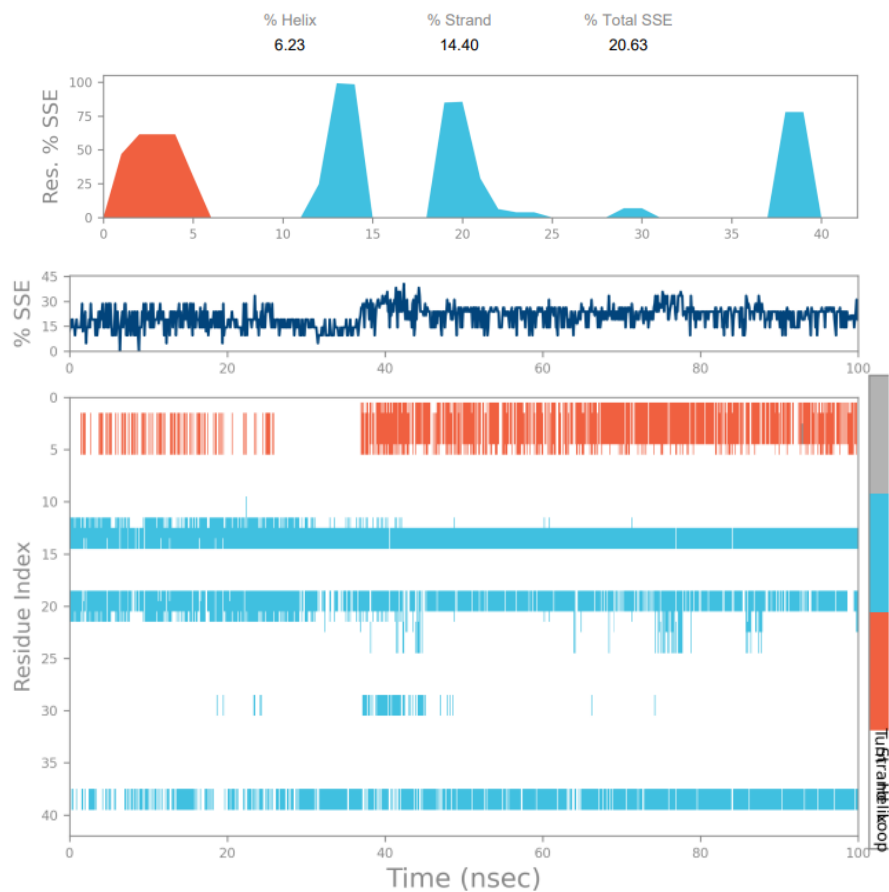


Рисунок В.1.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

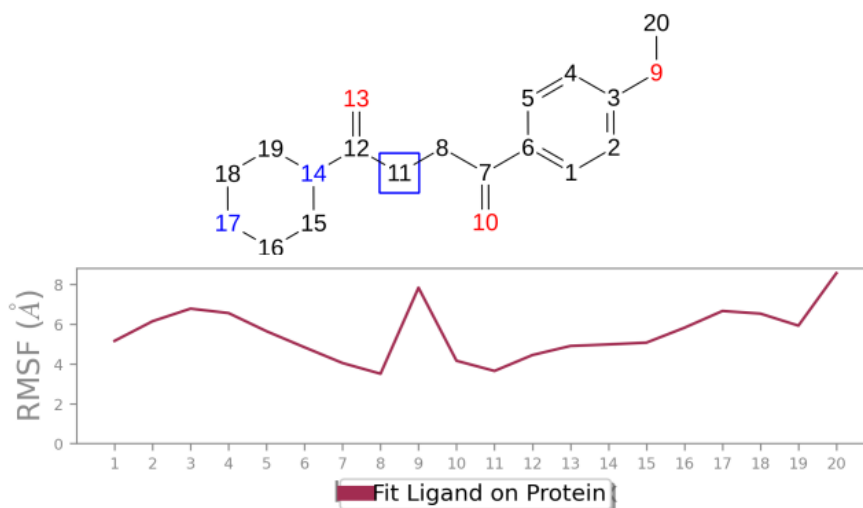


Рисунок В.1.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда

Продолжение Приложения В

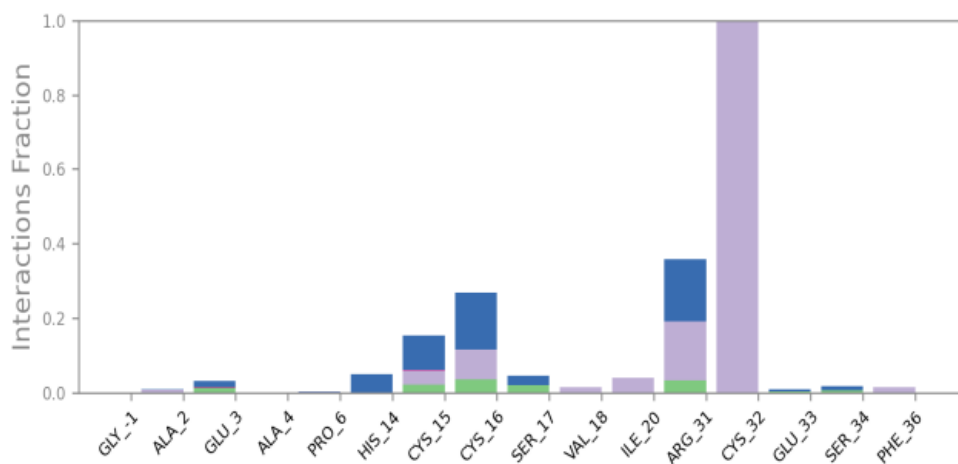


Рисунок В.1.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом

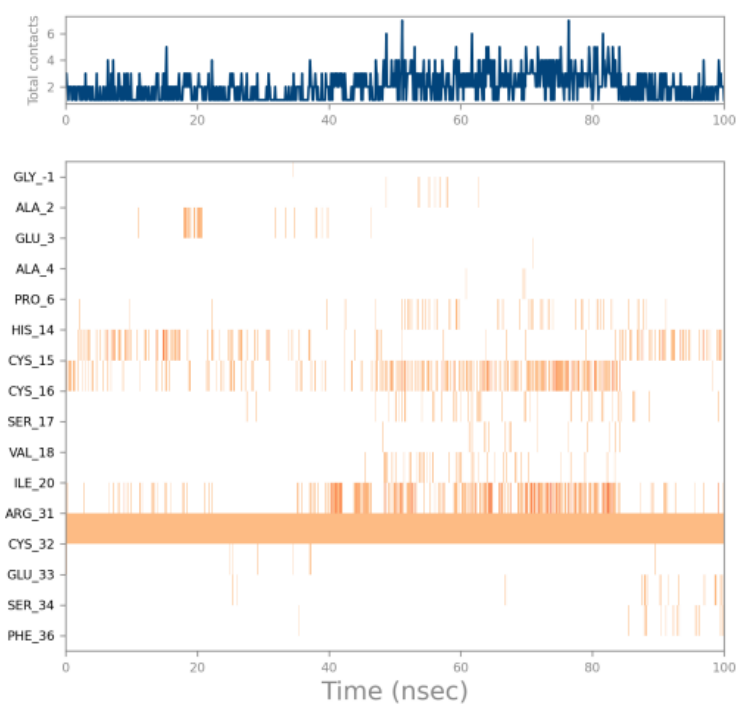


Рисунок В.1.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения В

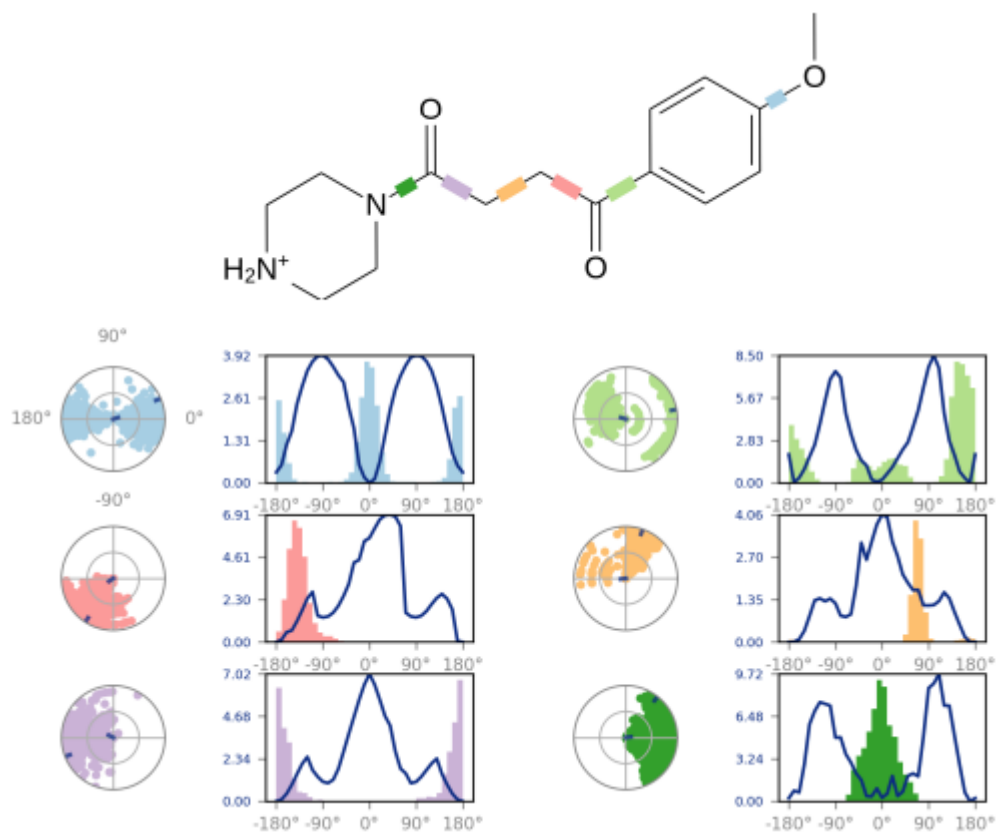


Рисунок В.1.9 – Торсионный профиль референсного лиганда

Продолжение Приложения В

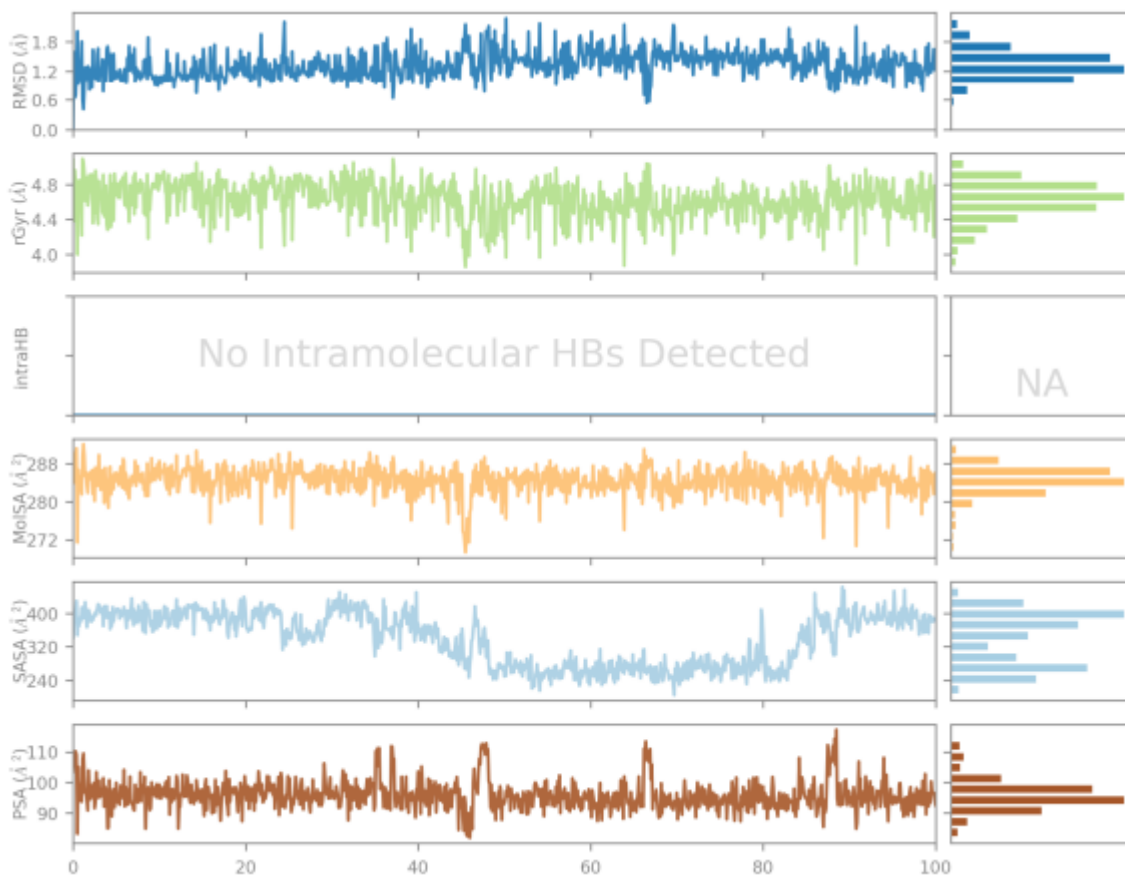


Рисунок В.1.10 – Свойства лиганда

Отчет В.2. Молекулярнодинамическая симуляция соединения 31

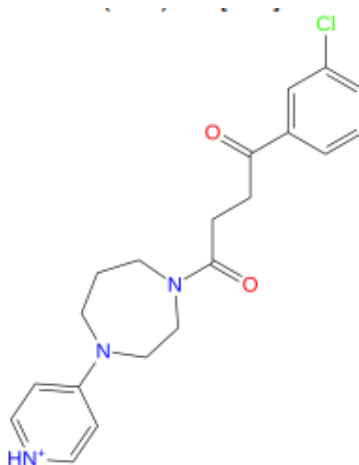


Рисунок В.2.1 – Структура 31 лиганда

Продолжение Приложения В

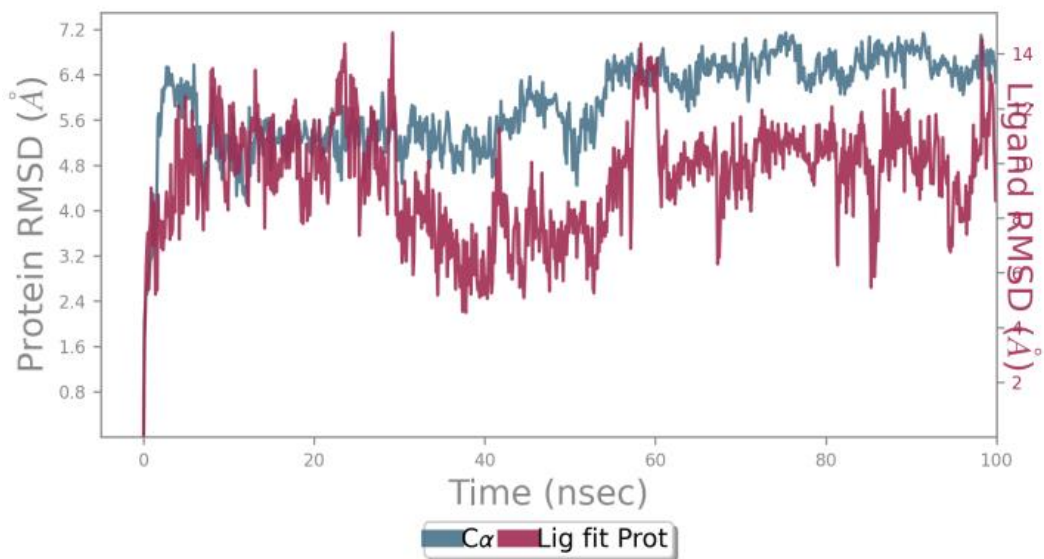


Рисунок В.2.2 – График зависимости RMSD

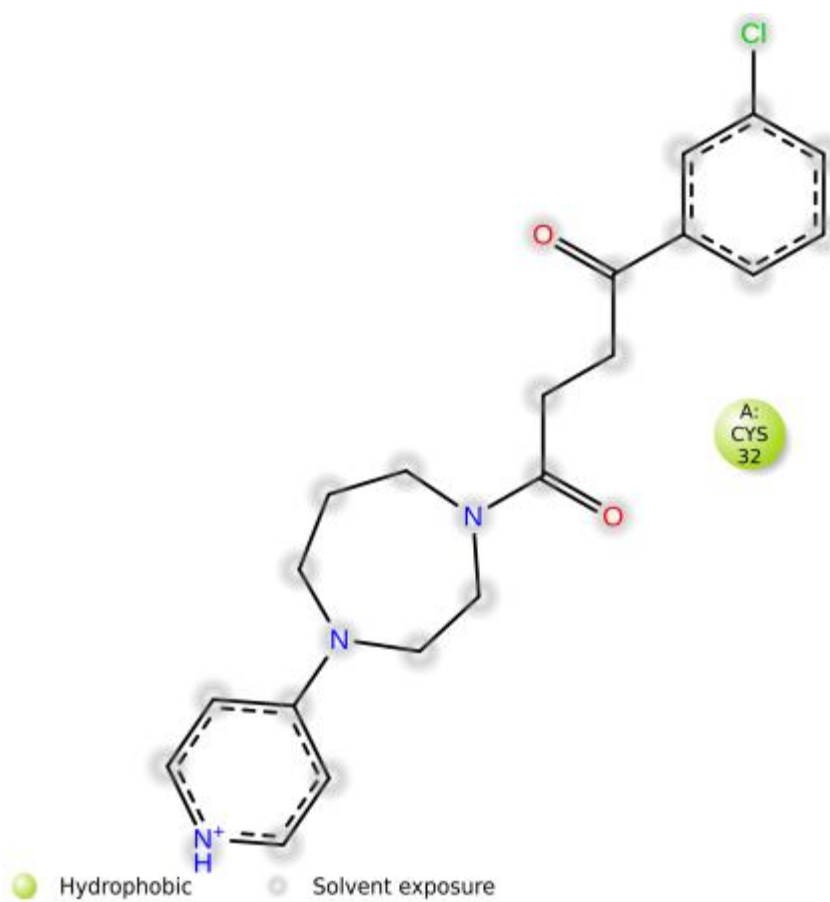


Рисунок В.2.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда с остатками белка

