Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Химический факультет

На правах рукописи

## Осолодкин Дмитрий Иванович

# Молекулярный дизайн потенциальных ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3

02.00.03 — Органическая химия 02.00.16 — Медицинская химия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник Палюлин В. А.

# Оглавление

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	8
1.1. Роль киназы гликогенсинтазы 3 в организме человека	8
1.2. Гомологи киназы гликогенсинтазы 3	12
1.3. Структура и регуляция киназы гликогенсинтазы 3	13
1.4. Ингибиторы киназы гликогенсинтазы 3	20
1.4.1. Конкурентные ингибиторы киназы гликогенсинтазы 3	23
1.4.2. Неконкурентные ингибиторы киназы гликогенсинтазы 3	33
1.5. Соотношения «структура-активность» для ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3.	35
1.6. Поиск ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3 с помощью виртуального скрининга	37
Глава 2. Поиск и дизайн конкурентных ингибиторов GSK-3	39
2.1. Выборка ингибиторов GSK-3. Представление ингибиторной активности	39
2.2. Консервативный виртуальный скрининг	40
2.2.1. Система консервативного виртуального скрининга	41
2.2.2. Построение системы виртуального скрининга	42
2.2.2.1. Выборки	42
2.2.2.2. Выбор структуры киназы для докинга	43
2.2.2.3. Фармакофорный поиск	46
2.2.2.4. Моделирование с помощью одноклассового классификатора	48
2.2.3. Валидация системы виртуального скрининга	49
2.2.3.1. Докинг: воспроизведение кристаллической структуры	49
2.2.3.2. Статистическая валидация систем виртуального скрининга	52
2.2.4. Виртуальный скрининг библиотеки ZINC	61
2.2.4.1. Библиотека соединений	61
2.2.4.2. Виртуальный скрининг методом докинга	62
2.2.4.3. Виртуальный скрининг по фармакофорной гипотезе	72
2.2.4.4. Виртуальный скрининг методом одноклассовой классификации	78
2.2.4.5. Перекрёстный виртуальный скрининг	80
2.3. Неконсервативный виртуальный скрининг	84
2.3.1. Поиск по наличию подструктуры	84
2.3.2. Фармакофорный поиск по электростатическому подобию	88
2.4. Количественные соотношения «пространственная структура — активность»	для

конкурентных ингибиторов GSK-3	90
2.4.1. Моделирование 3D-QSAR для серии алоизинов	91
2.4.2. Моделирование 3D-QSAR для серии индирубинов	93
2.4.3. Моделирование 3D-OSAR для серии малеимидов	95
2.4.4. Моделирование 3D-QSAR для серии пауллонов	98
2.4.5. Моделирование 3D-QSAR для серии N-фенил-4-пиразоло[1,5-b]пири	идазин-3-
илпиримидин-2-аминов	100
2.4.6. Прогноз активности на основе моделей 3D-QSAR	102
2.5. Дизайн ингибиторов GSK-3 de novo	103
Глава 3. Неконкурентные ингибиторы: анализ места связывания и виртуальный скрин	инг106
3.1. Методология исследования	106
3.2. Результаты моделирования	107
3.2.1. Поиск области связывания манзамина А на поверхности киназы	107
3.2.2. Конформационный анализ молекулы манзамина А	109
3.2.2.1. Конформационный анализ молекулы манзамина А	110
3.2.2.2. Конформационное поведение лиганда в комплексах	115
3.2.2.3. Поведение лиганда в водном растворе	116
3.2.3. Моделирование молекулярной динамики комплексов	117
3.2.3.1. Траектория молекулярной динамики апо-формы киназы	117
3.2.3.2. Траектория молекулярной динамики для области І	118
3.2.3.3. Траектория молекулярной динамики для области II	119
3.2.3.4. Траектория молекулярной динамики для области III	121
3.2.3.5. Траектория молекулярной динамики для области IV	122
3.2.4. Анализ корреляционных карт	123
3.2.5. Оценка энергии связывания	126
3.2.6. Ранжирование областей связывания	127
3.3. Виртуальный скрининг и дизайн неконкурентных ингибиторов	129
Глава 4. Киназа гликогенсинтазы 3 у паразитических организмов как мишень потени	циальных
антипаразитарных препаратов	136
4.1. Анализ аминокислотных последовательностей GSK-3	136
4.2. Моделирование пространственной структуры GSK-3 паразитов	141
4.3. Виртуальный скрининг и дизайн ингибиторов GSK-3 паразитов	149
4.3.1. Дизайн ингибиторов GSK-3 паразитов	150

4.3.1.1. Дизайн ингибитора GSK-3 Leishmania major	
4.3.1.2. Дизайн ингибитора GSK-3 Chaetomium globosum	151
4.3.1.3. Дизайн ингибитора GSK-3 Candida dubliniensis	151
4.3.2. Поиск потенциальных ингибиторов PfGSK-3 в библиотеке TCAMS	152
Глава 5. Методы исследования	
5.1. Методы исследования количественных соотношений «пространственная с	структура —
активность»	157
5.2. Виртуальный скрининг	158
5.2.1. Подготовка библиотек соединений	158
5.2.2. Подготовка к докингу и генерация предполагаемых структур	комплексов
ингибиторов и киназы	160
5.2.3. Валидация системы виртуального скрининга	161
5.2.4. Докинг библиотеки ZINC	164
5.2.5. Фармакофорный поиск	164
5.2.6. Одноклассовая классификация	165
5.2.7. Виртуальный скрининг по наличию подструктуры	166
5.2.8. Виртуальный скрининг по электростатическому подобию	166
5.3. Дизайн ингибиторов <i>de novo</i>	167
5.4. Анализ механизма неконкурентного ингибирования манзаминами	167
5.4.1. Молекулярный докинг	168
5.4.2. Анализ результатов докинга	
5.4.3. Моделирование молекулярной динамики	169
5.4.4. Конформационный поиск	170
5.4.5. Анализ результатов молекулярной динамики и конформационного по	аска171
5.4.6. Методология MM-PBSA	172
5.5. Биоинформационный анализ	173
5.5.1. Филогенетический анализ	173
5.5.2. Построение моделей структуры киназы	
Выводы	175
Список литературы	176

#### Введение

Одним из важнейших направлений современной химической науки является создание новых органических соединений, применимых в качестве лекарственных средств. Основной способ создания таких соединений заключается в идентификации интересующей исследователя биологической мишени или группы мишеней, после чего проводится поиск модуляторов этой мишени методами теоретической и экспериментальной медицинской химии.

Фосфорилирование белков — важнейший регуляторный механизм, использующийся в подавляющем большинстве клеточных сигнальных путей. Многие белки способны выполнять свою функцию лишь в определённом состоянии фосфорилирования, и нарушение этого механизма регуляции может приводить к различным патологиям. Протеинкиназы — семейство ферментов, осуществляющих реакцию фосфорилирования белковых субстратов, то есть перенос фосфатной группы от молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) к молекуле белка. При этом образуется сложноэфирная связь между фосфатной группой и боковой цепью аминокислотного остатка серина, треонина или тирозина. Тирозиновые киназы представляют собой отдельное подсемейство, а остальные киназы способны фосфорилировать как остатки серина, так и остатки треонина.

Дизайн ингибиторов протеинкиназ — бурно развивающаяся область современной медицинской химии. Толчком к развитию этого направления послужило внедрение в медицинскую практику иматиниба — ингибитора тирозиновой киназы BCR-ABL, ключевого фактора формирования хронического миелогенного лейкоза, которое произошло в США в 2001 году. Ингибирование протеинкиназ является наиболее эффективным способом их низкомолекулярной регуляции, поскольку активация киназы обычно осуществляется путём фосфорилирования или дефосфорилирования. Наиболее распространены ингибиторы киназ, конкурентные по отношению к АТФ, поскольку их дизайн наиболее прост и эффективен. Конструирование новых ингибиторов киназ стало одним из основных направлений развития медицинской химии первого десятилетия XXI века, поскольку в геноме человека имеется более 500 генов различных протеинкиназ, обладающих относительно высокой степенью консервативности. Как следствие, аналогичная методология может быть использована для создания ле-

5

карств, действующих на практически любой интересующий исследователя сигнальный путь.

Биологические мишени семейства протеинкиназ отличаются значительным функциональным разнообразием. Некоторые ферменты этого семейства отличаются высокой субстратной специфичностью, в то время как остальные представители могут участвовать в различных сигнальных путях и, как следствие, быть интересными мишенями при терапии различных заболеваний. Интерес для медицинской химии представляют оба варианта, поскольку в первом случае возможно создание чрезвычайно селективных лекарств, практически не обладающих побочным действием, а во втором случае нарушение одной из функций фермента может быть мало связано с другими его функциями. Как следствие, становится возможным создание универсальных лекарственных веществ, действующих на мишени, отвечающие различным заболеваниям, либо средств, действующих лишь в определённой области организма, связанной с конкретной патологией. Различные способы направленной доставки универсальных лекарств также могут быть использованы для борьбы с конкретными патологиями, опосредованными многофункциональными мишенями.

К числу важных многофункциональных биологических мишеней семейства протеинкиназ относится киназа гликогенсинтазы 3 (GSK-3). Она участвует во множестве сигнальных путей, опосредующих целый ряд расстройств: болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, диабет II типа, рак простаты, недифференцированный лейкоз, биполярные расстройства, униполярную депрессию, воспалительные процессы, гипертрофию сердца и др. Аналогичные киназы паразитов могут быть мишенями при борьбе с малярией, трипаносомозом и другими протозойными инфекциями.

В настоящее время единственным ингибитором GSK-3, разрешённым к применению в медицинской практике, является ион лития, однако его терапевтический индекс невысок; несколько других ингибиторов в настоящее время проходят клинические испытания. Несомненно актуальной проблемой остаётся молекулярный дизайн новых низкомолекулярных ингибиторов как человеческой GSK-3, так и аналогичных киназ паразитических организмов. Наличие таких малых молекул позволит создать высокоэффективные инновационные лекарственные средства.

6

Целью настоящей работы являлись дизайн и компьютерный поиск молекул, способных ингибировать GSK-3. В диссертационной работе рассмотрено как конкурентное, так и неконкурентное ингибирование и предложены молекулы, способные действовать по каждому из этих механизмов. Для конкурентных ингибиторов создана система виртуального скрининга, основанная на структурах фермента и известных ингибиторов и позволяющая получать статистически достоверные результаты. На основе обширных серий ингибиторов построены модели количественных соотношений «пространственная структура — активность» (3D-QSAR), позволяющие предсказывать величину ингибиторной активности для их новых аналогов. Вероятный механизм неконкурентного ингибирования был установлен путём моделирования молекулярной динамики комплекса фермента и неконкурентного ингибитора. Кроме того, был проведён биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей GSK-3 различных паразитических организмов, построены модели пространственной структуры этих белковых молекул и осуществлён дизайн ингибиторов для тех из них, которые имеют наиболее специфичные аминокислотные замены.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Роль киназы гликогенсинтазы 3 в организме человека

Киназа гликогенсинтазы 3 человека (glycogen synthase kinase 3, GSK-3) — это серин-треониновая протеинкиназа, которая была открыта при исследовании метаболизма гликогена [1]. Впоследствии выяснилось, что роль данного фермента не ограничивается фосфорилированием гликогенсинтазы: GSK-3 участвует в гиперфосфорилировании тау-белка [2] и формировании амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера [3], а также в фосфорилировании β-катенина [4], различных факторов транскрипции генов и множества других белковых субстратов [5]. Данная киназа обладает несколькими необычными свойствами: во-первых, она характеризуется конститутивной активностью и дезактивируется в ответ на определённые клеточные сигналы; вовторых, в большинстве случаев фосфорилирование с помощью GSK-3 приводит к ингибированию активности субстрата; наконец, эта киназа предпочтительно фосфорилирует предварительно фосфорилированные субстраты (см. ниже), вследствие чего может осуществлять многократное фосфорилирование по «эстафетному» механизму [5].

Существуют две изоформы киназы гликогенсинтазы 3 — GSK-3 $\alpha$  (51 кДа) и GSK-3 $\beta$  (47 кДа), — которые кодируются различными генами [6]. Идентичность аминокислотной последовательности изоформ составляет 98% для «киназного домена» (каталитической области);  $\alpha$ -изоформа отличается от  $\beta$ -изоформы наличием обширной вставки в N-концевой области, богатой остатками глицина [6]. Имеется также альтернативно сплайсированный вариант  $\beta$ -изоформы — изоформа  $\beta$ 2, содержащая вставку из 13 аминокислот в петле рядом с каталитическим доменом, функция которой неизвестна; экспрессия данного варианта коррелирует с дифференциацией нейронов [7, 8]. Обе изоформы в больших количествах экспрессируются в мозге, однако уровень экспрессии  $\alpha$ -изоформы в периферических органах выше, чем в мозге, в то время как для  $\beta$ -изоформы уровень экспрессии в мозге максимален по сравнению с другими тканями [7]. С возрастом у человека увеличивается экспрессия  $\beta$ -изоформы [7]. Большинство известных конкурентных ингибиторов GSK-3 неселективно по отношению к изоформам киназы [9].

Наиболее изучена роль GSK-3 в двух важнейших сигнальных путях: инсулиновом пути (рис. 1.1) и пути Wnt (рис. 1.2). Рассмотрим их подробнее.



Рис. 1. Схема инсулинового сигнального пути [10].

Нарушения функционирования инсулинового сигнального пути тесно связаны с формированием различных типов диабета. Активация инсулиновых рецепторов инсулином приводит к активации киназы Akt/PKB, которая, в свою очередь, фосфорилирует GSK-3 по остатку серина [11]. Этот процесс приводит к аутоингибированию киназы, активации гликогенсинтазы и синтезу гликогена, а также к активации эукариотического фактора инициации 2B (eIF2B) и синтезу белков. Как следствие, ингибирование GSK-3 приводит к активации синтеза гликогена и повышению чувствительности к инсулину [12], что делает ингибиторы данной киназы потенциальными лекарствами от диабета II типа, связанного с нарушением чувствительности к инсулину при нормальном уровне его выработки в организме больного [13]. В частности, эксперименты *in vivo* показали, что пероральное применение ингибиторов GSK-3 приводит к снижению уровня глюкозы в крови [14] и предотвращению прогресса заболевания [13].



Рис. 1.2. Схема сигнального пути Wnt [15].