Продолжение Приложения В

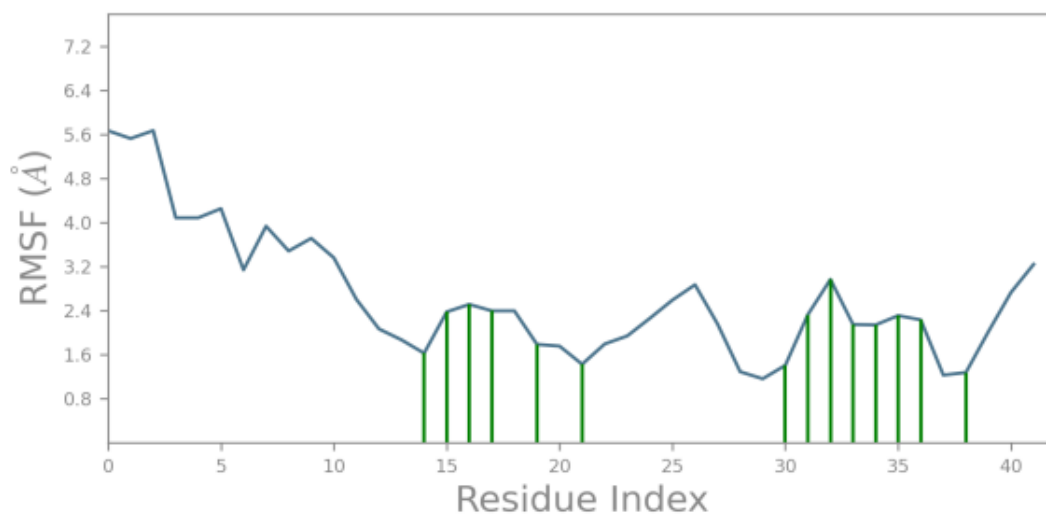


Рисунок В.2.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

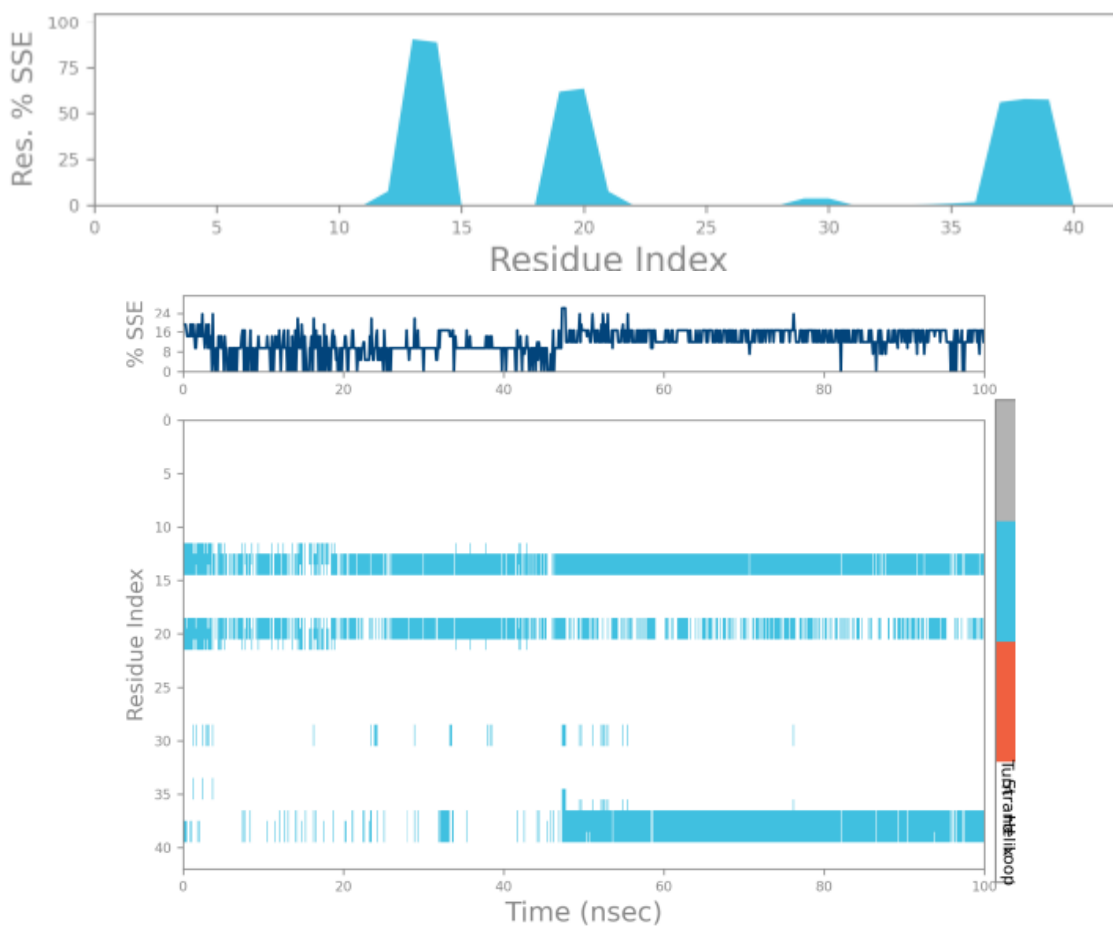


Рисунок В.2.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения В

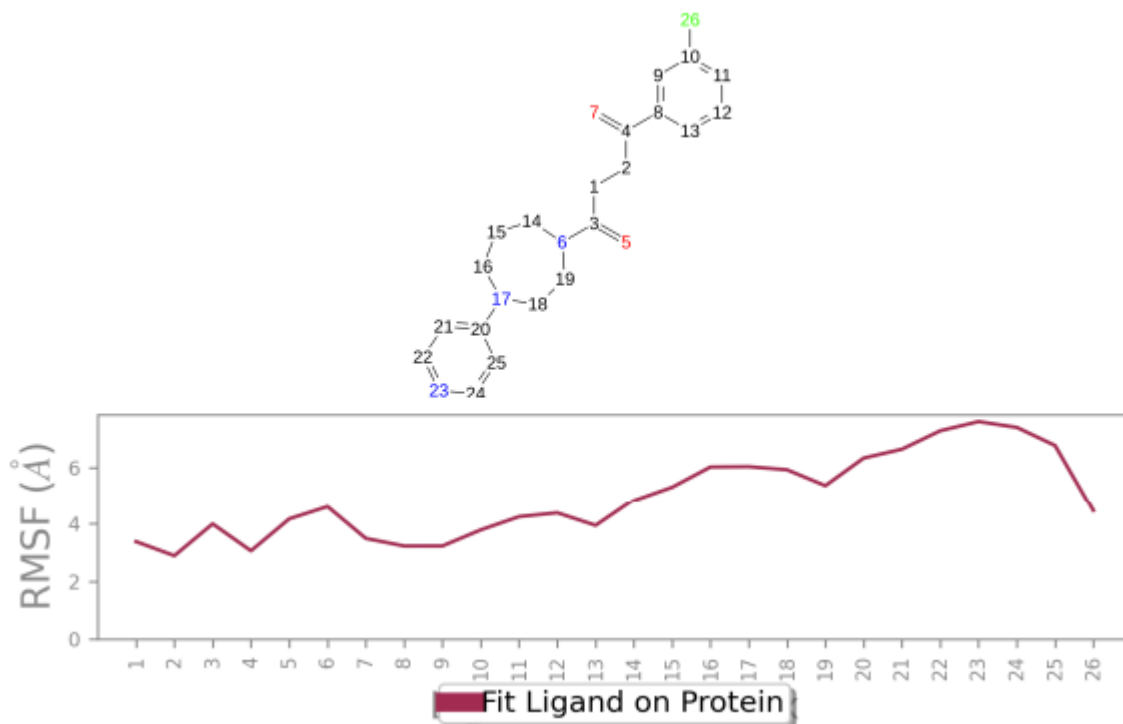


Рисунок В.2.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда

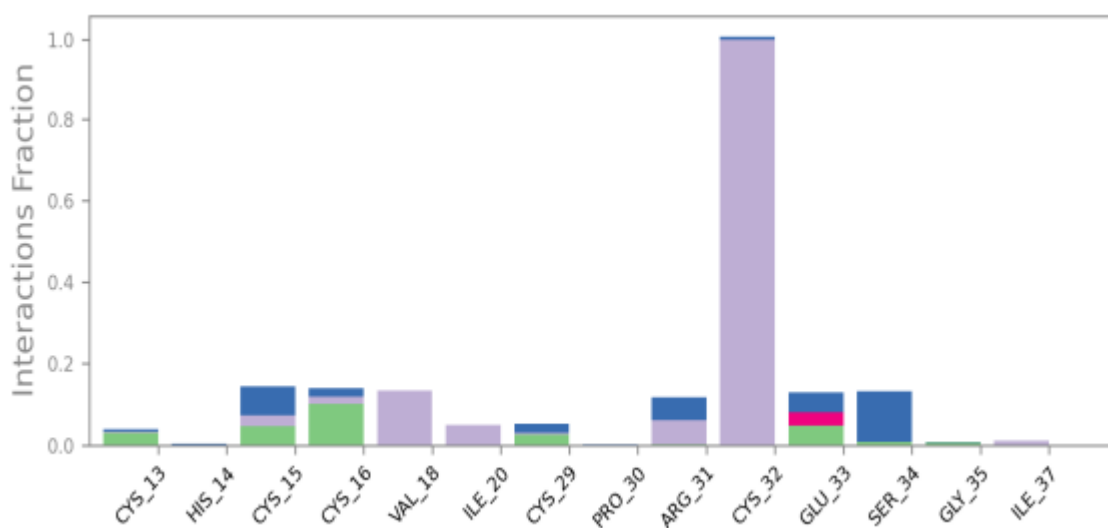


Рисунок В.2.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом

Продолжение Приложения В

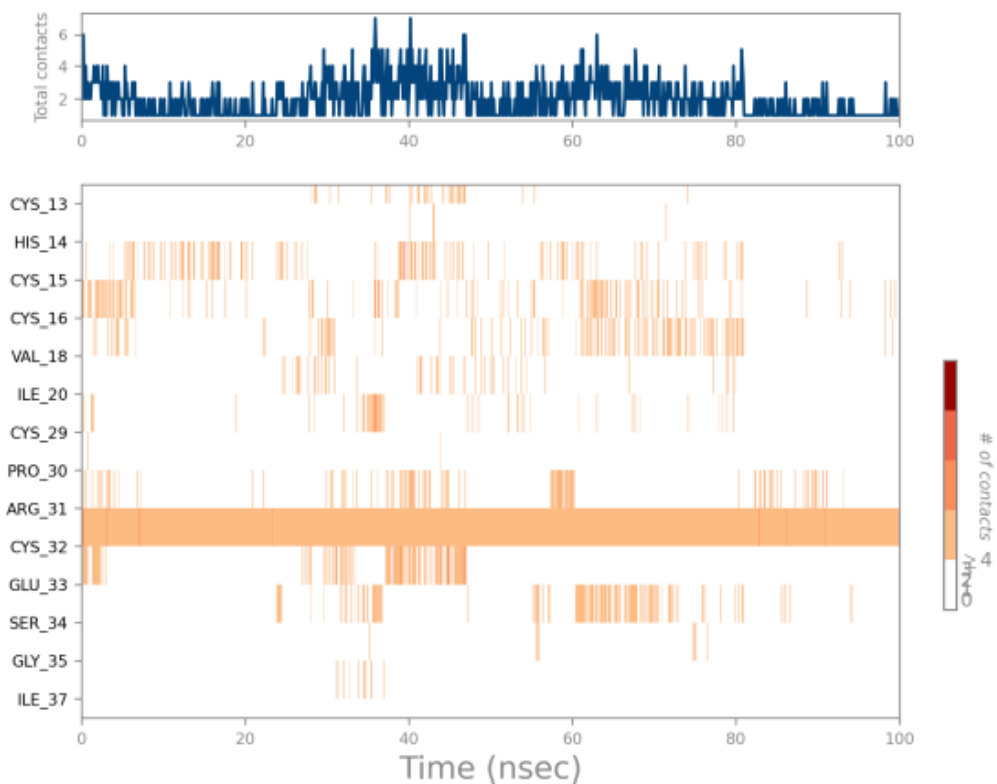


Рисунок В.2.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