В сигнальном пути Wnt киназа гликогенсинтазы 3 принимает участие в форме комплекса с белком APC (adenomatous polyposis coli), структурным белком аксином и  $\beta$ -катенином. Фосфорилирование  $\beta$ -катенина с помощью GSK-3 приводит к его разложению; таким образом киназа регулирует уровень, клеточную локализацию и функцию  $\beta$ -катенина. Активация сигнального пути Wnt, опосредованная рецепторами LRP 5/6 и Frizzled, приводит к селективному ингибированию GSK-3 в комплексе, накоплению  $\beta$ -катенина и перемещению его в ядро, где он активирует экспрессию генов, в том числе онкогенов *Cyclin D1, Myc* и *c-jun* [16]. Таким образом, в стандартном варианте пути Wnt ингибирование GSK-3 должно приводить к стабилизации белков-онкогенов. Тем не менее, в экспериментах по применению ингибиторов GSK-3 *in vivo* не наблюдалось формирования злокачественных опухолей [9]; более того, на клеточных линиях рака прямой кишки, простаты и поджелудочной железы было показано, что ингибирование GSK-3 может значительно тормозить рост и размножение раковых клеток [17, 18]. Вероятно, этот процесс связан с другими сигнальными путями, в которых принимает участие GSK-3.

Важную роль GSK-3 играет в сигнальных каскадах синаптической пластичности, связанных с обучением и памятью. Активация GSK-3 в этом каскаде производится протеинфосфатазой 1 (PP1) путём дефосфорилирования регуляторного остатка серина в N-концевой области, а также путём ингибирования киназы Akt [19]. Индукция долговременной потенциации (LTP) вызывает ингибирование GSK-3 [19]; активация GSK-3 приводит к ингибированию экспрессии белка SynI и, как следствие, ингибированию LTP и нарушению синаптической пластичности (рис. 1.3) [20]. При ингибировании GSK-3 не происходит индукции долговременной депрессии (LTD), опосредованной NMDA-рецепторами [19]. Активация GSK-3 в постсинаптическом пространстве приводит к более высокому уровню экспрессии субъединиц NMDA-рецепторов NR2A/B и белка PSD93 [21]. Детали механизма участия GSK-3 в регуляции синаптической пластичности в настоящее время изучены недостаточно полно.



Рис. 1.3. Предполагаемая схема связи GSK-3 и синаптической пластичности [20].

Нарушения функционирования GSK-3 в гиппокампе и других областях мозга тесно связаны с возникновением болезни Альцгеймера [22, 23]. Данная киназа непосредственно участвует в процессах гиперфосфорилирования тау-белка и синтеза амилоида  $\beta$  (А $\beta$ ), связана с нарушениями памяти (см. выше) и воспалительными реакциями при болезни Альцгеймера [22]. Гиперфосфорилирование тау-белка осуществляется обеими изоформами киназы и приводит к образованию нейрофибриллярных клубков — важных патогенетических факторов [22]; применение ингибиторов киназы *in vivo* и *in vitro* снижает степень фосфорилирования тау-белка. В формировании амилоидных бляшек участвует только  $\alpha$ -изоформа GSK-3 [3], в то время как  $\beta$ -изоформа преимущественно взаимодействует с пресенилином 1 (PS-1) [24]. Интересно, что активация инсулинового сигнального пути, приводящая к ингибированию GSK-3, оказывает благотворное влияние на когнитивные способности пациентов с болезнью Альцгеймера. Одним из вариантов такой активации может быть назальный ввод инсулина [22]. Киназа гликогенсинтазы 3 также регулирует воспалительные процессы и клеточную миграцию [16]. Активность GSK-3 необходима для синтеза таких провоспалительных цитокинов, как интерлейкин 6, интерлейкин 1β, фактор некроза опухоли (ФНО), а также для ингибирования синтеза противовоспалительного интерлейкина 10. Синтез воспалительных цитокинов индуцируется толл-подобными рецепторами. Ингибирование GSK-3 приводит к ингибированию экспрессии провоспалительных интерлейкинов, индуцированной фактором транскрипции NF-кВ. При испытаниях *in vivo* было обнаружено, что ингибирование GSK-3 приводит к ослаблению воспалительных реакций при таких заболеваниях, как колит, артрит и перитонит [16].

Ингибиторы GSK-3 могут обладать кардиопротекторным действием [25, 26]. Мишенью этого действия могут быть как хорошо известные сигнальные пути — Wnt и инсулиновый, — так и mPTP (mitochondrial permeability transition pore), канал на внутренней мембране митохондрий, открытие которого подавляется при ингибировании GSK-3β [27].

Имеются косвенные сведения, позволяющие предположить наличие потенциальной эффективности ингибиторов GSK-3 в качестве средств подавления биполярных расстройств [28]. В частности, применение многих антидепрессантов либо средств против мании приводит к изменению активности данной киназы. Особенно эффективной может оказаться терапия маниакальных состояний с помощью ингибиторов GSK-3, поскольку ингибирование киназы приводит к уменьшению локомоторной активности, индуцированной дофамином [29]. Важно заметить, что поскольку нарушения функционирования GSK-3 не являются причиной биполярных расстройств, то её ингибиторы могут быть использованы лишь в качестве симптоматической терапии [28].

#### 1.2. Гомологи киназы гликогенсинтазы 3

Гомологи киназы гликогенсинтазы 3 имеются у всех эукариотических организмов [30]. Число изоформ GSK-3 варьирует от одной (у паразитов группы простейших) до пяти у *Saccharomyces cerevisiae* [31] и до пятнадцати у Drosophila melanogaster [32]. Особый интерес представляют гомологи этой киназы у паразитических организмов, поскольку она является важнейшим участником сигнального пути Wnt, отвечающего за развитие организма. Идентичность аминокислотных последовательностей GSK-3

12

человека и паразитов составляет не менее 40%, что позволяет, с одной стороны, строить весьма надёжные модели трёхмерной структуры киназ паразитов на основе структуры киназы человека, а с другой стороны, надеяться на создание селективных ингибиторов этих ферментов, которые могут служить лекарствами от заболеваний, вызываемых данными паразитами.

К настоящему времени относительно подробно изучены GSK-3 *Plasmodium falciparum*, вызывающего малярию [33], *Trypanosoma brucei*, вызывающей сонную болезнь [34], *Leishmania donovani* [35], вызывающей лейшманиаз, *Toxoplasma gondii* [36], вызывающей токсоплазмоз, а также клещей *Rhipicephalus (Boophilus) microplus,* переносящих заболевания сельскохозяйственных животных [37, 38]. Было показано, что индирубины (см. раздел 1.4.1) являются эффективными ингибиторами GSK-3 как человека, так и всех вышеперечисленных организмов, в то время как пауллоны (см. там же) более эффективно ингибируют GSK-3 человека.

Пространственная структура GSK-3 подавляющего большинства паразитов неизвестна. Ранее проводилось моделирование и подробный анализ структуры GSK-3 P. falciparum [39, 40]; в [33-35] цель моделирования состояла лишь в том, чтобы предингибитора. ложить возможный способ связывания Модель структуры GSK-3/SHAGGY-подобной киназы Arabidopsis thaliana была изучена методом молекулярной динамики [41], однако данное исследование имеет ограниченное значение для разработки новых антипаразитарных средств. Структура GSK-3 L. major (код доступа в банке данных PDB [42] 3E3P [43]) была опубликована 30 декабря 2010 года, когда данная диссертационная работа была завершена и подготовлена к печати; в данной структуре разупорядочена глициновая петля, что не позволяет проводить какойлибо анализ селективности или возможных способов связывания без моделирования недостающего фрагмента.

#### 1.3. Структура и регуляция киназы гликогенсинтазы 3

По состоянию на октябрь 2009 года в базе данных PDB имелись 23 структуры киназы гликогенсинтазы 3 в комплексе с различными молекулами, определённых методом рентгеноструктурного анализа. Краткая информация об этих структурах приведена в таблице 1.1.

Код доступа	Лиганд	Разрешение	pTyr216	Ссылка
1GNG	FRATtide	2.6 Å	+	[44]
109U	Axin	2.4 Å	+	[45]
1H8F	HEPES	2.8 Å		[46]
1109		2.7 Å		[47]
1J1B	$H_{2^{N}} \xrightarrow{N} \xrightarrow{N} \xrightarrow{N} \xrightarrow{N} \xrightarrow{N} \xrightarrow{N} \xrightarrow{N} $	1.8 Å		[48]
1J1C	$HO_{HO,HINT, V, V,$	2.1 Å		[48]
1PYX	AMP-PNP (1)	2.4 Å		[49]
1Q3D	ставроспорин ( <b>3</b> )	2.2 Å		[49]
1Q3W	альстерпауллон ( <b>4</b> )	2.3 Å		[49]
1Q41		2.1 Å		[49]

Таблица 1.1. Структуры GSK-3 в базе PDB.

Код доступа	Лиганд	Разрешение	pTyr216	Ссылка		
1Q4L	сі ў нн ны сі сі сі сі сі I-5 (6)	2.77 Å I-5 (6)				
1Q5K	о= <sub>N</sub> + S N H H H H C H C H G C H G C H G C H G C H G C H G C H G C H G C H G C H G C C C H G C C C C H G C C C H G C C C C C C C C C C C C C	1.94 Å		[50]		
1R0E		2.25 Å		[51]		
1UV5	он ни ни вr 6-ВІО (9)	2.8 Å		[52]		
2JLD	$(R_{\rm Ru})-\rm NP549 (10)$	2.35 Å		[53]		
205K	$\xrightarrow{H_3C} \stackrel{0}{\underset{O}{\overset{  }{\underset{O}{\overset{O}{\underset{NH}{\underset{NH}{\overset{O}{\underset{NH}{\overset{O}{\underset{NH}{\overset{O}{\underset{NH}{\underset{N}{\overset{O}{\underset{NH}{\underset{N}{\underset{NH}{\underset{N}{\underset{NH}{\underset{NH}{\underset{N}{N$	3.2 Å		[54]		

Код доступа	Лиганд	Разрешение	pTyr216	Ссылка	
20W3		2.8 Å	+	[55]	
3DU8	N H <sub>2</sub> N H <sub>2</sub> N F	2.2 Å		[56]	
	NMS-869553A (13)				
3F7Z		2.4 Å	+	[57]	
3F88		2.60 Å	+	[58]	
3GB2	H <sub>3</sub> CW <sup>10-5</sup> 16	2.40 Å	+	[58]	
3I4B		2.3 Å		[59]	
3L1S	сі н н о сі сі сі н о сі сі сі сі сі сі сі сі сі сі	2.90 Å		[60]	

Молекула GSK-3 подразделяется на три домена: N-концевой домен (остатки 1– 35), содержащий сайт ингибиторного фосфорилирования, каталитический домен (остатки 36–390) и C-концевой домен (остатки 391–420), функции которого неясны. При рентгеноструктурном исследовании киназы N- и C-концевые домены обычно не упорядочены. Белковая цепь каталитического домена уложена традиционным для киназ образом (рис. 1.4): в ней можно выделить малую (сложена преимущественно из β-листов) и большую (сложена преимущественно из α-спиралей) доли, между которыми находится место связывания АТФ. Пуриновая группа АТФ взаимодействует с так называемым «шарниром» — участком полипептидной цепи, соединяющим большую и малую доли киназы [48]. Поскольку это взаимодействие опосредовано донорами и акцепторами водородной связи, расположенными в основной цепи белка, оно остаётся практически неизменным для всех ферментов, относящихся к семейству киназ. Селективность конкурентных с АТФ ингибиторов киназ определяется взаимодействиями с боковыми цепями аминокислотных остатков, лежащих рядом с местом связывания АТФ.



Рис. 1.4. Строение каталитического домена (остатки 36–388) GSK-3β (структура 1J1С). А) общий вид комплекса GSK-3–АДФ–Мg<sup>2+</sup> (GSK-3 окрашена согласно вторичной структуре; АДФ — шаростержневая модель, окрашенная по типам атомов; ион магния изображён в виде шарика).Б) обозначены глициновая петля (жёлтый), Спетля (красный), шарнир (салатовый), активационная петля (пурпурный), остатки Агg96, Arg180, Lys 205 в виде стержневых моделей.

Важной особенностью киназы гликогенсинтазы 3 является предпочтительное фосфорилирование субстратов, содержащих аминокислотную последовательность

(S/T)XXX[(S/T)P], где (S/T) — остаток серина или треонина, Х — любой аминокислотный остаток, а [(S/T)P] — предварительно фосфорилированный (чаще всего казеинкиназой II) остаток серина или треонина [61]. Фосфорилирование тау-белка осуществляется также при отсутствии предварительного фосфорилирования, хотя и с меньшей эффективностью [62]. Ключевую роль в распознавании предварительно фосфорилированных субстратов играет аминокислотный остаток Arg96<sup>1</sup> и расположенные рядом с ним остатки Arg180 и Lys205 (рис. 1.4) [63, 44]. Этот сайт также играет важную роль в ингибировании активности киназы, поскольку именно с ним взаимодействует регуляторный остаток Ser9 (Ser21 в GSK-3а), фосфорилирование которого протеинкиназой В (РКВ) приводит к аутоингибированию GSK-3 (рис. 1.5) [63, 11]. Кроме Ser9, заметную структурную роль в аутоингибировании играют остатки Arg4 и Arg6, которые взаимодействуют с остатками Gln89, Asn95 и Asp181, дополнительно стабилизируя неактивную форму киназы [64]. Вещества, взаимодействующие с данной областью киназы, могут быть весьма селективными неконкурентными ингибиторами; предполагается, что ингибиторы ряда TDZD связываются в пространстве между глициновой петлёй, С-петлёй и активационной петлёй [65].



**Рис. 1.5.** А) Слева: принципиальная схема аутоингибирования GSK-3 [46]. Б) результаты докинга псевдосубстрата (3-GRPRTT[pS]A-11), соответствующего последовательности N-концевого домена [64].

Другой важнейший способ регулирования ферментативной активности GSK-3 состоит в изменении состояния фосфорилирования аминокислотного остатка Tyr216, расположенного в активационной петле. В активированном состоянии остаток Tyr216 фосфорилирован (например, киназой ZAK1 [46]), повёрнут в сторону от сайта распознавания субстрата (рис. 1.6А, рис. 1.5Б) [44] и зафиксирован солевыми мостиками с

<sup>1</sup> Здесь и в дальнейшем используется нумерация аминокислот β-изоформы, если не указано иное.

остатками Arg220 и Arg223 [45]. В случае, если этот аминокислотный остаток не фосфорилирован, он повёрнут в противоположную сторону и затрудняет доступ к сайту распознавания [46]. Следует отметить, что при фосфорилировании Туr216 достигается лишь двукратное увеличение киназной активности фермента [46]; для фосфорилирования некоторых субстратов активация киназы не является необходимым условием. Считается, что фосфорилирование Туr216 происходит по механизму аутофосфорилирования [66].



**Рис. 1.6. Конформация остатка pTyr216** (структура 1GNG (А); зелёным цветом обозначен пептид FRATtide) и **Tyr216** (структура 3DU8 (Б)).

В 2008 году было обнаружено, что при фосфорилировании остатка Thr390 МАР-киназой p38 (p38 MAPK) каталитическая активность GSK-3β исчезает [67]. Пептид, содержащий фосфорилированный остаток pThr390, ингибирует GSK-3 примерно с той же эффективностью, что и пептид, содержащий pSer9 [67]. Подробное исследование молекулярного механизма такого ингибирования не проводилось.

В большой доле киназы расположен сайт взаимодействия с аксином [45] и FRAT [44]. Комплекс киназы с аксином, APC и β-катенином участвует в сигнальном пути Wnt, а белок FRAT может выступать в роли ингибитора образования этого комплекса. Эти белки связываются с киназой в относительной близости от активационной петли (рис. 1.6Б, рис. 1.7). Взаимодействие с аксином не влияет на каталитическую активность фермента, поэтому вещества, селективно ингибирующие взаимодействие киназы с аксином, могут быть использованы в качестве модуляторов сигнального пути Wnt, не влияющих на другие сигнальные пути [45].



**Рис. 1.7.** А) комплекс GSK-3–FRATtide (1GNG). Б) комплекс GSK-3–аксин. Поверхность киназы окрашена с учётом гидрофобности.

#### 1.4. Ингибиторы киназы гликогенсинтазы 3

Ингибиторы GSK-3 могут быть использованы для лечения различных заболеваний, среди которых диабет II типа [16, 68], болезнь Альцгеймера [2] и другие нейродегенеративные расстройства [68], расстройства настроения (биполярные расстройства и униполярная депрессия) [16], различные заболевания почек [69], воспалительные процессы [16], рак простаты [70], недифференцированный лейкоз [71], расстройства сна и суточных ритмов [68] и т. д.

Первым известным ингибитором GSK-3 был ион лития [13]. Его применение для лечения биполярных расстройств началось ещё в XIX веке, однако механизм действия оставался невыясненным до 1996 года, когда Стамболик с сотр. обнаружили, что литий специфично ингибирует GSK-3 [72]. Ингибирование осуществляется путём конкуренции с ионом магния, необходимым для осуществления каталитической реакции [73]. Относительно высокая ингибирующая концентрация (порядка 1 мМ) и наличие побочных эффектов делают литий неприменимым для борьбы с такими заболеваниями, как диабет и болезнь Альцгеймера, поэтому были начаты исследования по поиску новых, более эффективных ингибиторов GSK-3.

Многие ингибиторы GSK-3 изначально были открыты как ингибиторы циклинзависимых киназ (CDK1–9), поскольку их широкомасштабное исследование началось несколько раньше — приблизительно во второй половине 90-х годов XX века. С 2001 года ведётся исследование ингибиторов CDK в качестве потенциальных ингибиторов GSK-3 [74]; ингибиторная активность многих соединений по отношению к CDK и GSK-3 имеет сравнимую величину. Целью данного обзора является не рассмотрение всех известных к настоящему времени классов соединений, ингибирующих GSK-3, а перечисление наиболее характерных из них, относящихся к наиболее обширным классам или обладающих специфичными свойствами.

К настоящему времени известны предварительные результаты доклинических испытаний некоторых ингибиторов, которые приведены в табл. 1.2.

Название	Разработчик	Mexa	Активность іп	Активность in	Дополнительная	Ссылка
		-низм	VIIIO	Показания	информация	
CT20026 (17)	Chiron	к	$IC_{50} = 4 HM (\beta)$	Диабет		[13]
CT118637	Chiron	к	К <sub>I</sub> < 10 нМ (β)	Диабет		[76]
CHIR025	Chiron	к	$IC_{50} = 27$ нМ ( $\beta$ )	Диабет		[77]
CHIR911 (CT99021) ( <b>18</b> )	Chiron	К	IC <sub>50</sub> = 5 HM (β)	Диабет, репопуляция стволовых клеток		[78, 79]
L803-mts ( <b>19</b> )	Тель-Авивский университет	н/к	$IC_{50} = 40$ мкМ ( $\beta$ )	Диабет		[80]
TDZD-8 ( <b>20</b> )	Noscira	н/к	$IC_{50} = 2 \text{ мкМ} (\beta)$	Воспаление		[18]
NP-12	Noscira	н/к		Болезнь Альцгеймера	II фаза	[81]
NP031115	Noscira	н/к	$IC_{50} = 4$ мкМ ( $\beta$ )	Антидепрессант		[82]
SB216763 ( <b>21</b> )	GSK	к	IC <sub>50</sub> = 34 HM (α)	Кардиопротектор		[83]
SB416763 ( <b>22</b> )	GSK	К	IC <sub>50</sub> = 77 HM (α)	Воспаление прямой кишки		[84]
DG-770 (23)	DeveloGen	к	$IC_{50} = 8 HM$	Диабет		[85]
603281-31-8 ( <b>24</b> )	Eli Lilly	К	IC <sub>50</sub> = 1.3 HM (β)	Остеопороз, диабет		[86]
AR-A014418 (7)	AstraZeneca	к	IC <sub>50</sub> = 100 HM (β)	Болезнь Альцгеймера		[87]

**Таблица 1.2.** Результаты доклинических испытаний ингибиторов GSK-3 [18, 75]. Перечислены только соединения, для которых известно название.

Название	Разработчик	Меха -низм	Активность in vitro	Активность <i>in vivo/</i> Показания	Дополнительная информация	Ссылка
AZD-1080	AstraZeneca			Болезнь Альцгеймера	Разработка прекращена	[75]
UDA-680	Sanofi- Aventis			Диабет, болезнь Альцгеймера	Разработка прекращена	[75]
XD-4241	Xcellsyz			Болезнь Альц- геймера, рак	Разработка прекращена	[75]
NNC-57-0558 ( <b>25</b> )	NovoNordisk			Диабет	Разработка прекращена	[75]
3544	Roche			Остеопороз		[75]
Compound A (26)	Takeda		$IC_{50} = 2.3 \text{ HM} (\alpha)$ $IC_{50} = 2.0 \text{ HM} (\beta)$	Болезнь Альцгеймера		[88]







Большинство известных на сегодняшний день ингибиторов GSK-3 относятся к группе конкурентных ингибиторов и взаимодействуют с консервативной областью связывания АТФ [75], вследствие чего зачастую не отличаются высокой селективностью как по отношению к близкородственным киназам, так и к менее родственным. Этих недостатков лишены неконкурентные ингибиторы, взаимодействующие с другими, более специфичными областями поверхности белка [89, 18].

#### 1.4.1. Конкурентные ингибиторы киназы гликогенсинтазы 3

Одним из первых известных конкурентных ингибиторов GSK-3 является ставроспорин (3) — сложный полициклический алкалоид, инигибирующий около сотни различных киназ. Изначально было обнаружено [90], что он и его аналоги — бисиндолилмалеимиды (27) — являются ингибиторами протеинкиназы С (РКС), а впоследствии аналогичные свойства были обнаружены и по отношению к GSK-3 [91]. Бисарилмалеимиды и родственные им анилиномалеимиды представляют собой весьма широко исследованную группу соединений; ингибиторная активность на нано- или микромолярном уровне по отношению к GSK-3 имеется не менее чем у трёхсот из них [55, 86, 92-104]. В качестве примеров можно привести упомянутые выше соединения 6, 8, 12, 21, 22, 24. В основе синтеза данных соединений лежит идея о том, чтобы симметризовать имидную группировку ставроспорина путём формального добавления кетогруппы и избежать необходимости синтеза сложного алифатического фрагмента. Стоит отметить, что наиболее очевидные плоские аналоги ставроспорина — индолокарбазолы (28) [105] и нафтокарбазолы (29) [106] — проявляют противораковую активность в первую очередь за счёт интеркаляции в ДНК и взаимодействия с циклинзависимыми киназами.



Способы связывания ставроспорина и его аналогов (бисарилмалеимидов) с GSK-3 относительно похожи, несмотря на заметные конформационные различия в ароматических фрагментах: в то время как ароматический фрагмент ставроспорина плоский, ациклические и макроциклические бисарилмалеимиды заметно неплоские (рис. 1.8). Тем не менее, результаты рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о наличии водородных связей между Asp133 и имидным атомом азота, а также между Val135 и амидным кислородом как для ставроспорина, так и для макроциклического бисарилмалеимида, а также для ациклических малеимидов (на рис. не показаны).



**Рис. 1.8.** А) Взаимодействие ставроспорина с областью шарнира (структура 1Q3D). Б) Взаимодействие **12** с областью шарнира (структура 2OW3).

Другим примером ингибиторов GSK-3 — аналогов ставроспорина являются полусэндвичевые комплексы платины и рутения (например, **10**) [107-114], разработанные в университете Пенсильвании. В данных структурах алициклический фрагмент ставроспорина заменён на атом рутения, связанный с атомами азота ароматического фрагмента молекулы координационными связями. Координационная сфера атома рутения насыщена молекулой СО и призводным циклопентадиенила. Способ связывания данных соединений полностью аналогичен описанному выше способу связывания других аналогов ставроспорина [109]. Особо следует отметить чрезвычайно высокую аффинность **10** и подобных соединений к GSK-3: IC<sub>50</sub> для **10** составляет менее 40 пМ [109].

Ещё одно соединение, содержащее малеимидную группировку и ингибирующее GSK-3, 3F8 (5-этил-7,8-диэтокси-1*H*-пирроло[3,4-*c*]изохинолин-1,3-(2*H*)-дион), было идентифицировано при скрининге библиотеки из 4000 соединений DIVERSet<sup>™</sup>, отобранной на основе трёхмерных фармакофоров [115]. Данное соединение активирует сигнальный путь Wnt в рыбках *Danio rerio*, ингибируя киназу гликогенсинтазы 3. Степень ингибирования составляет 91% в концентрации 5 мкМ.

Другой класс ингибиторов GSK-3 был обнаружен при исследовании средства традиционной китайской медицины «Даньгуй Лунхой Вань», которое представляет собой смесь 11 травяных экстрактов и применяется в качестве лекарства от хронического миелогенного лейкоза. При анализе компо-



нентов смеси было доказано, что действующим веществом в данном случае является индирубин (**30**), содержащийся в качестве примеси в природном индиго растительного происхождения «Цин Дай» [116]. Впоследствии выяснилось, что индирубин и его аналоги являются также ингибиторами GSK-3 $\beta$  [74]. Было обнаружено, что наибольшей ингибиторной активностью обладают индирубин-3'-моноксим (**5**) и 6-броминдирубин-3'-моноксим (6-BIO, **9**). Всего синтезировано порядка ста ингибиторов GSK-3 индирубинового ряда с IC<sub>50</sub> порядка 1÷1000 нМ; прочие индигоиды (производные индиго, изоиндиго и изатина) обладают активностью на субмиллимолярном уровне или неактивны [74, 52, 117-122]. Индирубины могут быть использованы в качестве ингибиторов GSK-3 *L. donovani* — потенциальных средств для борьбы с лейшманиозом [35].

Способ связывания соединений индирубинового ряда с киназой изображён на рис. 1.9. Важно отметить наличие трёх водородных связей с остатками шарнирного фрагмента, а также гидрофобные взаимодествия с остатком-«гейткипером» (gatekee-per) Leu132.



Рис. 1.9. Способ связывания индирубин-3'-моноксима с GSK-3β (структура 1Q41).

Различные морские организмы синтезируют значительное количество структурно разнообразных органических соединений. В последнее время довольно популярным методом поиска новых биологически активных соединений является скрининг смесей веществ, выделяемых из морских организмов, их разделение и идентификация активных компонентов [123, 124]. В качестве примера таких соединений можно привести меридианины, выделенные из асцидий Aplidium meridianum [125]. Самым активным из них по отношению к GSK-3β является меридианин В (31), IC<sub>50</sub> которого составляет 0.5 мкМ. Эти соединения не отличаются высокой селективностью по отношению к циклин-зависимым киназам в первую очередь из-за своего небольшого размера по сравнению с областью связывания [125]; той же причиной, скорее всего, объясняется их относительно невысокая активность. Определённым структурным родством и сходными биологическими свойствами обладает другой алкалоид, вариолин В (32), выделенный из губок Kirkpatrickia variolosa [126]. На основе этих классов соединений были предложены заметно более активные «смешанные» аналоги — мериолины (33) [127], активность которых по отношению к циклин-зависимым киназам несколько выше, чем по отношению к GSK-3, и другие соединения [128].



Другим примером интересных морских алкалоидов могут служить ламелларины, выделяемые из брюхоногих моллюсков рода *Lamellaria*. Эти соединения обладают противораковыми свойствами и являются ингибиторами различных киназ, в том числе и GSK-3. Наиболее активным из них является ламелларин N (34), IC<sub>50</sub> которого составляет 5 нМ [129].

H₂N Весьма активный ингибитор GSK-3 — химениальдизин (35)
35 — был выделен из морских губок [130]. Его IC₅₀ равняется 10 нМ.
Такая высокая аффинность может быть связана с образованием дополнительных во-

дородных связей между аминогруппой ингибитора и аминокислотными остатками вне шарнира; «глицинамидный» фрагмент, вероятно, образует три водородных связи с шарниром аналогично комплексу химениальдизина с CDK2 [130].

Природные, полусинтетические и синтетические флавоноиды представляют собой обширный класс соединений, проявляющих широкий спектр биологической активности. В частности, ном некоторые из них проявляют ингибиторные свойства по отношению к циклин-зависимым киназам и GSK-3 [131]. Наиболее активным из них является полусинтетический флавопиридол (36), изначально идентифицированный в качестве ингибитора CDK5 [74] и прошедший первую фазу клинических испытаний [132].