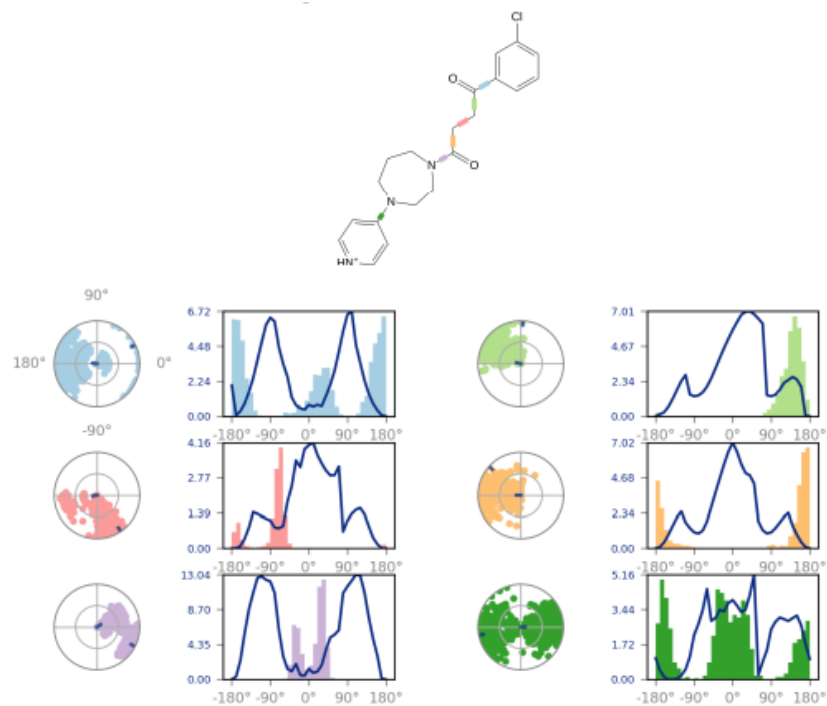


Рисунок В.2.9 – Торсионный профиль 31

Продолжение Приложения В

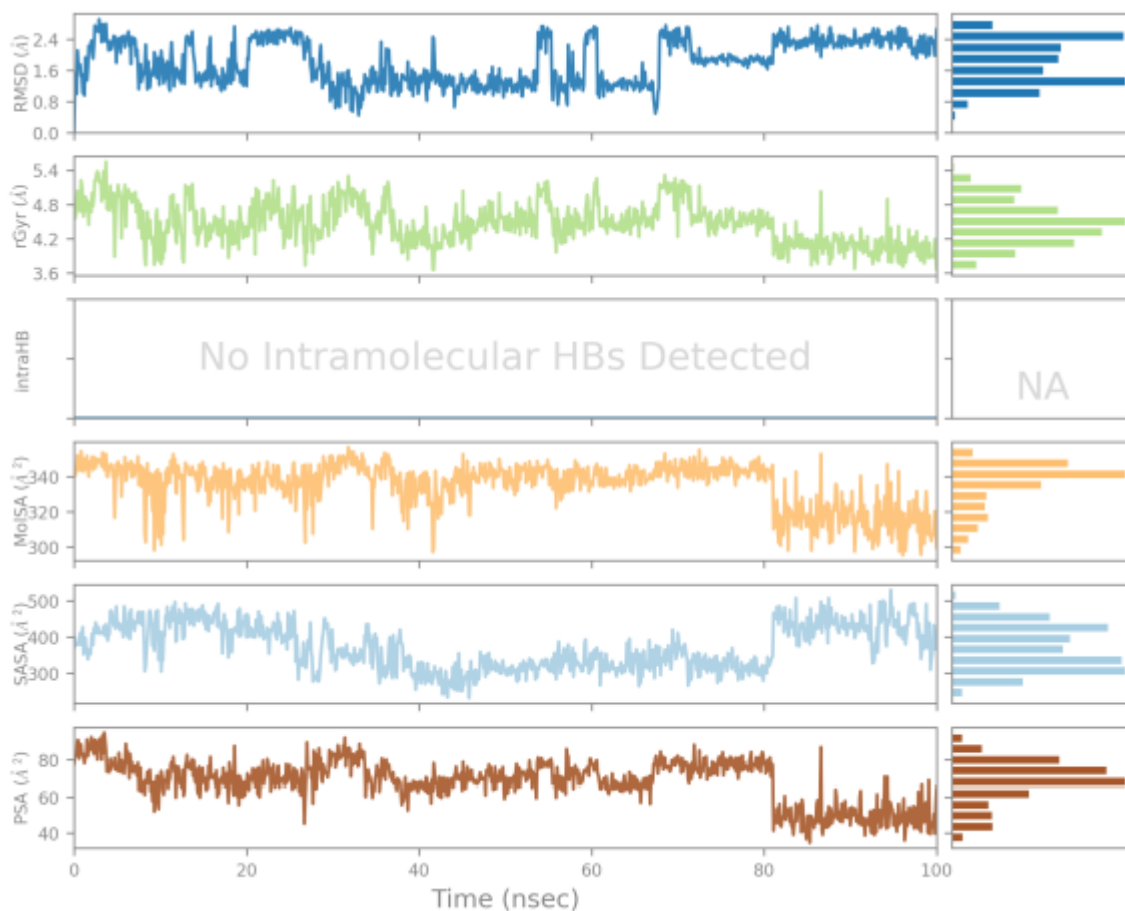


Рисунок В.2.10 – Свойства лиганда

Отчет В.3. Молекулярнодинамическая симуляция соединения 32

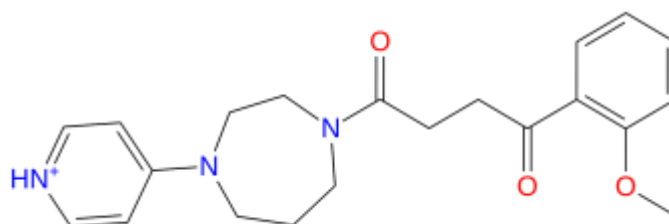


Рисунок В.3.1 – Структура 32 лиганда

Продолжение Приложения В

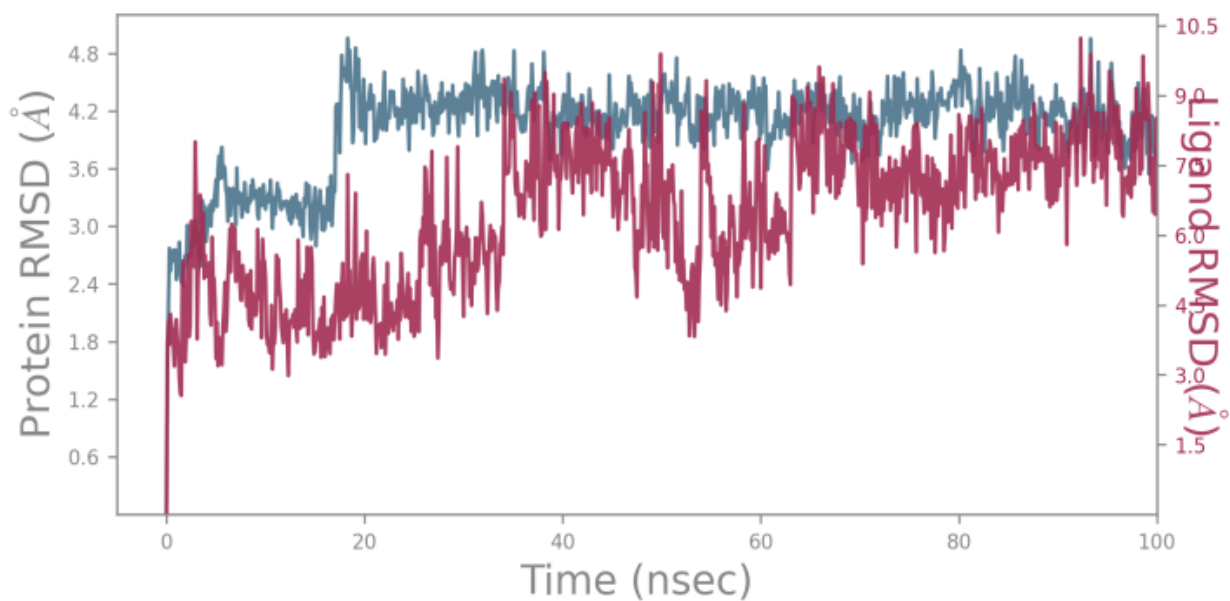


Рисунок В.3.2 – График зависимости RMSD

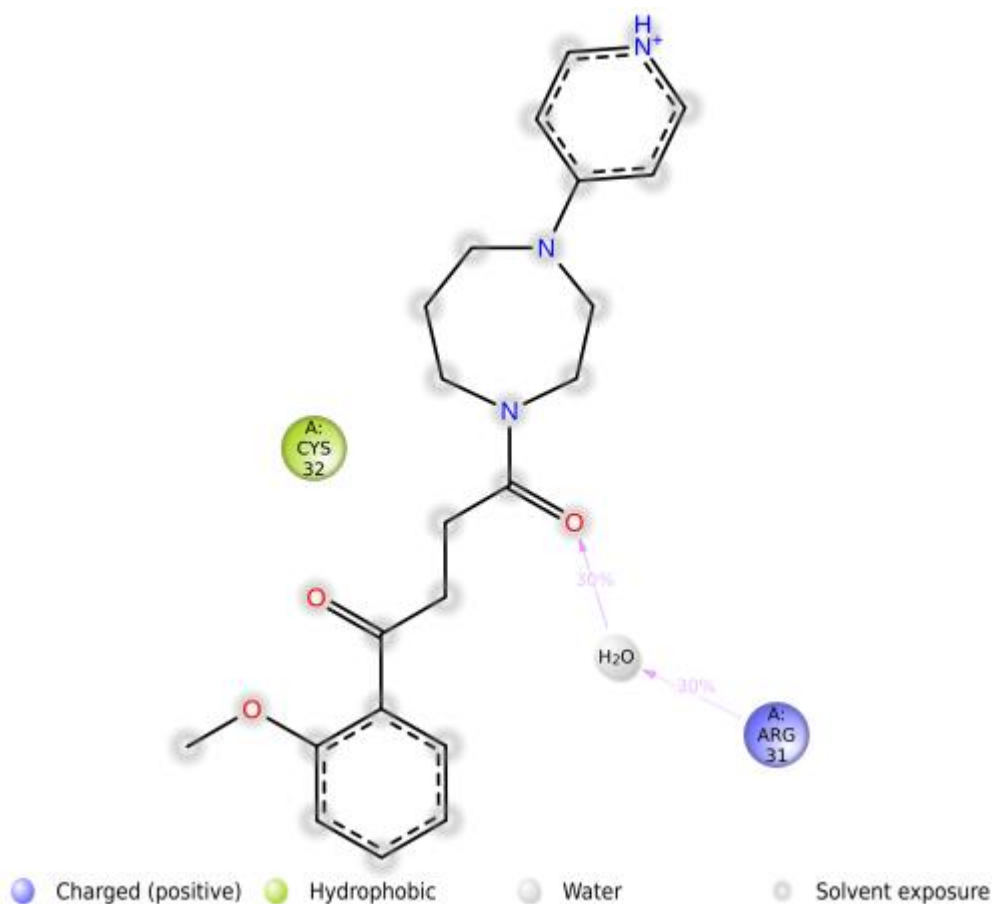


Рисунок В.3.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда с остатками белка