Одними из первых синтетических соединений, проявивших высокую ингибиторную активность по отношению к GSK-3, стали пауллоны [133, 134]. Всего было синтезировано и испытано in vitro порядка ста представителей данного класса [85, 133-140]. Наиболее известными представителями этого класса являются альстерпауллон (4,  $IC_{50} = 4 HM$ ) и казпауллон (23,  $IC_{50} = 8$  нМ). Способ связывания пауллонов (рис. 1.10) несколько отличается от способа связывания упомянутых выше ингибиторов: отсутствуют во-Рис. 1.10. Способ связывания дородные связи с основной цепью Asp133, однако имеются две водородных связи с основной цепью Val135. В частном случае альстерпауллона особый

альстерпауллона с GSK-3 (структура 1Q3W).

интерес представляет наличие потенциальной водородной связи между нитрогруппой ингибитора и консервативным остатком Lys85, играющим важную роль в регулировании каталитического процесса [49].

В 2003 году ингибиторная активность на субмикромолярном уровне по отношению к GSK-3 и CDK была обнаружена у 6-фенил-[5H]-пирроло[2,3-b]пиразинов, получивших название «алоизины» в честь Алоиза Альцгеймера [141]. Наиболее активное соединение из этой группы, RP127 (37), имеет IC<sub>50</sub>, равную 0.4 мкМ. Близкородственные соединения, содержащие аминофуразановый фрагмент, являются селективными наномолярными ингибиторами киназы p70S6, сохраняя микромолярную аффинность к GSK-3β [142]. Введение ароматических заместителей в фенильное кольцо подобных соединений значительно снижает ингибиторную активность [143].



Обширная программа по разработке эффективных и селективных ингибиторов GSK-3 была выполнена фирмой Chiron, впоследствии приобретённой компанией Novartis. Идея поиска состояла в исследовании замещённых 2-аминопиримидинов, 2-аминопиридинов и родственных соединений. Ведущая структура представляла собой 2-алкиламино-4-арилпиримидин, замещённый также в положениях 5 и 6 (**39**, W = N) [13]. Путём всестороннего исследования влияния заместителей на активность были идентифицированы соединения CT98014 (**40**, IC<sub>50</sub> = 580 пМ) и CT98024 (**41**, IC<sub>50</sub> = 560 пМ). Для этих и аналогичных соединений (например, **17**, **18**, см. также табл. 1.2) были проведены испытания *in vivo*, в результате которых у них была обнаружена значительная противодиабетическая активность [13].



Обширная серия (70 соединений) ингибиторов GSK-3 была синтезирована на основе пиразолопиридинового и пиразолопиридазинового фрагментов [144-147]. Ведущее соединение **42** (IC<sub>50</sub> = 250 нМ) было найдено путём фармакофорного поиска во внутренней базе данных компании GlaxoSmithKline [145]. При докинге этого соединения были обнаружены три водородные связи в области шарнира (рис. 1.11), аналогичные связям в комплексе индирубина, и свободное пространство рядом с двумя фенильными заместителями, которое позволяло провести исследования с целью нахождения более активных и селективных соединений. Выяснилось, что замещение в положении 4 пиразолопиридазина значительно снижает активность, а ацилирование аминогруппы значительно её увеличивает. Также были исследованы аналогичные пиразолопиридины; в частности, среди них было найдено самое активное соединение данной серии — **43** (IC<sub>50</sub> = 0.8 нМ). Рентгеноструктурное исследование подтвердило способ связывания, предложенный с помощью докинга (рис. 1.11) [144]. Интересно отметить, что для аналогичных пиразолопиридинов, имеющих аминогруппу в 6-м положении, предложен другой способ связывания, предполагающий участие этой аминогруппы в водородных связях с шарниром [148].



**Рис. 1.11.** А) Способ связывания соединения **42**, предложенный с помощью докинга [145]. Б) Способ связывания аналога, выявленный с помощью рентгеноструктурного анализа [144].

Небольшая серия (30 соединений) весьма активных ингибиторов GSK-3 была предложена на основе пиразолопиримидинового фрагмента (44) [149-151]. Наибольшей активностью в серии обладают соединения 45 ( $pIC_{50} = 8.6$ ) и 46 ( $pIC_{50} = 8.8$ ). С помощью докинга для них предложен интересный способ связывания, предполагающий наличие водородной связи С–Н…О между ингибитором и аминокислотным остатком Asp133 (рис. 1.12).



Рис. 1.12. Предполагаемый способ связывания пиразолопиримидинов (Ar<sub>1</sub> = Ph, Ar<sub>2</sub> = 4-Py) и GSK-3 [150].

Другой способ сочленения пиразольного и пиридазинового циклов, а также 2аминопиримидиновый фрагмент были использованы при дизайне серии ингибиторов GSK-3 на основе шаблона **47** [152, 153]. Авторы исследования описали более ста соединений, константа ингибирования самого активного из которых (**48**) составляет 0.3 нМ. Среди соединений, основанных на данном шаблоне, имеются весьма активные и селективные ингибиторы киназ GSK-3, CDK2 и CDK4; интересно отметить, что вы сокая аффинность к одной из киназ GSK-3 или CDK4 обычно сочетается с высокой аффинностью к CDK2. Уменьшение количества атомов азота в пиразолопиридазиновом фрагменте приводит к значительному уменьшению ингибиторной активности по отношению к GSK-3 [154].



На основе фуропиримидинового фрагмента были предложены 26 соединений [155, 156]. Соединения с ацилированной аминогруппой (например, **49**) весьма активны ( $IC_{50} = 5 \text{ hM}$ ), а соединения со свободной аминогруппой и ароматическим заместителем в положении 3 (например, **50**) менее активны ( $IC_{50} = 23 \text{ hM}$ ).

<sub>сн<sub>3</sub></sub> Ингибиторная активность по отношению к GSK-3 имеется у производных β-карболина, причём эта активность может прояв-<sub>н<sub>3</sub></sub> ляться как по конкурентному [157], так и по неконкурентному (см. раздел 1.4.2) механизму. Соединение **51** имеет IC<sub>50</sub> = 1.5 мкМ.

При исследовании биологической активности 1,2,4-оксадиазол-5-карбоксамидов (**52**) было обнаружено, что они обладают ингибиторной активностью по отношению к GSK-3. Наиболее активное соединение **53** имеет IC<sub>50</sub> = 0.35 мкМ [158, 159]. Для этих сое-

динений был проведён докинг, однако особенности взаимодействия данных соединений с киназой не сообщаются [159].

51



При скрининге обширной объединённой коллекции потенциальных ингибиторов киназ было идентифицировано ведущее соединение **54**, ингибирующее активность GSK-3 на 88% в концентрации 10 мкМ [160]. При оптимизации структуры были обнаружены более активные аналоги — 5-нитро-2,4-диаминопиримидины (например, **55** (Ad = 3-гидроксиадамантил), IC<sub>50</sub> = 13 нМ) и азапурины (например, **56**, IC<sub>50</sub> = 3 нМ).



В ходе высокопроизводительного скрининга внутренней коллекции соединений компании Takeda Pharmaceuticals было идентифицировано соединение-хит 57 (IC<sub>50</sub> = 13 нМ). В ходе его оптимизации было проведено всестороннее исследование различ-

ных производных 2-(бензилсульфанил)-1,3,4-оксадиазола [57, 58]. Были выявлены соединения с IC<sub>50</sub> от 5.7 нМ [57]. Исследователи сосредоточились на поиске соединений с оптимальным сочетанием ингибиторной активности и проницаемости через гематоэнцефалический барьер; Итогом поиска стало соединение **58** (IC<sub>50</sub> = 34 нМ); его энантиомер с обращённой конфигурацией сульфоновой группы вчетверо менее активен. Способ связывания данного соединения изображён на рис. 1.13; стоит отметить наличие водородной связи С–Н···O между ингибитором и аминокислотным остатком Asp133 [58].



Рис. 1.13. Способ связывания соединения 58 [58].

Водородные связи С–Н···О не являются необычными среди ингибиторов киназ. Более того, в случае GSK-3 было проведено исследование, явственно показавшее, что такие водородные связи могут играть заметную роль в улучшении связывания ингибитора с киназой [161]. Константа ингибирования GSK-3 соединением **59** составляет 24 нМ, в то время как для соединения **60** эта константа равна 23 мкМ. Такая разница в активности связана с заменой углерода на азот в пятичленном цикле и исчезновением донора водородной связи. Анализ кристаллической структуры комплекса для близкого аналога недвусмысленно свидетельствует о наличии водородной связи С–Н···O [161].



Небольшая (10 соединений) серия ингибиторов GSK-3 была предложена на основе 2-арил-7-гидроксибензимидазолов [54]. Самое активное соединение серии, **61**, имеет IC<sub>50</sub> = 15 нМ. Рентгеноструктурный анализ свидетельствует об образовании водородной связи между гидроксилом в положении 7 бензимидазола и аминокислотным остатком Asp133.

#### 1.4.2. Неконкурентные ингибиторы киназы гликогенсинтазы 3

Среди неконкурентных ингибиторов GSK-3 наиболее широко представлены два класса соединений — тиадиазалидиноны (TDZD), получаемые синтетическим путём [162, 163], и манзамины, выделяемые из морских губок [164-166]. Кроме того, имеются пептидные ингибиторы, такие, как L803-mts (**19**), и ковалентно взаимодействующие ингибиторы — тиенилгалометилкетоны.

Первыми известными неконкурентными ингибиторами GSK-3 стали тиадиазалидиноны (TDZD). Наиболее активный из них, TDZD-8 (**20**), имеет IC<sub>50</sub> лишь 2 мкМ, но отличается чрезвычайно высокой селективностью, не проявляя ингибиторных свойств по отношению к CDK1, CK-II, PKA и PKC [162]. К настоящему времени известно порядка 70 ингибиторов этого ряда [65, 163]; следует отметить, что незначительные изменения в структуре центрального фрагмента могут приводить к смене механизма действия с неконкурентного на конкурентный и обратно [65]. По предположению разработчиков, место связывания TDZD расположено в окрестности сайта распознавания фосфатной группы субстрата; лиганд блокирует положительно заряженный центр, образованный остатками Arg96, Arg180 и Lys205, вследствие чего не осуществляется взаимодействие киназы с субстратом [65, 162]. В настоящее время ведутся клинические испытания соединений этого ряда в качестве лекарств от болезни Альцгеймера [18]



63

Манзамины — это алкалоиды, содержащие фрагмент βкарболина и сложный характерный полициклический каркас. Представители этого класса соединений синтезируются в морских губках родов *Haliclona* [167], *Petrosiidae* [124], *Pellina* и ряда других [168] при участии бактерий-актиномицет *Micromonospora sp.* (штамм М42) [124]. Наиболее известным представителем данного класса соединений является манзамин А (**62**), проявляющий противовирусную (анти-ВИЧ), противогрибковую, антибактериальную [169] и противомалярийную

[166] активность. Помимо данных видов активности, манзамин А ингибирует киназу гликогенсинтазы 3 $\beta$  человека (IC<sub>50</sub> = 10 мкМ) [164, 165], в связи с чем он представляет собой интересное ведущее соединение при поиске новых неконкурентных ингибиторов GSK-3. Важно отметить, что этот алкалоид обладает уникальной селективностью по отношению к изоформам GSK-3: он неактивен по отношению к  $\alpha$ -изоформе, но ингибирует  $\beta$ -изоформу [165]. К настоящему времени синтезировано несколько десятков производных манзамина А и родственных манзаминов [164, 165, 170], а также потенциальные пролекарства для манзамина А [171].

Пептидные ингибиторы GSK-3 были синтезированы в предположении, что пептиды, содержащие стандартную последовательность SXXX[pS], распознаваемую GSK-3, могут быть специфичными ингибиторами киназы. Гипотеза подтвердилась [172]; пептид L803 (KEAPPAPPQ[pS]P) проявил прекрасную ингибирующую способность и высокую селективность. Интересно отметить, что замена фосфосерина на глутамат не приводит к узнаванию пептида. Для улучшения биодоступности к L803 был добавлен миристоиловый заместитель; полученный пептид L803-mts (**19**) обладает противодиабетическим действием *in vivo* [172] и может служить шаблоном для дизайна пептидомиметиков.

> Некоторые алкилирующие агенты также проявляют ингибиторвг ную активность по отношению к GSK-3 [173, 174]. Соединение **63** имеет IC<sub>50</sub>, равную 500 нМ [174]. Предполагается, что ингибиторная активность данных соединений связана с их взаимодействием с аминокислотным остатком Cys199, расположенным в области связывания АТФ. Образование ковалентной связи приводит к необратимому ин

гибированию киназы (рис. 1.14). Очевидно, что создание лекарств на основе таких ингибиторов вряд ли возможно, однако они могут быть полезны в качестве фармакологических инструментов [174].



Рис. 1.14. Предполагаемый способ связывания 63 [174].

# 1.5. Соотношения «структура-активность» для ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3

Наличие большого числа относительно однородных серий ингибиторов GSK-3 позволило различным исследователям построить модели количественных соотношений «структура-активность» для них с применением различных методов. Наиболее часто среди них встречаются методы 3D-QSAR, в частности, CoMFA [175] и CoMSIA [176]. Результаты анализа этими методами приведены в табл. 1.3.

Все модели, построенные с помощью методов 3D-QSAR, обладают высокой точностью и приемлемой предсказательной способностью. Большинство моделей построено с использованием выравнивания по общему фрагменту; в единственном исследовании, в котором были использованы два альтернативных метода выравнивания ([181]), предсказательная способность модели, построенной с помощью выравнивания по общему фрагменту, оказалась выше. Предсказательную способность моделей в большинстве случаев оценивали с помощью внешней контрольной выборки; принцип разделения исходной выборки на контрольную и обучающую в большинстве случаев не сообщается. Недостатком большинства исследований (за исключением [184] и [186]) является отсутствие расчёта коэффициента корреляции между экспериментальными и предсказанными значениями для контрольной выборки. Для некоторых моделей ([182, 183, 185]) был проведён дизайн новых соединений на основе модели, однако предполагаемая активность этих соединений оценивалась лишь с использованием моделей и методов докинга.

Выборка	N	Выравнивание	Метод	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup> (метод)	S	Контроль	Ссылка					
Пауллоны	52	Докинг	CoMSIA	0.874	0.546 (LOO)	0.454	внешний (25)	[177]					
3-Анилино-4- арилмалеи- миды	74	Общий фрагмент, независимая оптимизация	CoMFA	0.891	0.805 (LOO)	0.146	нет	[178]					
A nouse in	25	Общий	CoMFA	0.917	0.584 (LOO)	0.176	нот	[170]					
АЛОИЗИНЫ	55	фрагмент	CoMSIA	0.938	0.673 (LOO)	0.158	нег						
TDZD	48	Не сообщается	CoMFA	0.922	0.654 (LOO)	0.189	внешний (5)	[65]					
47 [150]	70	Полити	CoMFA	0.870	0.491 (CV)	0.419		[190]					
4/[152]	/0	Докинг	CoMSIA	0.861	0.527 (CV)	0.435	внешнии (10)	[180]					
	34	п	CoMFA	0.897	0.542 (CV)	0.279							
Индирубины		Докинг	CoMSIA	0.908	0.724 (CV)	0.268	внешний (8)	[181]					
		54 Общий фрагмент	CoMFA	0.916	0.767 (CV)	0.261							
			CoMSIA	0.923	0.757 (CV)	0.212							
	49	10	40	40	40	40	Общий	CoMFA	0.98	0.53 (LOO)	0.154	× (10)	[100]
44		49 фрагмент	CoMSIA	0.92	0.48 (LOO)	0.296	внешний (12)	[182]					
Бисарилмале- имиды	29	Общий фрагмент	CoMFA	0.931	0.519 (LOO)	0.211	внешний (7)	[183]					
Пиразолопи- рид[аз]ины [144-147]	59	Общий фрагмент	CoMFA	0.97	0.55 (TS)	0.184	внешний (14)	[184]					
Бисарилмале-	10	40 Общий фрагмент	CoMFA	0.986	0.669 (LOO)	0.438	внешний (8)	[185]					
имиды	40		CoMSIA	0.965	0.683 (LOO)	0.652							
3-Анилино-4-		Общий	CoMFA	0.942	0.779 (TS)	0.104							
арилмале- имиды	56 фрагмент	56	фрагмент	CoMSIA	0.932	0.803 (TS)	0.803 (TS) 0.113 внешний (18) [186]	внешний (18)	[186]				
Индирубины	36	Фармакофор	PHASE	0.97	0.91 (TS)	0.33	внешний (8)	[187]					

**Таблица 1.3.** Результаты анализа 3D-QSAR для ингибиторов GSK-3. Обозначения: LOO — метод исключения по одному, CV — перекрёстный контроль, TS — контрольная выборка.

Также было проведено несколько исследований QSAR на основе других методов и дескрипторов. Информация о них приведена в табл. 1.4. Модели QSAR для ингибиторов GSK-3, построенные с помощью двумерных методов, отличаются от моделей 3D-QSAR несколько меньшими значениями коэффициентов корреляции. Наиболее точные модели построены с помощью наиболее сложных методов [192]; ни одну из предложенных моделей нельзя интерпретировать простым образом, вследствие чего возможно их использование лишь в качестве фильтров для соединений, предложенных генераторами структур.
Выборка	N	Метод	<b>R</b> <sup>2</sup>	<b>Q</b> <sup>2</sup> (метод)	S	Контроль	Ссылка
3-Анилино-4-	74		0.896	0.873 (TS)	0.137		
арилмалеимиды	/ <b>·</b>	нейронные	0.677	0.593 (TS)	0.612		
Пиразолопиридазины	81	сети	0.745	0.724 (TS)	0.473	Внешний	[188]
Пиразолопиридины	62	(CODESSA				-	
Пиразолопиримидины	61		0.507	0.423 (TS)	0.731		
3-Анилино-4- арилмалеимиды	67	Индикаторные переменные, метод Хэнча	0.85	0.81 (LOO)	0.165	Нет	[189]
Наиболее активные из разных классов	17	MIA-QSAR	0.940		0.16	LOO	[190]
Индирубины	36	CODESSA	0.93	0.6 (TS)	0.27	Внешний (8)	[187]
3-Анилино-4-	67		0.85	0.83	0.162		
арилмалеимиды	07	TPSA	0.67	0.50	0.502	нет	[191]
Пиразолопиридины	19		0.67	0.56	0.592		
Бисарилмалеимиды, пиразолопирид[аз]ины, пиразолопиримидины	132	Нейронные сети	до 0.95	до 0.93 (TS)	0.4	Внешний (29)	[192]

Таблица 1.4. Результаты анализа QSAR для ингибиторов GSK-3.

Имеется также одна классификационная модель, построенная для соединений ряда TDZD с использованием индекса Винера W, индекса загребской группы  $M_1$  и индекса эксцентрической связности  $\xi^{C}$  [193]. Модель позволяет различить активные и неактивные TDZD с точностью от 83% (индекс  $M_1$ ) до 87% (индекс W).

# 1.6. Поиск ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3 с помощью виртуального скрининга

В литературе описаны примеры поиска конкурентных ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3 методом виртуального скрининга. Имеются две основных стратегии использования этого метода: первая предполагает построение фармакофорной гипотезы на первой стадии с последующим докингом соединений-хитов в структуру биомишени, а вторая, требующая больших затрат расчётного времени, состоит в докинге всех соединений базы данных, интересующей исследователя, в структуру белка.

Большинство фармакофорных гипотез, описанных в литературе, содержит как минимум четыре элемента [194-199]. Из них 2 элемента, представляющих донор и акцептор водородной связи, соответствуют взаимодействию ингибитора с областью шарнира. Наличие остальных элементов зависит от молекул, использованных для построения фармакофорной гипотезы; обычно среди них имеется как минимум один элемент, описывающий гидрофобные либо ароматические фрагменты, а также зачастую присутствует элемент, отвечающий водородной связи с удалёнными от шарнира областями белка (ср. способ связывания альстерпауллона (рис. 1.10) или структуру химениальдизина (**35**)). Примеры фармакофорных гипотез приведены на рис. 1.15.



Рис. 1.15. Примеры фармакофорных гипотез для ингибиторов GSK-3 [194, 199, 197].

Для структур молекул-хитов, найденных после фильтрования баз данных по фармакофору, был проведён молекулярный докинг. В двух случаях были проведены также биологические испытания: в [198] провели скрининг базы известных лекарств, обнаружили и подтвердили *in vitro* и *in vivo* ингибиторную активность гидроксихлорохина, циметидина и гемифлоксацина по отношению к GSK-3; в [197] искали новые ингибиторы во внутренней базе данных компании ChemDiv и идентифицировали новые микромолярные ингибиторы.

Исследования, связанные с виртуальным скринингом по отношению к GSK-3 без использования фармакофора, преследуют различные цели. Гадакар с сотр. исследовали возможности различных настроек программы GLIDE по обогащению баз данных ингибиторами GSK-3 и сформулировали рекомендации для достижения максимального обогащения [200, 201]. Полгар с сотр. сравнивали возможности виртуального и высокопроизводительного экспериментального скрининга, добившись фактора обогащения для специально разработанного протокола виртуального скрининга 12.9%, а для высокопроизводительного скрининга — 0.55% [202]. Мишра с сотр. показали важность учёта подвижности белка [203]. Кэнг с сотр. провели виртуальный скрининг базы из 170 соединений, содержащих тиадиазалидиноновый фрагмент, и выявили среди них 6 соединений с микромолярной ингибирующей концентрацией [204]. Также проводились исследования, целью которых было определение комбинации оценочной функции и структуры киназы, приводящей к максимальной корреляции значения оценки и аффинности ингибитора [205].

## Глава 2. Поиск и дизайн конкурентных ингибиторов GSK-3

Значительное число известных АТФ-конкурентных ингибиторов GSK-3 и наличие экспериментальных данных о её пространственной структуре позволяет проводить дизайн и поиск новых ингибиторов с высокой степенью надёжности. На основании серий известных ингибиторов возможно построение моделей QSAR, а также настройка систем виртуального скрининга (BC), опирающихся как на молекулярное подобие, так и на предсказание способов связывания с помощью докинга. Нами были реализованы все эти подходы с целью нахождения новых потенциальных ингибиторов GSK-3.

## 2.1. Выборка ингибиторов GSK-3. Представление ингибиторной активности

По литературным данным была сформирована база данных, содержащая информацию об ингибиторной активности соединений по отношению к GSK-3. Выборка содержит 1685 соединений, относящихся к различным классам (см. гл. 1), среди которых 280 являются истинно неактивными — не обладают ингибиторной способностью в максимальной концентрации, использованной при испытаниях. Для большинства активных соединений активность представлена в форме IC<sub>50</sub> — концентрации ингибитора, при которой достигается 50% ингибирования фермента. В некоторых случаях для ингибитора определяли константу ингибирования  $(K_i)$  по уравнению Лайнвивера — Бёрка, встречаются случаи пересчёта IC<sub>50</sub> в константу ингибирования при помощи уравнения Ченга — Прусоффа [206], а также определение остаточной активности киназы в процентах. Важно отметить, что разные группы определяли IC<sub>50</sub> различными методами, в частности, с использованием различных концентраций АТФ. В некоторых случаях значение концентрации АТФ не приводится в описании методики эксперимента. Вследствие этого возможно построение надёжных моделей количественных соотношений «структура — активность» лишь для ограниченных наборов соединений. Тем не менее, погрешность определения  $IC_{50}$  и  $K_i$  зачастую довольно высока и может составлять до одной единицы  $pIC_{50}(pK_i)$ , что не позволяет делать выводов о надёжности количественной составляющей модели даже в случае построения её по однородным данным. В то же время данные верно отражают тренды активности,

позволяя достаточно надёжно отличить высокоактивные соединения от низкоактивных (неактивных).

Наибольшую ценность для планирования синтеза представляют два рода моделей: (1) качественные модели, позволяющие отличить потенциально активные соединения от заведомо неактивных; (2) полуколичественные модели, позволяющие сделать вывод о сравнительной активности двух структурно близких соединений. Строгие количественные модели, область применимости которых ограничивается однимдвумя классами соединений и определяется однородностью доступных данных, важны в случае планирования направлений дальнейшего развития проекта по разработке лекарств (оптимизации ведущих соединений).

## 2.2. Консервативный виртуальный скрининг

При проведении виртуального скрининга больших библиотек соединений исследователь может ставить перед собой различные задачи. В частности, его может интересовать нахождение ингибиторов абсолютно новых классов среди синтезированных ранее соединений либо поиск соединений, для которых с высокой вероятностью будет выявлена требуемая биологическая активность. Первую стратегию поиска можно назвать неконсервативной («рисковой»), а вторую — консервативной. При использовании консервативной стратегии проводится статистическая валидация системы виртуального скрининга и потенциальные ингибиторы ищутся среди соединений, получивших наивысшую оценку теми или иными методами, в идеальном случае — несколькими различными методами. Тем не менее, многие широко используемые методы часто занижают оценки истинно активным соединениям в силу различных причин, например, небольшого объёма молекулы. Неконсервативные стратегии позволяют идентифицировать интересные ведущие соединения среди тех, которые не получили высоких оценок при использовании консервативных стратегий; в то же время, они не позволяют оценить надёжность прогноза для предлагаемых соединений, вследствие чего при их использовании исследователю необходимо полагаться на общие соображения и химическую интуицию [207].

#### 2.2.1. Система консервативного виртуального скрининга

Наиболее распространённые методы виртуального скрининга, не налагающие формальных ограничений на принадлежность соединений к определённым классам, — это высокопроизводительный докинг, фармакофорный поиск и поиск по молекулярному подобию. Большой объём библиотеки, используемой для скрининга, требует значительного расчётного времени обработки. В связи с этим одним из ключевых факторов при выборе конкретных программ является скорость их работы.

Наибольшей скоростью среди программ докинга на сегодняшний день обладают программы DOCK [208] и FRED (Fast Rigid Exhaustive Docking, быстрый жёсткий исчерпывающий докинг [209]). По сравнению с DOCK, FRED имеет ряд преимуществ: во-первых, в FRED возможно использование нескольких различных оценочных функций для ранжирования ориентаций молекулы непосредственно во время проведения докинга, в то время как при использовании DOCK применение различных оценочных функций возможно лишь после проведения докинга и ранжирования, что может вносить в результаты погрешность, связанную со смещением разнообразия списка хитов в область, характеризующуюся высокими значениями оценочной функции DOCK; во-вторых, в FRED реализована возможность отбрасывания результатов докинга, в которых отсутствуют заданные пользователем лиганд-белковые взаимодействия (данная возможность заявлена в DOCK, однако на момент проведения скрининга она была неработоспособна из-за ошибок в программном коде); в-третьих, алгоритм DOCK требует проведения конформационного поиска для каждой молекулы непосредственно в центре связывания белка, в то время как FRED позволяет докировать предварительно сгенерированный набор конформаций, что значительно сокращает затраты расчётного времени, особенно в случае докинга одной и той же библиотеки в различные структуры белка либо при различных ограничениях на необходимые взаимодействия. Таким образом, в нашем случае использование программы FRED видится предпочтительным. Для уточнения структуры комплекса и внешней проверки правильности ориентации, предложенной FRED, целесообразно использовать программы исчерпывающего поиска, основанные на альтернативных алгоритмах, такие, как AutoDock, FlexX и SurflexDock.

Поскольку программа FRED осуществляет докинг жёсткого лиганда в жёсткий белок, требуется предварительная генерация конформаций лигандов с тем, чтобы обе-

спечить максимально полное описание их конформационного пространства. Для генерации конформеров была использована программа Omega2 [209]; методики подготовки структур подробно описаны в главе 5.2.1.

Среди программ, предназначенных для проведения фармакофорного поиска, наиболее часто в настоящее время применяются LigandScout (Inte:Ligand; [210]) и ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures, быстрое наложение химических структур [209, 211]). Эти программы позволяют строить фармакофорные гипотезы, учитывающие не только молекулярные особенности соединений, использованных для построения гипотез, но также их форму. Ключевое различие между данными программами состоит в том, что LigandScout проводит генерацию конформаций «на лету», в то время как ROCS использует предварительно сгенерированный набор конформаций. Поскольку библиотека конформеров, сгенерированная нами при подготовке к докингу, может с тем же успехом быть использована для виртуального скрининга по гипотезе ROCS, мы выбрали для анализа именно эту программу с целью экономии времени на конформационный поиск.