Продолжение Приложения В

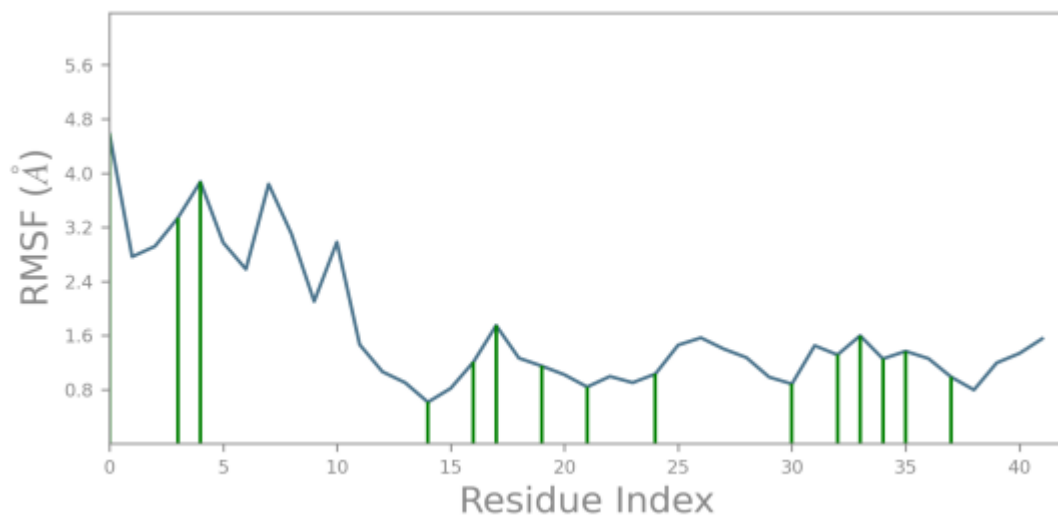


Рисунок В.3.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

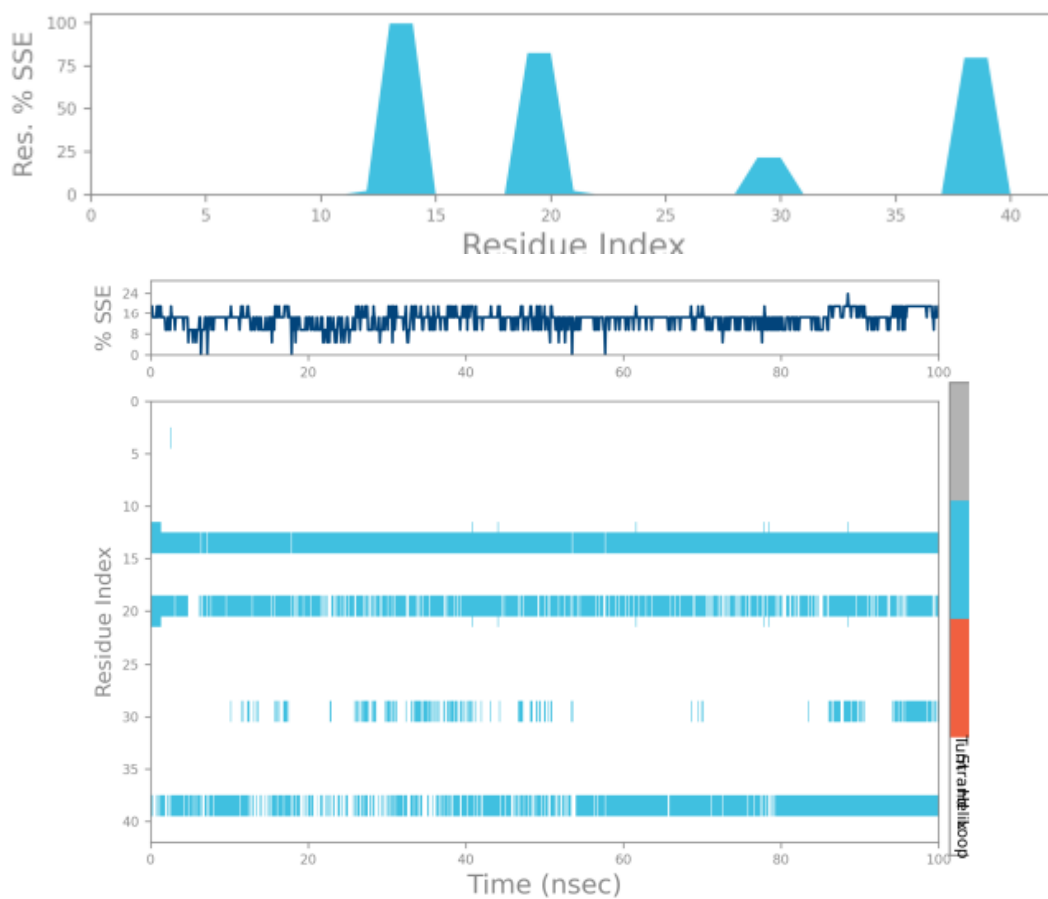


Рисунок В.3.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения В

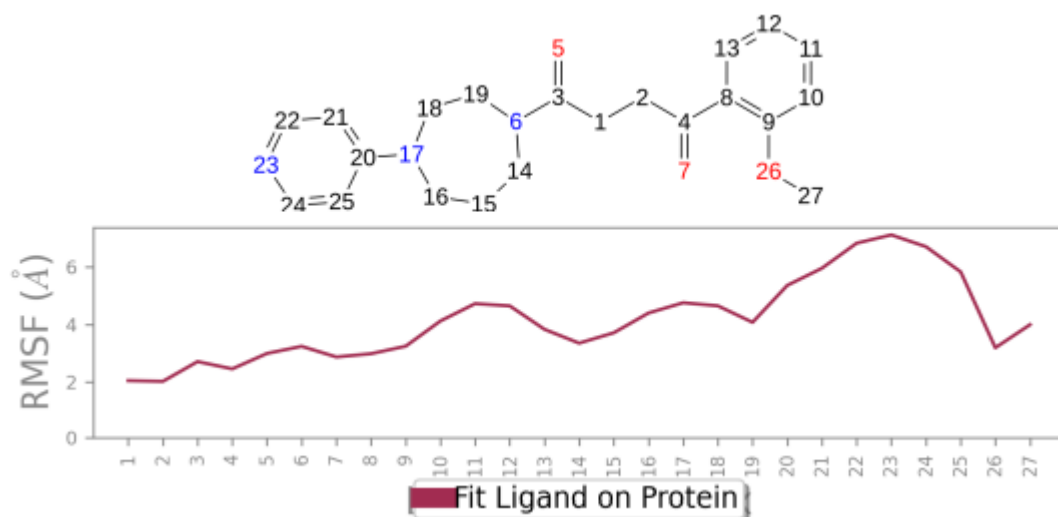


Рисунок В.3.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда

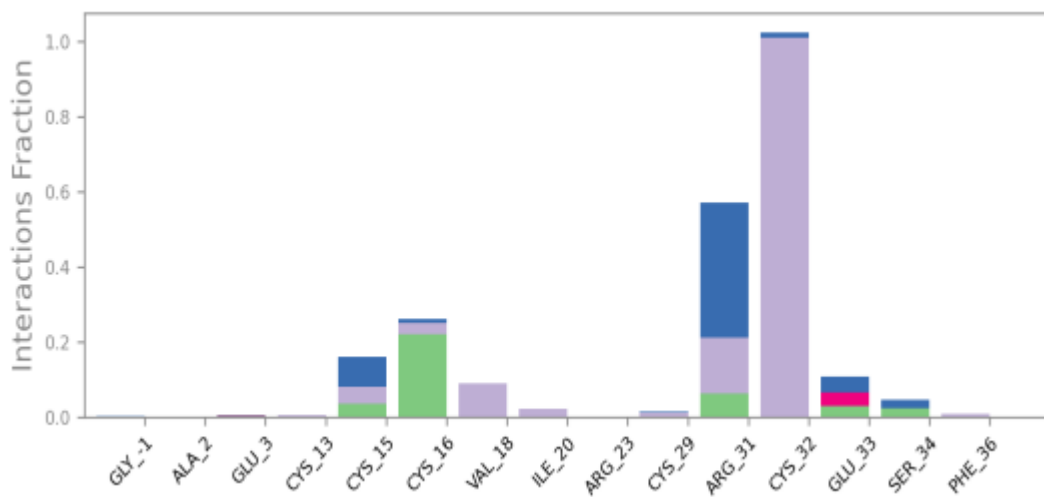


Рисунок В.3.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом

Продолжение Приложения В

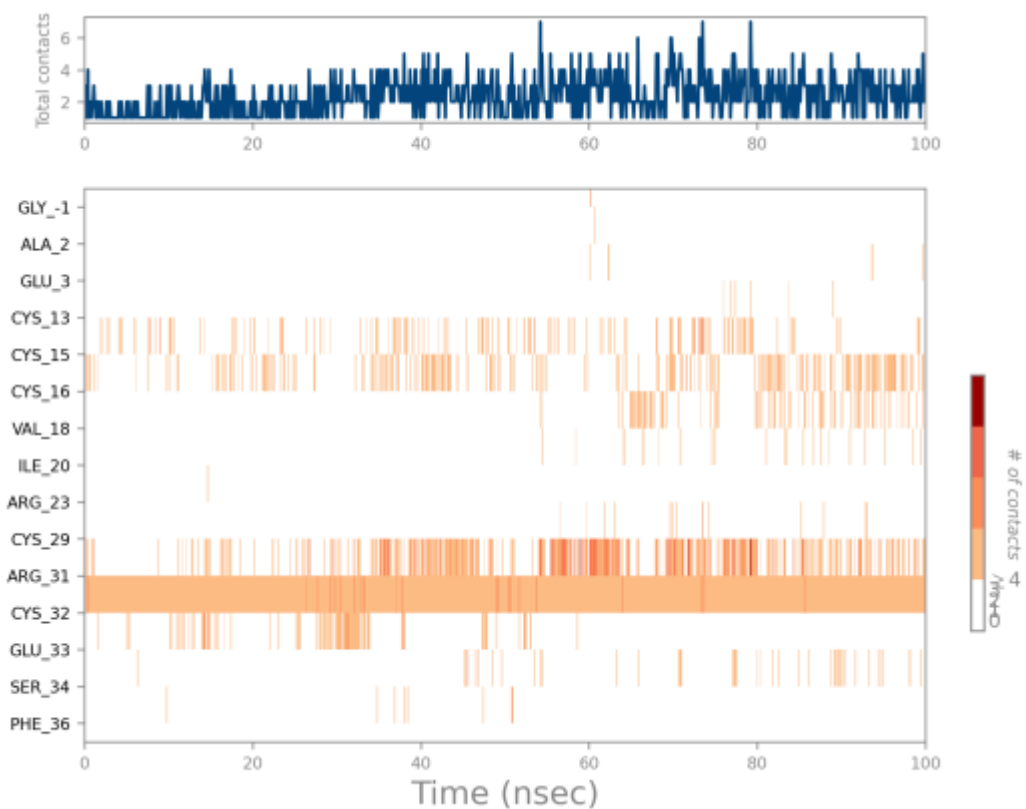