Методы виртуального скрининга по молекулярному подобию разрабатываются в предположении, что подобные молекулы должны обладать подобными биологическими свойствами. Подобие молекул может определяться различными методами; наиболее эффективными среди них считаются методы сравнения молекулярных отпечатков (molecular fingerprints) [212, 213]. В нашей работе была использована оригинальная методология, разработанная в нашей лаборатории и основанная на построении одноклассового классификатора молекулярных векторов методом искусственных нейронных сетей [214]

### 2.2.2. Построение системы виртуального скрининга

## 2.2.2.1. Выборки

Основными критериями надёжности системы виртуального скрининга являются адекватное воспроизведение ориентаций известных ингибиторов в области связывания и более высокое ранжирование заведомо активных соединений по сравнению с заведомо неактивными; при этом заведомо неактивные соединения должны обладать разнообразными структурами. Поскольку для большинства соединений отсутствуют экспериментальные данные об их неактивности, обычно в качестве набора заведомо

неактивных соединений используют так называемые «разнообразные выборки» (diversity sets), построенные таким образом, чтобы добиться максимального химического разнообразия соединений, представленных в выборке (обычно вводятся ограничения на максимальное число соединений, для которых какой-либо критерий молекулярного подобия превосходит некоторое пороговое значение).

В качестве «разнообразной выборки» предположительно неактивных соединений мы использовали выборку Национального института рака (США) (NCI Diversity Set) объёмом 2000 молекул, из которой были удалены соединения, содержащие атомы металлов и тяжёлых элементов (кроме иода), соли и записи, содержащие два или более независимых фрагмента молекул, поскольку такие соединения не обрабатываются программой докинга. Окончательный размер разнообразной выборки составил 1884 соединения.

В 2006 году Хуаном, Шойхетом и Ирвином [215] была предложена выборка DUD (Directory of Useful Decoys, «Каталог полезных ложных лигандов»), составленная таким образом, чтобы предлагаемые ложные лиганды имели сходные физико-химические характеристики с известными истинными лигандами различных биологических мишеней, однако заметно отличались от них топологически. Среди прочих мишеней в DUD имеется подвыборка ложных ингибиторов циклин-зависимой киназы 2 (CDK2), состоящая из 2073 соединений. Известно, что ингибиторы циклинзависимых киназ и GSK-3 близки по своей структуре (гл. 1.4.1), что позволяет использовать данную подвыборку DUD для тестирования системы виртуального скрининга GSK-3 без каких-либо дополнительных изменений.

Выборка заведомо активных и неактивных соединений описана в разделе 2.1. Подготовка выборок описана в главе 5.2.1.

#### 2.2.2.2. Выбор структуры киназы для докинга

К настоящему времени в банке белковых структур PDB имеется 23 структуры GSK-3β, исследованных с помощью рентгеноструктурного анализа (см. раздел 1.3). Помимо этих структур, имеются также структуры в патентной литературе ([216] и др.), позволяющие выявить особенности взаимодействий киназы с ингибиторами, не освещёнными в общедоступных базах данных.

Вопрос выбора конкретной структуры для виртуального скрининга ингибиторов GSK-3 несколько раз рассматривался в литературе [202, 203]. Структуры, доступные в банке данных PDB, были сгруппированы согласно конформациям аминокислотных остатков области связывания. Кроме того, учитывалось наличие либо отсутствие консервативных молекул воды, участвующих в связывании лиганда. Итогом исследований стало утверждение, что обогащение результатов ВС мало зависит от конкретной использованной структуры, а добавление каких-либо конкретных молекул воды не может являться универсальным решением. Мы использовали для ВС структуру киназы 1R0E [51] (рис. 2.1) в комплексе с чрезвычайно аффинным ингибитором 8 ( $K_d$  = 53 пМ), которая была ранее использована для успешного виртуального скрининга [204]. Дополнительные ограничения были введены на обязательное присутствие в молекуле лиганда донора водородной связи, взаимодействующего с карбонильным атомом кислорода основной цепи Asp133, и акцептора водородной связи, взаимодействующего с амидным атомом азота основной цепи Val135. Эта пара водородных связей присутствует в комплексе 1R0E. Поскольку данная комбинация ограничений характерна не для всех ингибиторов GSK-3, в качестве альтернативы может быть использована структура комплекса киназы с другим высокоаффинным ингибитором CHIR911 (18) [216], в которой имеются водородные связи с карбонильным атомом кислорода и амидным атомом азота основной цепи Val135. Необходимо отметить, что некоторые известные ингибиторы образуют классическую водородную связь лишь с амидным атомом азота основной цепи Val135 (например, комплекс 3F7Z); карбонильный атом кислорода Asp133 при этом образует слабую водородную связь с одним из ароматических протонов. Тем не менее, мы считаем важным ограничиться лишь классическими водородными связями с тем, чтобы получить более надёжные результаты виртуального скрининга, поскольку водородные связи типа СН…О не обрабатываются автоматически ни одной программой докинга.



**Рис. 2.1.** Структура 1R0E, использованная для виртуального скрининга. Лиганд 8 изображён с помощью шаростержневой модели, белок — в виде стержней. Молекулярная поверхность окрашена согласно наличию доноров и акцепторов водородной связи. Водородные связи с шарнирным участком помечены оранжевым; водородная связь СН…О помечена пунктиром.

При проведении докинга для многих заведомо активных соединений выбранная комбинация структуры белка и дополнительных структурных ограничений не позволила построить приемлемый вариант расположения молекулы в области связывания по двум причинам: (а) отсутствие группировок в молекуле лиганда, необходимых для удовлетворения ограничениям, или (б) отсутствие приемлемых ориентаций. Такие соединения были исключены из рассмотрения; тем не менее, другие комбинации структуры киназы и (или) дополнительных ограничений могут позволить провести докинг данных соединений. Общее число сдокированных истинно активных соединений (True Active, TA) оказалось равным 1057 (86%), истинно неактивных (True Inactive, TI) — 173 (84%), разнообразных (Diversity Set, DS) — 1386 (74%), ложных ингибиторов CDK2 (DUD) — 1996 (96%).

После генерации предполагаемых структур комплексов проводилась оценка энергии связывания с помощью различных оценочных функций: Chemgauss3, PLP, OEChemscore, Screenscore и Shapegauss, реализованных в программе FRED, а также с помощью модуля CScore программного комплекса SYBYL 8.0 [217], позволяющего производить оценку с помощью функций Chemscore, D score, G score и PMF score и оптимизацию структуры комплекса с повторной оценкой (ChemscoreR, DR\_score, GR\_score, PMFR\_score). Консенсусная оценка проводилась по отдельности в программах FRED и CScore, однако не была использована при количественном анализе качества системы скрининга, поскольку её численные значения зависят не от конкретных параметров взаимодействия белка с лигандом, а от ранжирования результатов скрининга.

## 2.2.2.3. Фармакофорный поиск

Представление области связывания ингибиторов фармацевтической мишени может быть достигнуто разными способами. В частности, при наличии структур комплексов ингибиторов с мишенью, исследованных экспериментально, становится возможным провести их совмещение, идентификацию общих фармакофорных элементов, определяющих взаимодействие с биомишенью и активность, и на основе построенной *фармакофорной гипотезы* провести виртуальный скрининг и поиск новых потенциальных ингибиторов. Отобранные ингибиторы будут иметь сходный размер и расположение функциональных групп, а также похожий молекулярный электростатический потенциал.

Для проведения фармакофорного поиска мы использовали программу ROCS, достоинством которой является учёт молекулярной формы как одного из основных критериев подобия [218]. Помимо формы, сравнение происходит с использованием так называемых «раскрашенных атомов», соответствующих фармакофорным элементам: донору либо акцептору водородной связи, катиону либо аниону, циклу или гидрофобному фрагменту.

Фармакофорная гипотеза для ингибиторов GSK-3 была построена на основе наложения 15 кристаллических структур комплексов киназы с ингибиторами таким образом, чтобы минимизировать RMSD остатков шарнирной области. При построении гипотез ROCS перебирает все возможные комбинации шаблонных молекул и отбирает из них наиболее разнообразные для построения оптимальных гипотез, что делает процесс отбора весьма длительным. В связи с этим были сгенерированы гипотезы на основе не более чем пяти различных ингбиторов; перебор всех возможных комбинаций проводился автоматически, после чего автоматически отбирались девять оптимальных гипотез, список которых приведён в табл. 2.1. Для всех гипотез была определена площадь под кривой ROC (Receiver Operating Characteristic, раздел 5.2.3) с использованием всех истинных лигандов и выборки ложных лигандов TI+DUD. Оптимальная площадь под кривой достигается при использовании метрик подобия Tanimoto (operation (учитывающей подобие формы и «окраски» атомов) либо ColorTanimoto (подобие только «окраски» атомов). Для дальнейшего рассмотрения была выбрана гипотеза №5, достоинствами которой являются наличие гидрофобного атома, соответствующего взаимодействию ингибитора с Leu132, и максимальный объём молекулярной формы.

№	Исходные структуры	AUC	Метрика
1	1Q5K, 1R0E, 2OW3, 3F88, 3I4B	0.778	ColorTanimoto
2	1Q3D, 1Q5K, 2O5K, 3I4B, 3GB2	0.775	TanimotoCombo
3	1R0E, 2O5K, 3I4B, 3L1S, 3GB2	0.796	ColorTanimoto
4	1Q3D, 2O5K, 3I4B, 3GB2	0.758	TanimotoCombo
5	1Q3D, 1UV5, 2OW3, 3F88, 3I4B	0.804	TanimotoCombo
6	1Q3D, 1R0E, 2O5K, 3I4B, 3GB2	0.762	ColorTanimoto
7	1Q41, 1Q5K, 2O5K, 2OW3, 3F7Z	0.782	TanimotoCombo
8	1UV5, 1R0E, 2OW3, 3F88, 3I4B	0.804	ColorTanimoto
9	1Q3D, 2O5K, 2OW3, 3I4B, 3L1S	0.750	TanimotoCombo

**Таблица 2.1.** Фармакофорные гипотезы, построенные по кристаллическим структурам. *АUC* — площадь под кривой ROC.

Изначальные гипотезы содержат избыточное количество элементов, поскольку в них содержатся все фармакофорные элементы, имеющиеся в молекулах, использованных для построения гипотезы. Кроме того, имеет смысл увеличить вес критически важных «раскрашенных» атомов для того, чтобы выделить их среди прочих. Например, увеличение веса «киназного фармакофора» донор/акцептор/донор и гидрофобного атома втрое при удалении излишних элементов (катионов и анионов, а также некоторых доноров и акцепторов, не соотносимых с конкретными лиганд-белковыми взаимодействиями; рис. 2.2) приводит к увеличению *AUC* до 0.815, что соответствует лучшим результатам для выборки ложных лигандов TI+DUD в условиях докинга [219]. Дальнейшее увеличение веса ключевых элементов приводит к уменьшению *AUC*. Стоит заметить, что фармакофорный поиск в данном случае отличается большей общностью, чем докинг, поскольку оценка подобия была сгенерирована для всех предложенных модели молекул, а не только для тех, которые удовлетворяют наложенным ограничениям (ср. раздел 2.2.2.2). Как следствие, снижается вероятность пропуска истинно активных соединений из-за технических ограничений классификатора.



Рис. 2.2. Оптимизированный вариант фармакофорной гипотезы №5. Атомы углерода ингибиторов показаны зелёным, молекулярная форма в виде серого облака, цветные шары соответствуют фармакофорным элементам: синий — донор водородной связи, красный — акцептор, зелёный — цикл, жёлтый — гидрофобный элемент.

### 2.2.2.4. Моделирование с помощью одноклассового классификатора<sup>2</sup>

Для анализа молекулярного подобия мы использовали метод одноклассовой классификации на основе искусственных нейронных сетей с обратным распространением ошибки с кодированием и декодированием сигнала [220]. На вход нейронной сети подаётся молекулярный отпечаток FP2 (гл. 5.2.6), на выходе нейронной сети этот молекулярный отпечаток должен быть воспроизведён (рис. 2.3). Нейроны скрытого слоя приблизительно соответствуют наличию в молекуле неких фармакофорных особенностей. При обучении нейронной сети ей циклически предъявляются структуры всех активных соединений, обучение прекращается при возрастании ошибки на внутренней контрольной выборке в течение 50 циклов. Чем точнее воспроизводится молекулярный отпечаток на выходе, тем выше вероятность того, что данное соединение

<sup>2</sup> Одноклассовый классификатор разработан совместно с м. н. с. кафедры органической химии Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова Карповым П. В.

будет активным. Сравнение отпечатков осуществляется с помощью критерия Танимото; при этом следует помнить, что значение критерия Танимото не равняется значению вероятности активности для соединения. Поскольку обучение нейронной сети стохастический процесс, оптимальные параметры ВС достигаются при консенсусном использовании нескольких нейросетевых моделей («экспертов»). В нашем случае используются три модели с тремя нейронами в скрытом слое и три модели с четырьмя нейронами в скрытом слое, консенсусная оценка получается путём усреднения оценок экспертов.



Направление передачи сигнала

Рис. 2.3. Схема использованной нейронной сети с тремя нейронами в скрытом слое.

## 2.2.3. Валидация системы виртуального скрининга

### 2.2.3.1. Докинг: воспроизведение кристаллической структуры

При проведении виртуального скрининга наиболее важно установление разницы между значениями оценочной функции для заведомо активных и заведомо неактивных соединений. Тем не менее, необходимо представлять вероятность ошибочного предсказания способа связывания и его возможные причины с целью понимания необходимости повторного докинга хитов без использования ограничений.

Оценка качества воспроизведения кристаллографической позиции проводилась с использованием набора ингибиторов, кристаллизованных совместно с GSK-3. Результаты оценки приведены в таблицах 2.2 и 2.3. Структуру ингибитора извлекали из оригинального комплекса и готовили к докингу по стандартной процедуре. Докинг проводили в подготовленную структуру киназы без использования ограничений либо

с использованием одного либо двух ограничений на наличие водородных связей, после чего совмещали шарнирные участки кристаллической структуры и предложенной структуры комплекса. Таким образом удавалось достичь более точного наложения позиций ингибиторов, чем в случае с выравниванием структур по всем аминокислотным остаткам. Для совмещённых структур лигандов проводили визуальный анализ соответствия и рассчитывали среднеквадратичное отклонение неводородных атомов (RMSD).

**Таблица 2.2.** RMSD неводородных атомов ингибиторов при докинге с различным числом ограничений. Одно ограничение — водородная связь между амидным NH Val135 и лигандом, два — то же и водородная связь между карбонильным атомом кислорода основной цепи Asp133 и лигандом

			1-	
Комплекс	Ингибитор	RMSD без ограничений	RMSD (1 ограничение)	RMSD (2 ограничения)
1Q3D	3	5.648	1.739	1.870
1Q3W	4	7.583	6.412	6.432
1Q41	5	5.914	5.914	0.828
1Q4L	6	2.590	1.567	1.481
1Q5K	7	8.717	8.717	4.549
1UV5	9	0.457	0.660	0.660
1R0E	8	4.769	4.768	1.420
205K	11	9.052	2.936	2.936
20W3	12	5.172	5.365	3.208
3I4B	17	7.449	6.672	7.751
3DU8	13	6.145	6.136	6.145
3L1S	18	1.080	1.132	1.132
3F88	15	6.742	6.742	_
3F7Z	14	7.107	5.326	_
3GB2	16	2.956	7.079	_

В качестве контрольного эксперимента был проведён докинг тех же ингибиторов без ограничений на наличие водородных связей либо с единственным ограничением на наличие водородной связи между амидным NH Val135 и ингибитором. В обоих случаях возможен докинг ингибиторов 14-16, однако предсказанная структура комплекса значительно отличается от истинной; кроме того, в обоих случаях для большинства остальных лигандов наблюдается ошибочное предсказание способа связывания. Таким образом, использованная модель с двумя ограничениями оказывается более выгодной с точки зрения предсказания способа связывания, чем модели с меньшим числом ограничений.

Комплекс	Ингибитор	Визуальная оценка	Причина
		соответствия	
1Q3D	3	Хорошее	Несоответствие формы
1Q3W	4	Плохое	Неучёт водородной связи NH…O
1Q41	5	Превосходное	
1Q4L	6	Превосходное	
1Q5K	7	Плохое	Неучёт водородной связи СН…О
1UV5	9	Превосходное	
1R0E	8	Хорошее	Неверная конформация части молекулы
205K	11	Хорошее	Неверная конформация части молекулы
20W3	12	Среднее	Несоответствие формы полости и лиганда
3I4B	17	Плохое	Неучёт водородной связи СН…О
3DU8	13	Плохое	Неучёт водородной связи СН…О
3L1S	18	Хорошее	Несоответствие формы полости и лиганда
3F88	15	Не соблюдены ограничения	Неучёт водородной связи СН…О
3F7Z	14	Не соблюдены ограничения	Неучёт водородной связи СН…О
3GB2	16	Не соблюдены ограничения	Неучёт водородной связи СН…О

**Таблица 2.3.** Причины отличий результатов докинга от результатов рентгеноструктурного анализа.

Из 15 исследованных ингибиторов для восьми наблюдается адекватное предсказание кристаллографической позиции (визуальная оценка качества от средней до превосходной). Форма области связывания не всегда идеальна для докинга некоторых ингибиторов (ставроспорин (комплекс 1Q3D), ингибиторы из комплексов 2OW3, 3L1S и 2O5K), что приводит к изменениям конформации по сравнению с кристаллографической при наличии таких степеней свободы (2O5K) либо к довольно значительному смещению молекулы в целом (1Q3D, 3L1S) или даже повороту её на 180° (2OW3; поворот практически не влияет на способ связывания в силу высокой симметрии молекулы). Тем не менее, докинг этих ингибиторов следует признать успешным.

Докинг альстерпауллона (комплекс 1Q3W) также привёл к ориентации, повёрнутой относительно исходной на 180°. Основной причиной этого поворота является невозможность удовлетворения наложенным ограничениям, поскольку обе водородные связи амидная группа ингибитора в нативной структуре образует с Val135. Необходимо отметить, что в такой ситуации возникает объёмистая полость между молекулой и остатком-гейткипером Leu132, и никакое взаимодействие с карбонильным атомом кислорода Asp133 невозможно. При развороте молекулы достигается приемлемая ориентация, причём нитрогруппа направлена в сторону Arg141. Таким образом, результаты докинга данного соединения можно считать приемлемыми для виртуального скрининга, поскольку на их основе возможно дальнейшее уточнение ориентации ингибитора с помощью программ более исчерпывающего докинга, таких, как AutoDock.

Для трёх ингибиторов (исходные комплексы 3F88, 3F7Z и 3GB2) попытки докинга с использованием данных ограничений оказались неудачными, поскольку ни одна конформация ингибитора не удовлетворяла им. Необходимо отметить, что во всех этих комплексах наблюдается слабая водородная связь между ароматическим протоном и карбонильным атомом кислорода Asp133 (подробный обзор водородных связей CH…O см., например, в [161, 221]). Аналогичная водородная связь наблюдается также в комплексах 3DU8, 3I4B и 1Q5K, однако для них возможны и другие ориентации, в которых возможно образование классических водородных связей с Asp133. Неучёт водородных связей CH…O является общим свойством всех современных программ докинга, поэтому невозможно сказать, были бы кристаллографические конформации этих лигандов адекватно воспроизведены при учёте этих водородных связей. Данная особенность должна быть учтена в будущем при разработке новых и развитии существующих программ докинга.

#### 2.2.3.2. Статистическая валидация систем виртуального скрининга

Чаще всего качество системы виртуального скрининга исследуют с помощью анализа ROC (receiver operating characteristic, техническая характеристка приёмника [222]), главной стадией которого является построение кривой ROC (рис. 2.4), показывающей зависимость количества верно классифицированных положительных примеров (истинно положительные, или TP (true positive)) от количества неверно классифицированных отрицательных примеров (ложно отрицательные, или FN (false negative)). В случае ранжирования результатов виртуального скрининга ROC-анализ показывает, сколько истинно положительных результатов оказалось ранжировано ниже истинно либо предположительных отрицательных, а также вероятность правильного ранжирования двух произвольно выбранных соединений. Преимуществом метода является его независимость от числа соединений в выборках истинно активных и истинно неактивных при сохранении распределения оценок. На рис. 2.4 видно, что все использованные в данной работе оценочные функции дают положительное обогащение, однако разница между многими из них невелика. Более надёжную оценку качества классификаторов можно получить с помощью других статистических параметров анализа.



Рис. 2.4. Кривые ROC для различных оценочных функций при докинге в структуру киназы 1R0E.

Сравнение кривых ROC для различных оценочных функций можно осуществлять с помощью параметров, приведённых в таблице 2.4. Важнейшим среди данных параметров является площадь под кривой (Area Under Curve, AUC), с помощью которой можно оценить общее качество модели; значение этой площади соответствует вероятности правильного ранжирования двух произвольно выбранных соединений. Этот параметр максимален при использовании оценочной функции Chemscore; минимально уступают ей функции ChemscoreR и Chemgauss3, при этом разница между двумя последними функциями статистически незначима (p = 0.95). При оптимальном пороговом значении функция Chemgauss3 приводит к наилучшему соотношению долей извлечённых истинно активных и истинно неактивных соединений (tp/fp) среди перечисленных оценочных функций. Для функции Shapegauss этот параметр ещё больше, однако относительно низкая AUC и невысокая tp делают её менее предпочтительной. Также необходимо отметить значительный проигрыш по всем параметрам популярных оценочных функций, основанных на силовых полях и потенциалах средней силы, которые, впрочем, предназначены не столько для виртуального скрининга, сколько для исследования способов связывания и построения корреляций между значением оценочной функции и аффинностью соединения. Неправильные конформации ингибиторов в центре связывания АТФ, полученные для многих молекул вследствие

наложения жёстких ограничений на присутствие определённых взаимодействий, приводят к занижению оценок функциями, основанными на воспроизведении энергии связывания. Напротив, использование эмпирических либо гауссовых оценочных функций приводит к лучшему разделению активных и неактивных соединений даже при некорректном воспроизведении конформации ингибитора. Оптимизация структуры комплекса средствами SYBYL (ChemscoreR, DR\_score, GR\_score, PMFR\_score) в большинстве случаев приводит к ухудшению разделения, хотя и незначительному; качество функций G\_score и GR\_score статистически неразличимо (p = 0.95). Причиной такого поведения является значительное улучшение оценки неактивных соединений при оптимизации структуры комплекса, в частности, при изменении формы области связывания и подгонке её под форму ложного лиганда. С другой стороны, некоторое увеличение *AUC* может быть следствием более значительного выигрыша в энергии при релаксации комплекса истинного лиганда по сравнению с аналогичным выигрышем при релаксации ложного лиганда; тем не менее, в данной ситуации это скорее исключение, чем правило.

**Таблица 2.4.** Результаты анализа ROC для различных оценочных функций при докинге в структуру киназы 1R0E. Максимальная точность предсказания (Accuracy, *ACC*) достигается при использовании оптимального порогового значения (Optimal Threshold, *OT*) для отделения активных соединений от неактивных; при этом доля ложноположительных результатов равна *fp*, а доля извлечённых истинно положительных — *tp*.  $N_{\text{неакт.}} = 3555$ ,  $N_{\text{акт.}} = 1057$ .

Оценочная функция	AUC	ACC	ОТ	fp	tp	tp/fp	BEDROC	<b>BEDROC</b> <sub>1</sub>	Тип
Chemscore	0.824	0.812	-31.552	0.088	0.477	5.421	0.662	0.300	Эмпирическая
ChemscoreR	0.816	0.816	-32.505	0.078	0.459	5.917	0.690	0.322	Эмпирическая
Chemgauss3	0.800	0.826	-70.165	0.053	0.419	7.928	0.757	0.376	Форма
Screenscore	0.774	0.804	-108.669	0.074	0.393	5.310	0.646	0.284	Эмпирическая
Shapegauss	0.758	0.814	-485.035	0.038	0.315	8.305	0.700	0.319	Форма
OEChemscore	0.747	0.804	-39.320	0.046	0.299	6.529	0.657	0.286	Эмпирическая
PLP	0.746	0.805	-51.412	0.050	0.316	6.390	0.639	0.277	Эмпирическая
D_score	0.731	0.796	-134.486	0.044	0.261	5.870	0.610	0.250	Силовое поле
DR_score	0.728	0.801	-139.365	0.046	0.289	6.270	0.652	0.278	Силовое поле
GR_score	0.724	0.793	-269.042	0.028	0.190	6.892	0.633	0.256	Силовое поле
G_score	0.712	0.783	-244.950	0.028	0.148	5.378	0.572	0.217	Силовое поле
PMF_score	0.693	0.772	-72.722	0.014	0.052	3.696	0.445	0.150	PMF
PMFR_score	0.678	0.772	-69.795	0.008	0.034	4.171	0.455	0.155	PMF
Случайные числа	0.507	0.770	1.000	0.000	0.000				Случайные числа

Весьма важным параметром качества системы виртуального скрининга является возможность так называемого «раннего распознавания» активных соединений. Поскольку человеческие возможности ограничены, визуальный анализ способов связывания возможен для хитлистов объёмом не более нескольких тысяч соединений, получивших в ходе скрининга наивысшие оценки, причём в случае скрининга чрезвычайно больших баз данных число анализируемых соединений составляет доли процента от общего числа соединений в базе. Критерии качества раннего распознавания позволяют оценить обогащение верхней части хитлиста активными соединениями, что является мерой потенциальной применимости метода скрининга для поиска в больших базах данных. Метод ROC, несмотря на такие достоинства, как статистическая достоверность и устойчивость, не позволяет провести подобную оценку; оптимальное пороговое значение соответствует различному обогащению и различным долям хитлиста для разных оценочных функций. Существуют различные методы оценки раннего распознавания, одним из наиболее удобных из них является метод BEDROC (Boltzmann-Enhanced Discrimination of ROC, разделение ROC по распределению Больцмана [223]). Подобно AUC, значение BEDROC варьируется от 0 до 1; большие значения соответствуют лучшему раннему распознаванию. Среди преимуществ метода — простота расчёта и возможность непосредственного сравнения оценок, полученных от различных классификаторов. Подробное рассмотрение метода выходит за рамки данной работы.

Метрика *BEDROC* была рассчитана для всех описанных выше систем двумя способами: с использованием всей выборки истинно активных соединений (*BEDROC*) и с использованием бутстреппинга с сохранением распределения оценок в подвыборках (*BEDROC*<sub>1</sub>; подробное описание см. в гл. 5.2.3). Приблизительное соотношение оценок данной метрикой совпадает в обоих случаях, хотя в первом случае значения *BEDROC* значительно ближе к единице вследствие насыщения выборки активными соединениями. Наиболее качественное раннее обогащение, в соответствии с этой метрикой, достигается с использованием оценочной функции Chemgauss3; немногим ей уступают оценочные функции Shapegauss и Chemscore. Интересен тот факт, что оптимизация структуры комплекса приводит к значительному улучшению раннего распознавания — вероятно, из-за более значительного выигрыша в энергии при релаксации

комплекса истинного лиганда по сравнению с аналогичным выигрышем при релаксации ложного лиганда.

Распределения оценок для исследованных оценочных функций (рис. 2.5) иллюстрируют приведённые выше рассуждения. В частности, видно, что для оценочной функции Chemgauss3 оценки для истинно активных соединений значительно смещены в сторону высоких оценок (большие отрицательные значения) по сравнению со всеми остальными выборками ложных лигандов. Например, при выборе порогового значения оценки -80 число извлечённых истинно активных соединений значительно превосходит число извлечённых ложных ингибиторов. В случае с функцией Shapegauss разброс оценок для активных соединений значительно шире, вследствие чего степень извлечения истинно активных соединений при разумных порогах отсечения несколько ниже. Аналогичная ситуация наблюдается для функций OEChemscore, Screenscore и D score (на рис. не показана). Недостаток функции PLP — высокая степень извлечения истинно неактивных соединений при всех пороговых значениях; похожая проблема возникает при использовании функции Chemscore, однако в данном случае слишком высоко ранжируются многие соединения DS. Для функций G score и PMF score смещение распределения оценок для истинно активных соединений относительно распределения оценок ложных ингибиторов практически отсутствует (в частности, в области высоких оценок), что делает использование данных функций для оценки результатов виртуального скрининга неоправданным.



Рис. 2.5. Распределения значений оценок для некоторых оценочных функций. Чёрным цветом обозначены истинно активные соединения, полосочками истинно неактивные, клеточками — DUD, белым цветом — DS. Во всех случаях разделение проводилось на 26 классов.

Методы, основанные на структурах лигандов (фармакофорный поиск и одноклассовый классификатор), приводят к более благоприятным статистическим параметрам за счёт лучшего раннего обогащения (табл. 2.5). ROC-кривые приведены на рис. 2.6; в качестве истинно активных использованы все истинно активные соединения (1402 соединения), в качестве ложных лигандов — все истинно неактивные соединения, DS и DUD (3110 соединений). Следует отметить, что возможность использования всех истинно активных и истинно неактивных соединений является достоинством методов, основанных на структурах лигандов, по сравнению с докингом; тем не менее, принципиальной разницы между распределением свойств соединений для выборок в целом и выборок сдокированных соединений нет, что позволяет непосредственно сравнивать параметры ROC-кривых. Соотношение истинно активных и неактивных соединений среди результатов, превосходящих пороговое значение (tp/fp), значительно превосходит аналогичное значение для докинга.