Рисунок В.3.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

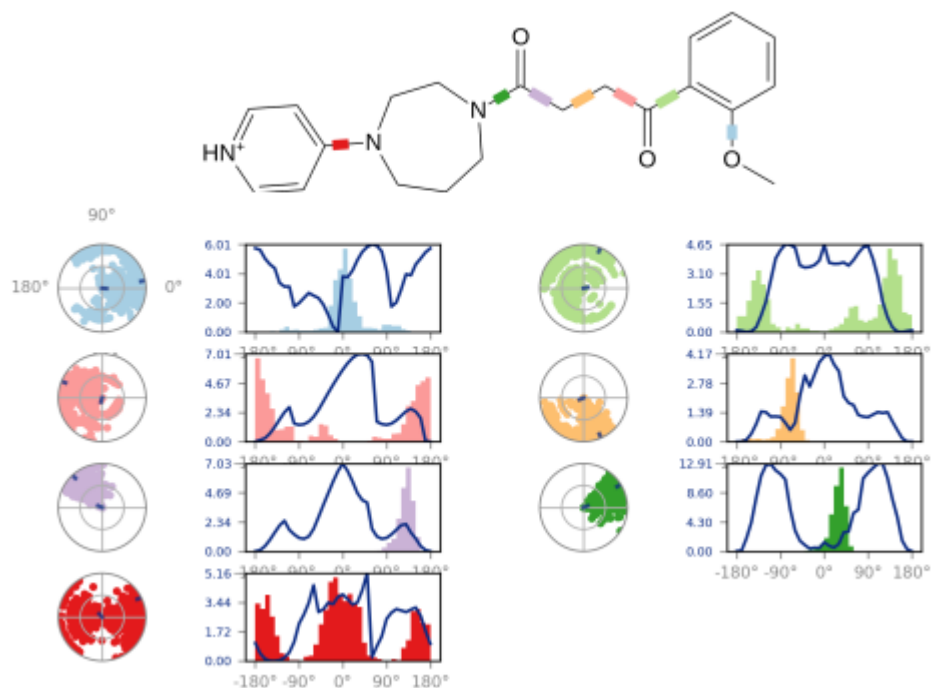


Рисунок В.3.9 – Торсионный профиль **32**

Продолжение Приложения В



Рисунок В.3.10 – Свойства лиганда

Отчет В.4. Молекулярнодинамическая симуляция соединения 33

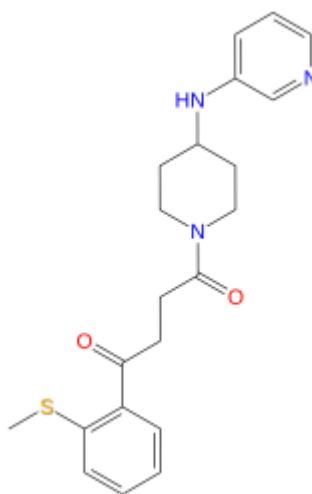


Рисунок В.4.1 – Структура 33 лиганда

Продолжение Приложения В

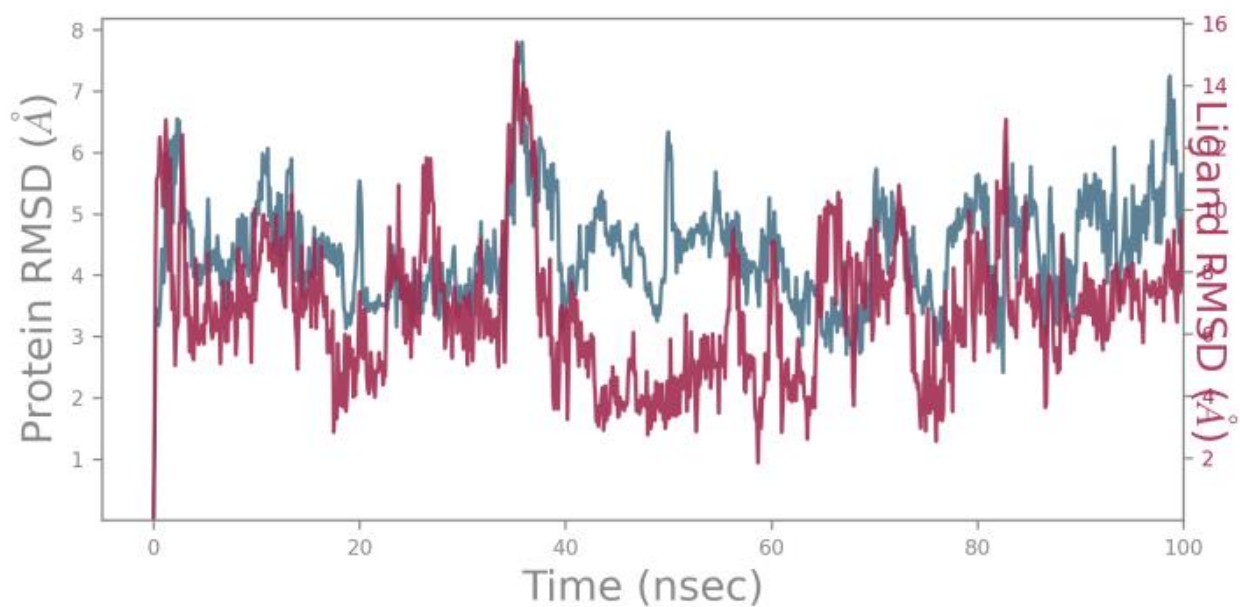


Рисунок В.4.2 – График зависимости RMSD

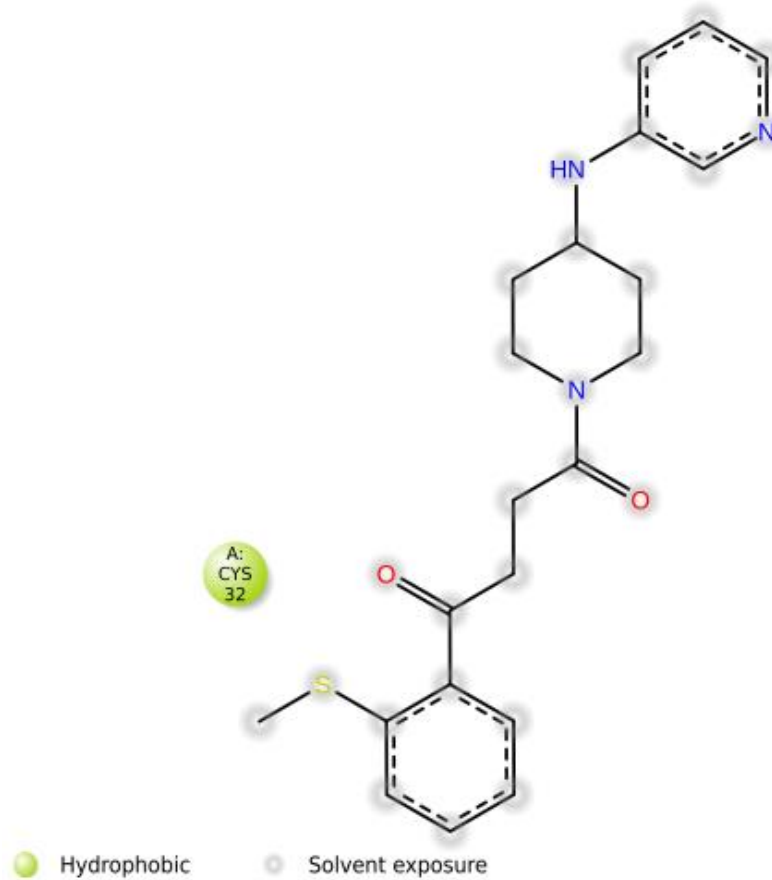


Рисунок В.4.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда с остатками белка

Продолжение Приложения В

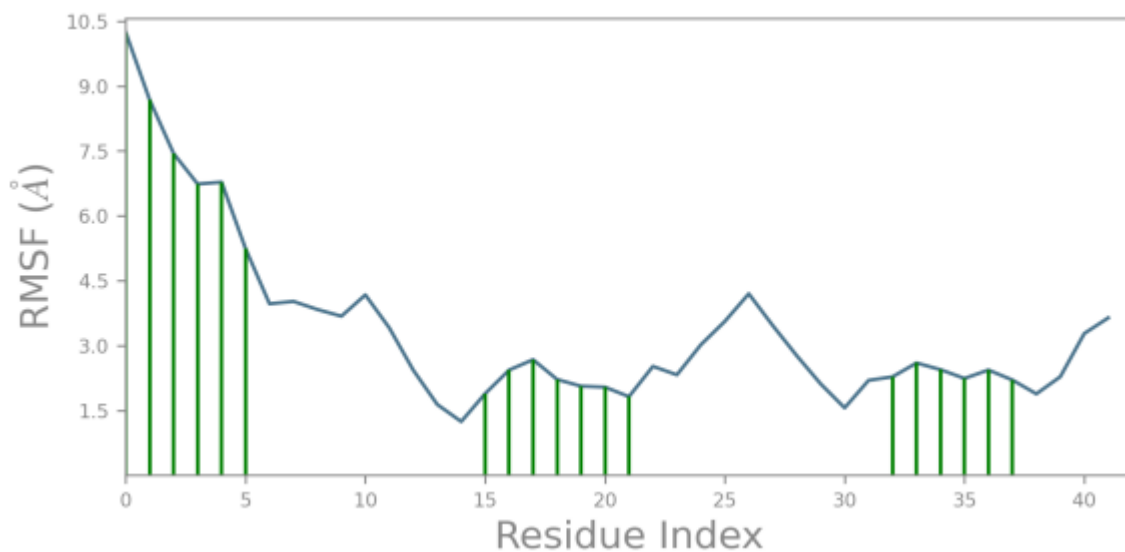


Рисунок В.4.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

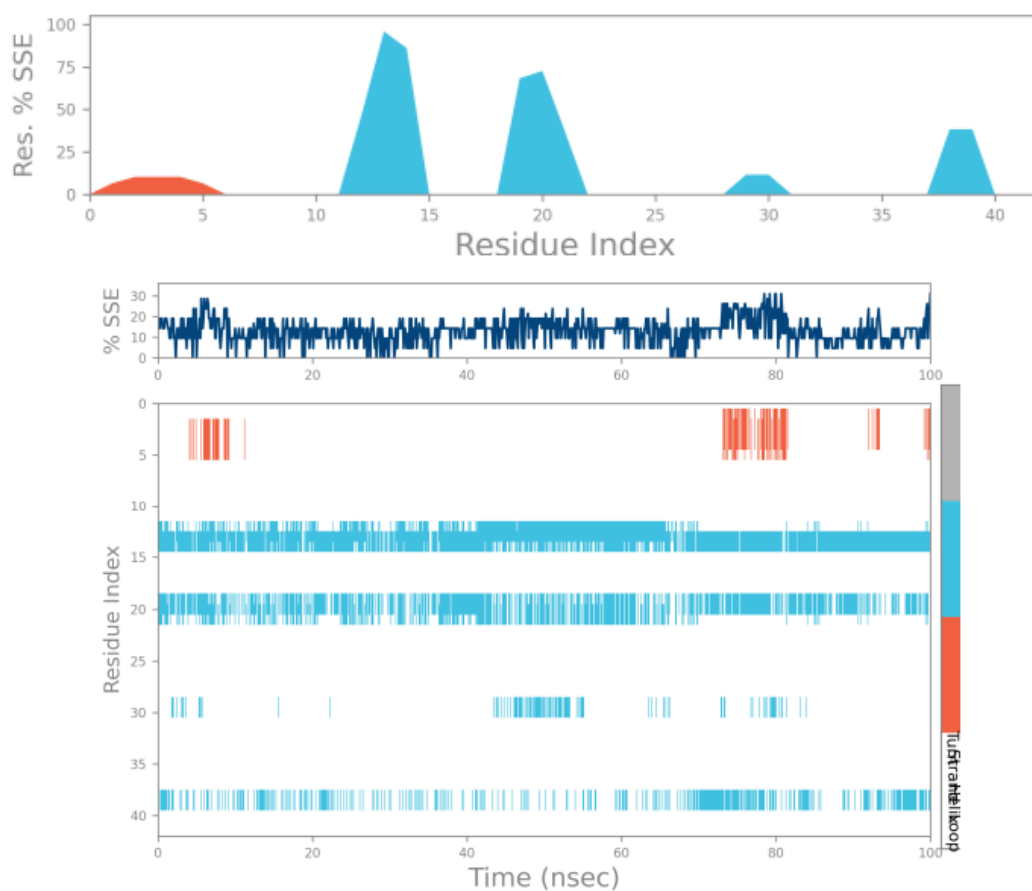


Рисунок В.4.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения В

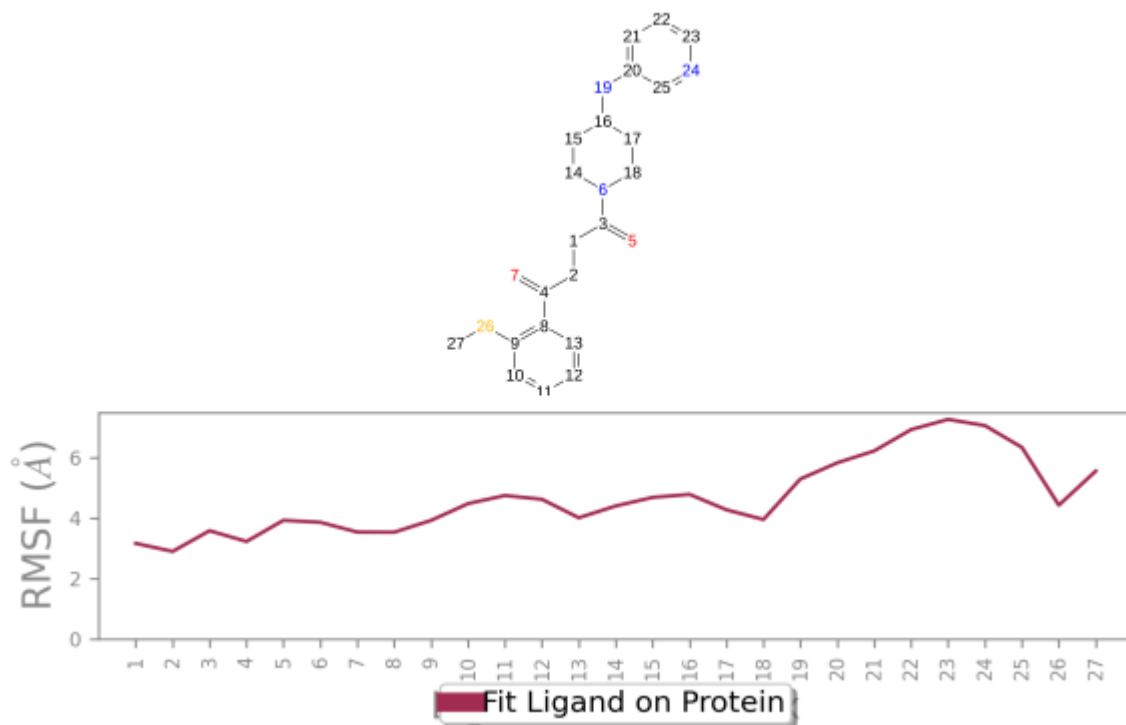


Рисунок В.4.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда

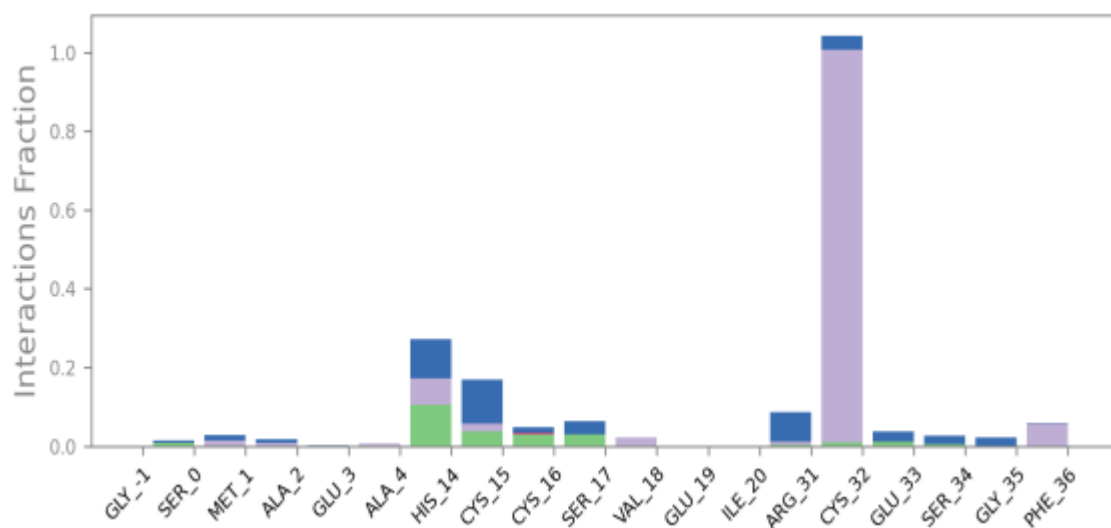


Рисунок В.4.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом

Продолжение Приложения В

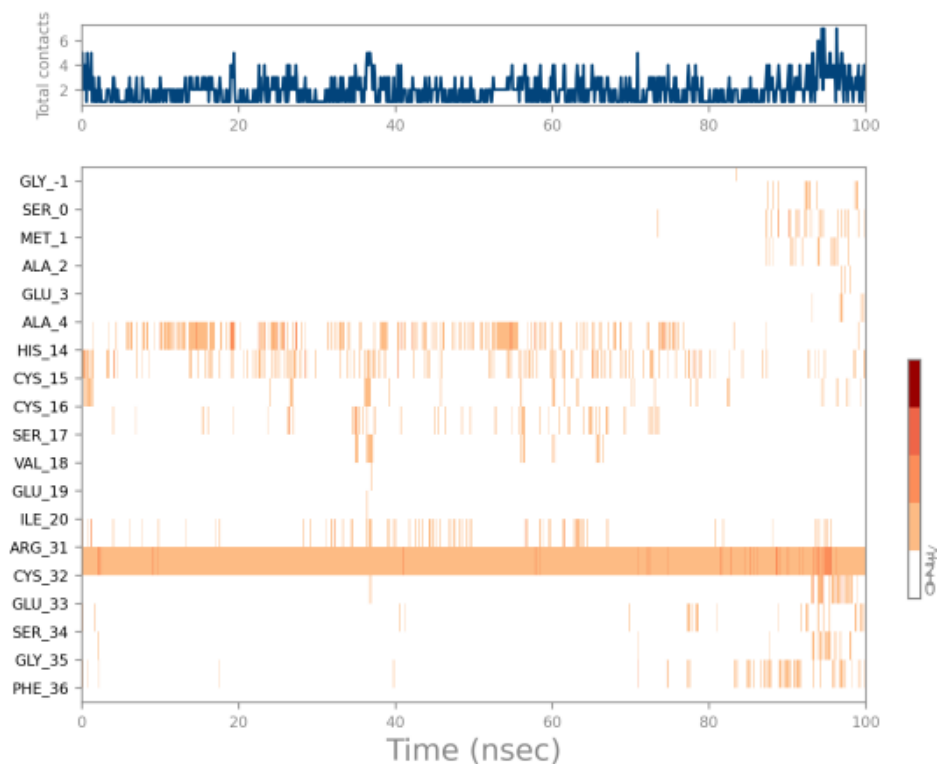


Рисунок В.4.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

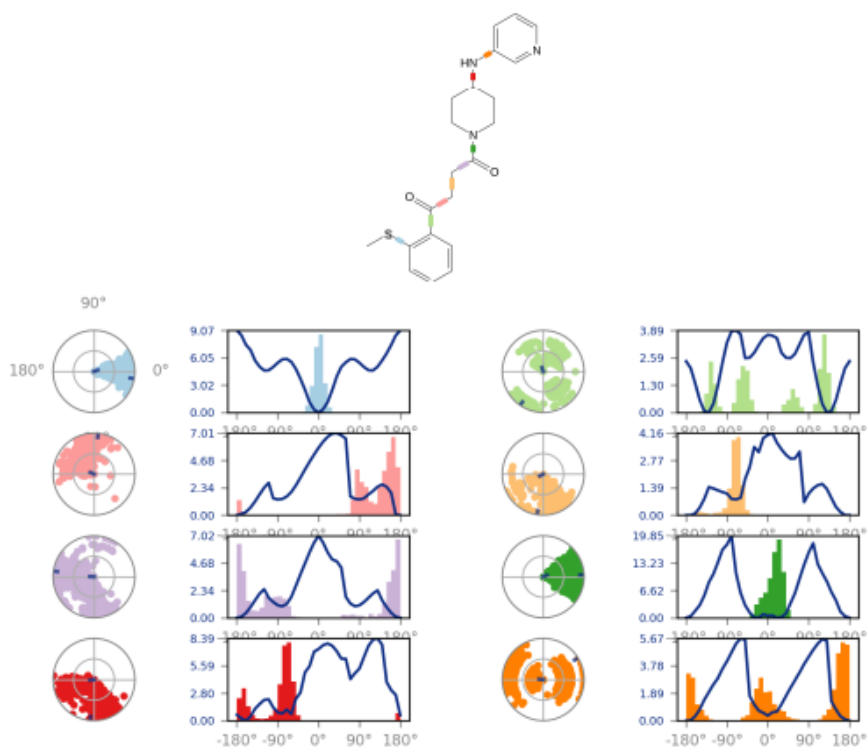


Рисунок В.4.9 – Торсионный профиль 33

Продолжение Приложения В



Рисунок В.4.10 – Свойства лиганда

Отчет В.5. Молекулярнодинамическая симуляция соединения 40

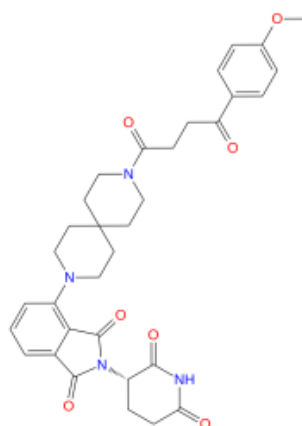


Рисунок В.5.1 – Структура 40

Продолжение Приложения В

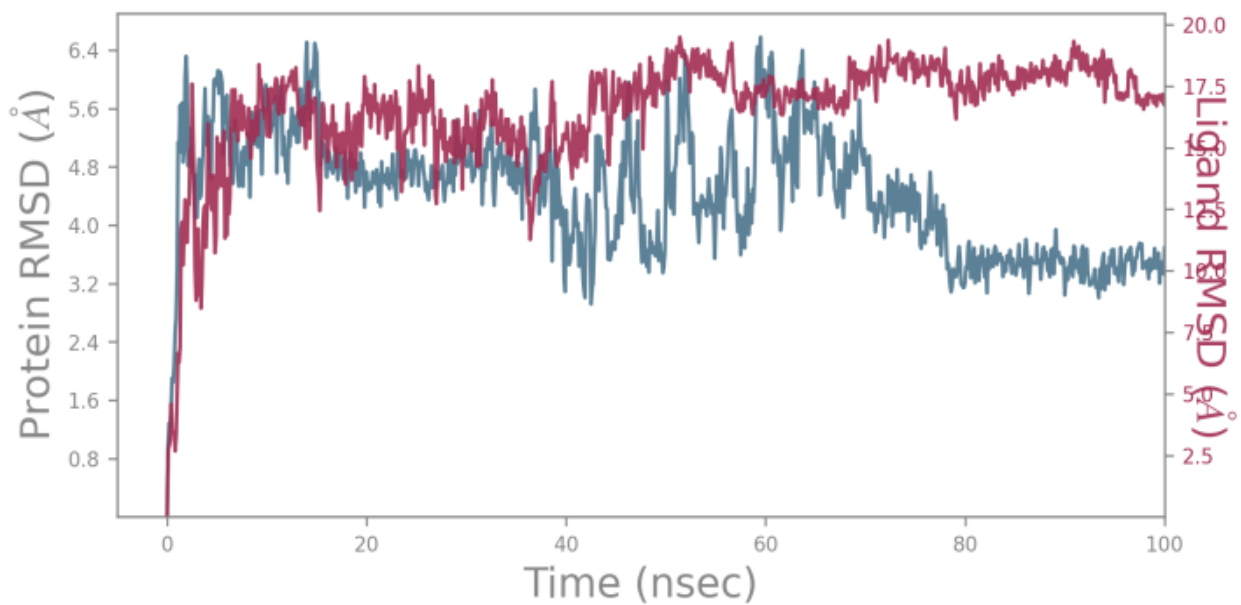


Рисунок В.5.2 – График зависимости RMSD

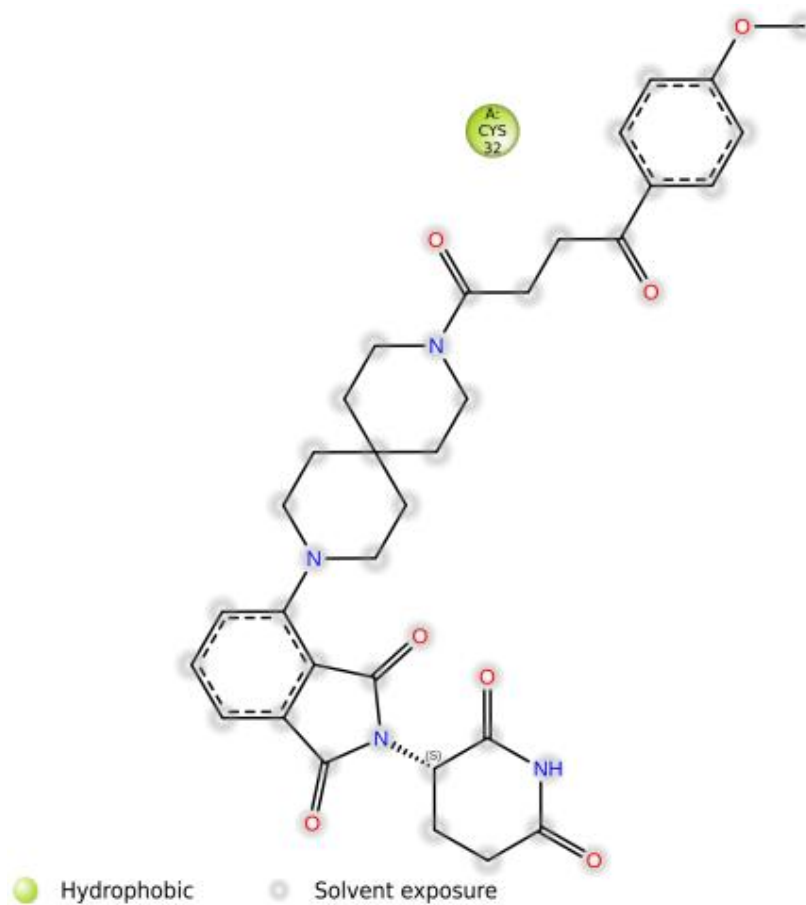


Рисунок В.5.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда с остатками белка

Продолжение Приложения В

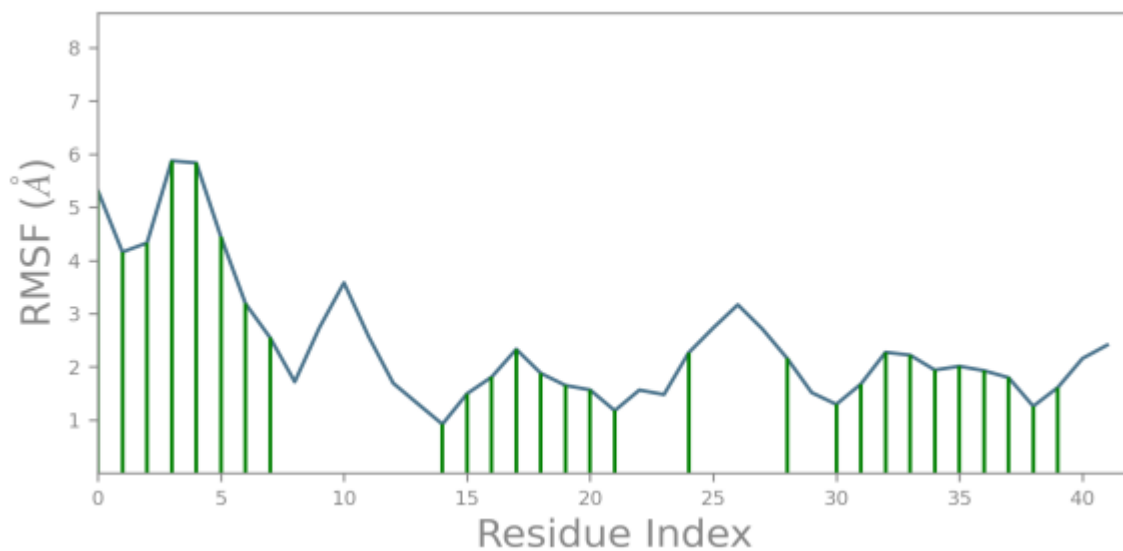


Рисунок В.5.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

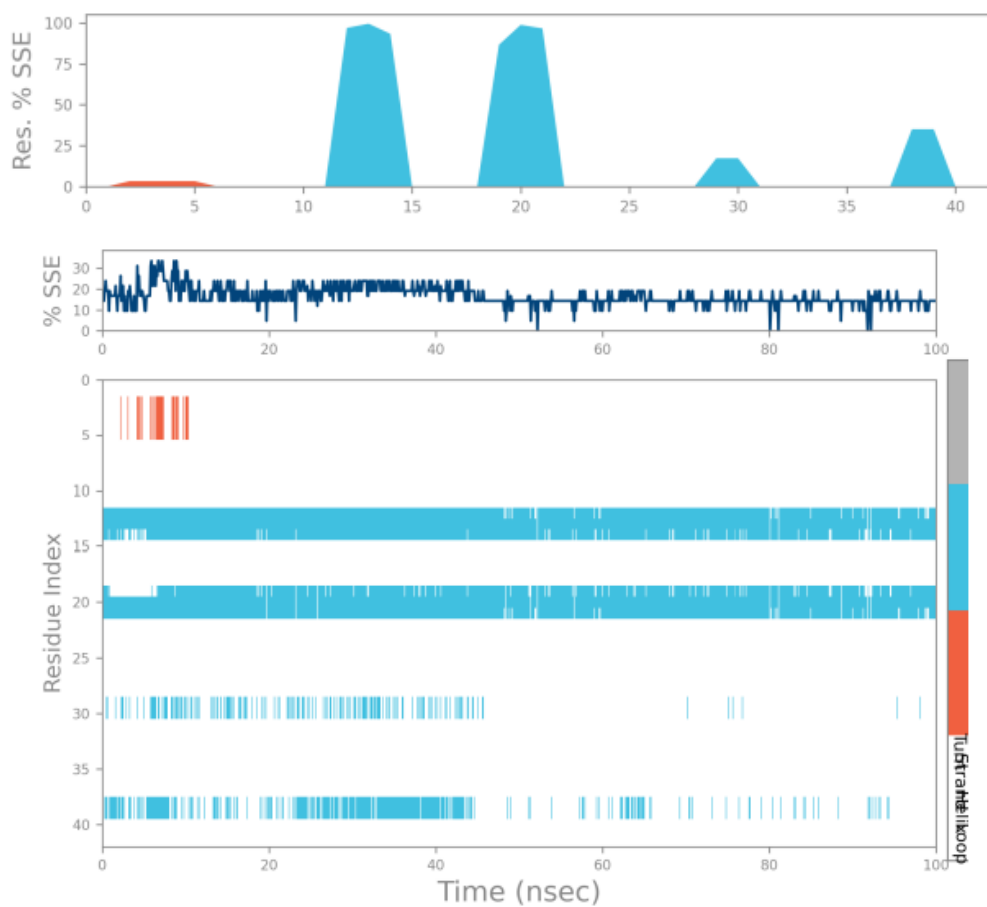


Рисунок В.5.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения В

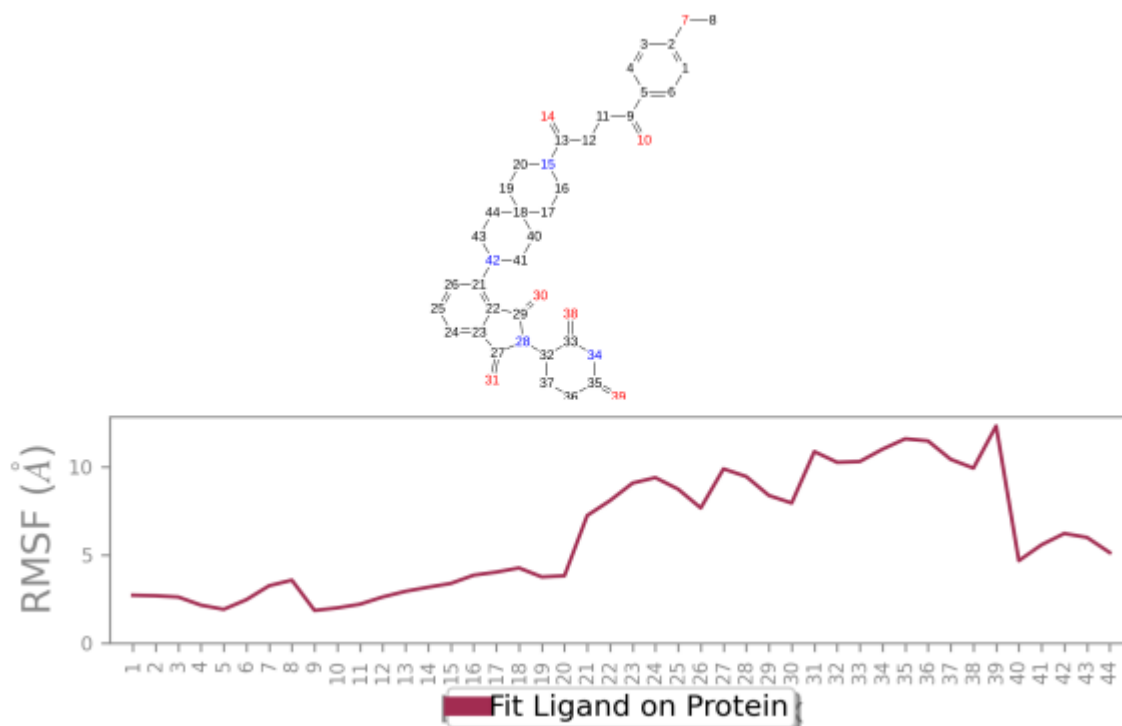


Рисунок В.5.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда

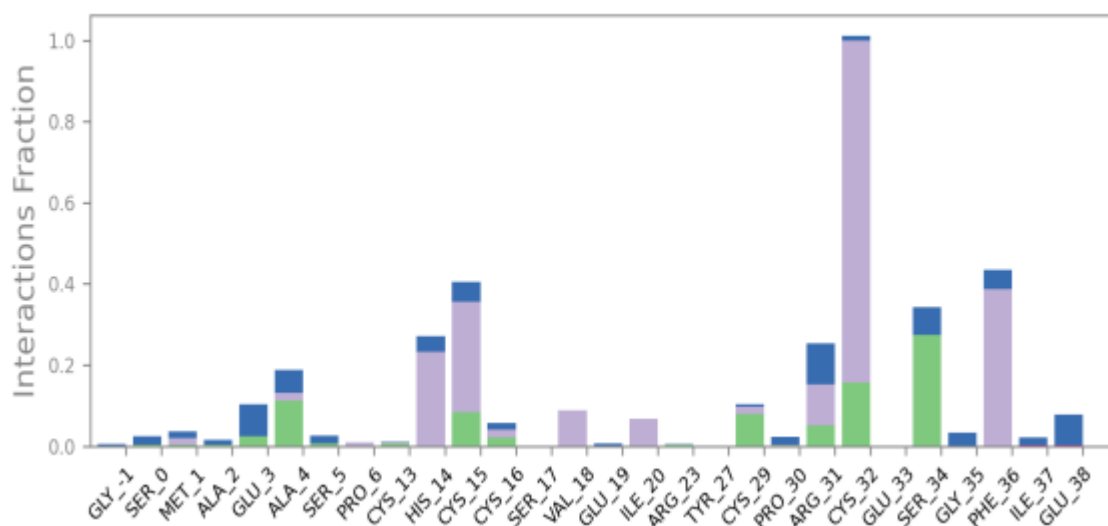


Рисунок В.5.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом

Продолжение Приложения В

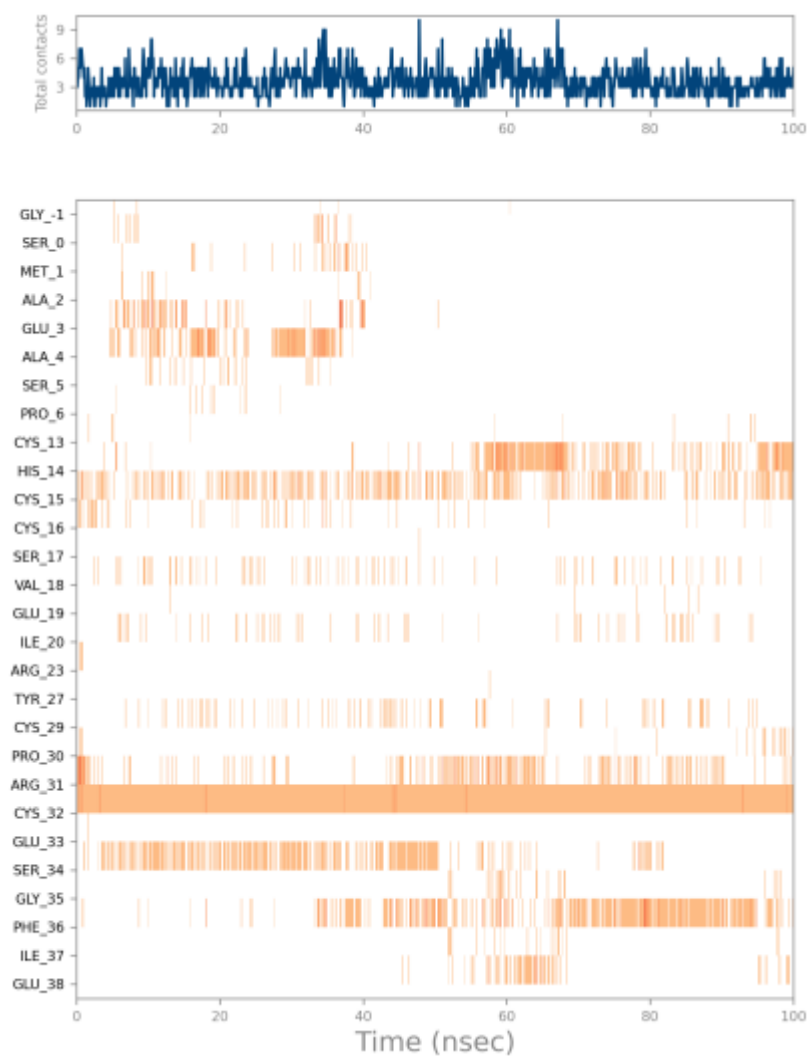


Рисунок В.5.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения В

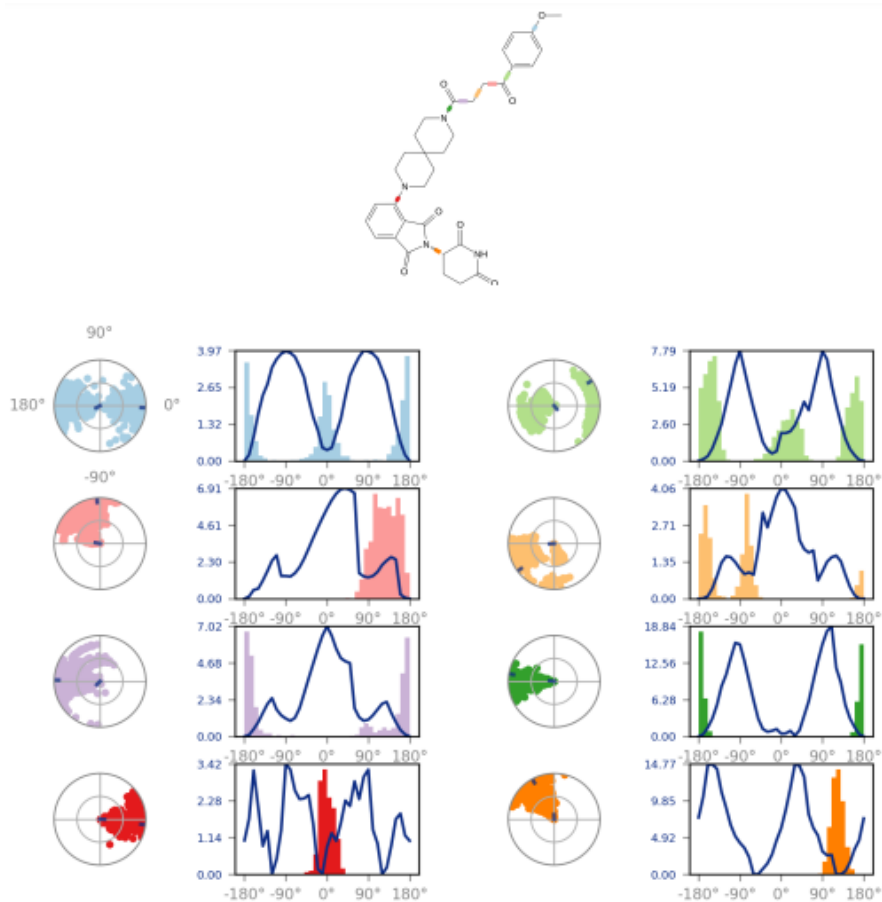


Рисунок В.5.9 – Торсионный профиль **40**



Рисунок В.5.10 – Свойства лиганда