Таблица 2.5. Р	езульт	гаты	анали	13a R	ОС дл	я ме	тодов,	0C	нованных	на	структ	ypax
лигандов.												

Оценочная функция	AUC	ACC	OT	fp	tp	tp/fp	BEDROC	<b>BEDROC</b> <sub>1</sub>	Тип
TanimotoCombo	0.867	0.846	0.429	0.048	0.611	12.76	0.966	0.592	Танимото
Tanimoto	0.892	0.880	0.407	0.042	0.641	15.12	0.895	0.566	Танимото
(одноклассовый)									
Случайные числа	0.507	0.770	1.000	0.000	0.000				Случайные числа



Рис 2.6. Кривые ROC для методов, основанных на структурах ингибиторов, в сравнении с кривыми для лучших оценочных функций. Tanimoto — оценка одноклассового классификатора, TanimotoCombo — оценочная функция фармакофорного поиска.

Значение BEDROC для фармакофорной гипотезы значительно превышает соответствующее значение для докинга и равняется 0.966, что иллюстрируется распределением значений оценки (рис. 2.7А): TanimotoCombo > 0.530 встречается почти исключительно у активных соединений, а пороговое значение 0.452 приводит к извлечению значительного числа истинно активных соединений при чрезвычайно небольшом количестве неактивных. Аналогичная ситуация наблюдается и для одноклассовой модели, хотя довольно значительное количество истинно активных соединений имеет низкие значения оценки вследствие неоднородного распределения классов истинно активных соединений, что с очевидностью приводит к уменьшению значения BEDROC. В частности, представители больших классов — бисарилмалеимиды, индирубины и пиразолопиримидины — получают более высокие оценки, чем представители малых классов. Интересно отметить, что распределение оценок для активных соединений в моделях, основанных на лигандах, заметно отличается от распределений значений оценочных функций для результатов докинга: если последние преимущественно имеют форму нормального распределения или подобного ему (рис. 2.5), то значения оценки по молекулярному подобию распределены несколько более широко, и в случае фармакофора имеются два выраженных максимума. Похожая ситуация наблюдается для оценки одноклассовой модели, которая, впрочем, распределена более равномерно. В обоих случаях известное число истинно активных соединений получает очень высокие оценки подобия, в то время как максимальные оценки для истинно неактивных соединений относительно невысоки. Это приводит к увеличению *BEDROC*<sub>1</sub>, однако не означает более качественного отделения активных соединений от неактивных по сравнению с моделями, основанными на докинге. Чрезвычайно высокие значения оценки для некоторых соединений свидетельствуют лишь об их принадлежности к определённому структурному классу и особенно характерны для представителей обширных классов. Тем не менее, такое смещение не является помехой для проведения виртуального скрининга на основе моделей, поскольку обогащение при оптимальном пороговом значении имеет приемлемую величину.



Рис. 2.7. А) Распределение значений оценки TanimotoCombo для оптимизированной фармакофорной гипотезы №5. Б) Распределение значений индекса Танимото для истинно активных и неактивных соединений в одноклассовой модели.

Подводя итог статистической валидации, можно сделать некоторые выводы. Прежде всего, можно видеть, что модели, основанные на лигандах, имеют значитель-

но лучшие параметры раннего обогащения по сравнению с докингом. В случае одноклассовой модели это достигается за счёт высоких оценок, получаемых отдельными классами соединений. Как следствие, данная модель может считаться наиболее консервативной. В случае докинга многие соединения отбрасываются вследствие невозможности удовлетворения ограничениям; это делает метод достаточно консервативным, но не ограниченным каким-либо конкретным классом соединений; иными словами, в качестве хита может быть идентифицировано любое соединение, обладающее подходящей молекулярной формой и удовлетворяющее ограничениям. Фармакофорная гипотеза с этой точки зрения наименее консервативна, поскольку молекулярная форма не является для неё жёстким критерием, и некоторые нарушения молекулярной формы, к которым фармакофорная гипотеза будет толерантна, могут быть неприемлемы для докинга. Фармакофорная гипотеза и одноклассовый классификатор могут быть использованы для предварительного виртуального скрининга вследствие своей высокой скорости, однако окончательное решение в пользу той или иной молекулы должно производиться после анализа результатов докинга. Кроме того, метод докинга является наиболее приемлемым для идентификации новых потенциальных ингибиторов, заметно отличающихся от известных ингибиторов GSK-3.

## 2.2.4. Виртуальный скрининг библиотеки ZINC

#### 2.2.4.1. Библиотека соединений

Залогом успеха виртуального скрининга является использование максимально большой и разнообразной библиотеки соединений; особый интерес представляет поиск среди соединений, которые были ранее синтезированы. Наибольшей библиотекой такого сорта является ZINC [224], которая содержит более 13 миллионов пространственных структур коммерчески доступных либо описанных в литературе соединений. Докинг всего этого набора соединений нерационален с точки зрения производительности вычислений и эффективности скрининга по нескольким причинам. Во-первых, значительное число соединений в данной библиотеке принадлежит к сериям аналогов, характерным для коллекций соединений фирм-поставщиков, а также встречается существенное число дубликатов. Во-вторых, в библиотеке ZINC содержится множество соединений, обладающих слишком большой молекулярной массой либо избыточной конформационной подвижностью, что приводит к завышенной оценке программами докинга их способности к связыванию, а также значительно увеличивает среднее время, требуемое для обработки одной молекулы. В то же время основная цель виртуального скрининга состоит в идентификации ведущих соединений, пригодных для дальнейшей структурной оптимизации, а не в поиске окончательных кандидатов в лекарства. Вследствие всех этих фактов была проведена фильтрация библиотеки ZINC и отбор структур потенциальных соединений-лидеров.

Фильтрация базы данных осуществлялась с помощью программы FILTER 2.0.1 [209]. В данной программе используется набор разнообразных критериев, позволяющих отобрать из базы данных соединения, похожие на соединения-лидеры [225] (подробное описание см. в. гл. 5.2.1). Итогом фильтрации базы данных ZINC стала библиотека потенциальных соединений-лидеров, содержащая 1 204 522 структуры. Суммарный объём библиотеки в формате .oeb.gz составляет 4.2 Гб.

#### 2.2.4.2. Виртуальный скрининг методом докинга

Докинг подготовленной библиотеки ZINC осуществляли на вычислительном кластере с использованием программы FRED. Методика высокопроизводительного докинга приведена в гл. 5.2.4. Всего было создано 36 хитлистов для всех возможных попарных комбинаций оценочных функций (табл. 2.6). Каждый из них был подвергнут визуальному анализу в программе VIDA 4.0 [209] с целью удаления соединений, не обладающих необходимой комбинацией взаимодействий с киназой либо зафиксированных в нереалистичных конформациях. В частности, были отброшены молекулы, в которых донором и акцептором водородной связи с шарнирными аминокислотными остатками является одна и та же группировка, например, гидроксил; молекулы, формально удовлетворяющие изначальным ограничениям, однако расположенные неприемлемым образом. Оставшиеся молекулы в дальнейшем именуются «реалистичными результатами» (рис. 2.8).

После этого хитлисты были объединены и подвергнуты процедуре удаления дубликатов; окончательный хитлист состоит из 2565 соединений.

	Таблица	2.6.	Размеры	хитлистов	после	удаления	нереалистичных	ХИТОВ.
Строи	ки соответс	твую	от первичн	ой оценочно	ой функ	ции, столб	цы — вторичной.	

	Chemgauss3	OEChemScore	PLP	ScreenScore	Shapegauss	Consensus	Всего	Всего
								различных
Chemgauss3	686	112	259	375	296	355	2083	1542 (74%)
OEChemScore	772	92	199	356	203	280	1902	1200 (63%)
PLP	647	90	134	176	126	182	1355	1022 (75%)
ScreenScore	654	102	157	270	247	315	1745	1285 (74%)
Shapegauss	614	150	166	285	252	307	1774	1293 (73%)
Consensus	580	127	179	300	216	322	1724	1200 (70%)
Всего	3953	673	1094	1762	1340	1761	10583	
Всего различных	1208 (30%)	211 (31%)	417 (38%)	596 (34%)	542 (40%)	652 (37%)		2565 (24%)



Рис. 2.8. Сравнительная эффективность различных комбинаций оценочных функций. Горизонтальная ось соответствует первичной оценочной функции.

Анализируя результаты виртуального скрининга по структуре 1R0E, можно сделать несколько важных выводов. Прежде всего, наибольшее число реалистичных результатов докинга может быть достигнуто при первичном скрининге с помощью оценочной функции Chemgauss3. Причиной этого является бо́льшее число реалистичных результатов при использовании остальных оценочных функций в качестве вторичных. Использование функции Chemgauss3 в качестве вторичной оценочной функции также приводит к значительному увеличению числа реалистичных результатов.

Использование оценочной функции OEChemScore в качестве первичной и Chemgauss3 в качестве вторичной является наиболее эффективной комбинацией с точки зрения реалистичности представленных результатов. Стоит также отметить однородность результатов, получаемых с помощью OEChemScore в качестве первичной оценочной функции: среди данных результатов наименьшую долю (63%) составляют различные результаты, что свидетельствует о значительной частоте высокой оценки одних и тех же молекул вторичными оценочными функциями. Для остальных первичных функций этот показатель примерно одинаковый и составляет 70 — 75%.

Стоит отметить весьма посредственные результаты консенсусной оценки. Тем не менее, в данном случае такого результата стоило ожидать: все одиночные оценочные функции, за исключением Chemgauss3, дают от 10 до 35% реалистичных результатов. Поскольку при простой консенсусной оценке каждой функции присваивается равный вес, многие хиты, обнаруженные с помощью Chemgauss3, не получают достаточного количества высоких оценок от других оценочных функций. Впрочем, в литературе обычно рекомендуют использовать не более трёх функций при консенсусной оценке [226], поскольку использование большего их числа ухудшает производительность системы виртуального скрининга.

Диапазоны значений оценок для предварительных хитлистов (до визуального анализа) приведены в табл. 2.7. В подавляющем большинстве случаев первую позицию хитлиста (минимальное значение оценки) занимает одно и то же соединение. Столь единодушное согласие оценочных функций является следствием оптимального набора водородных связей и гидрофобных контактов, образуемых данным соединением и киназой: три водородных связи с основной цепью шарнира, а также дополнительная водородная связь с Lys85. Оценки энергии для последних соединений хитлиста близки между собой, поскольку при огромном количестве проверяемых соединений разница между оценками не очень высоко ранжированных соединений невелика (рис. 2.9). Во всех случаях порог отсечения соответствует весьма благоприятным значениям раннего обогащения, соответствующим незначительному содержанию ложных ингибиторов. Единственным исключением является функция Shapegauss, для которой максимальные значения превышают оптимальное пороговое значение (табл. 2.7), что делает её наиболее специфичной среди использованных функций.

Вторичная функция	Первичная функция	Минимум	Максимум
	Chemgauss3		-80.40
	Consensus		-78.80
Chamgause 2	OEChemscore	05.20	-80.15
Chemgausso	PLP	-93.29	-80.07
	Screenscore		-80.23
	Shapegauss		-79.37
	Chemgauss3	-50.56	-42.60
	Consensus	-49.37	-41.86
OFChamara	OEChemscore	-50.56	-42.79
OECnemscore	PLP	-50.56	-42.73
	Screenscore	-50.56	-42.59
	Shapegauss	-50.32	-42.17
	Chemgauss3		-58.74
	Consensus		-57.86
DID	OEChemscore	70.00	-59.15
PLP	PLP	/0.69	-59.14
	Screenscore		-58.93
	Shapegauss		-58.40
	Chemgauss3		-127.34
	Consensus		-125.06
Concorrection	OEChemscore	152.12	-127.25
Screenscore	PLP	155.15	-127.46
	Screenscore		-127.80
	Shapegauss	_	-124.92
	Chemgauss3		-467.79
	Consensus		-469.53
Ch	OEChemscore	510.75	-470.61
Snapegauss	PLP	-512.75	-470.39
	Screenscore		-469.86
	Shapegauss		-473.64

Таблица 2.7. Минимальные и максимальные значения оценок в хитлистах.



**Рис. 2.9. Оценки для хитлиста Chemgauss3\*Chemgauss3.** Графики для других хитлистов выглядят аналогично.

Необходимо отметить, что значительное число истинно активных соединений (более 50%) получили оценки ниже, чем использованный нами порог. В данной ситуации это не является проблемой, поскольку основная задача нашего виртуального скрининга — идентификация новых ведущих соединений, а не поиск всех возможных ингибиторов. В случае скрининга небольших баз данных основным критерием может являться качество сгенерированной ориентации молекулы в области связывания, в то время как при скрининге огромных баз данных важно ограничиться внимательным исследованием относительно небольшого набора соединений.

Для упрощения анализа окончательного хитлиста мы проводили разбиение его на кластеры родственных соединений с помощью программы LibMCS [227], которая позволяет идентифицировать максимальные общие подструктуры (MCS) в библиотеке соединений. Оптимальное соотношение количества кластеров и их населённости достигается при использовании минимального размера MCS, равного 8 атомам, и пяти уровней глубины. Хитлист отличается достаточно высоким химическим разнообразием: имеется 79 кластеров верхнего уровня, а общее число кластеров составляет 543, при этом всего 16 кластеров состоят из единственного соединения (рис. 2.10). Ро-

дительские структуры кластеров, упорядоченные по населённости, приведены на рис. 2.11 и 2.12. Наиболее населённый кластер (558 соединений) соответствует фрагменту этилбензола, следом за ним идут фрагменты анизола (334 соединения) и N-метиланилина (284 соединения). Многие представители этих кластеров, в особенности первого из них, не могут быть сгруппированы в чётко выделяемые структурные классы в силу отсутствия близких аналогов в хитлисте. Кластеры 64 — 79 состоят из единственного представителя. Каких-либо закономерностей, связывающих высокие оценки с расположением в определённой ветви, выявить не удалось вследствие высокого разнообразия предложенного хитлиста. Единственное утверждение, которое можно считать достаточно надёжным, гласит, что для некоторых небольших ветвей (к примеру, 32, рис. 2.11) характерны высокие оценки.



**Рис. 2.10. Разбиение хитлиста докинга на кластеры.** Пять уровней соответствуют глубине дерева: на нижнем уровне находятся отдельные соединения, на верхнем — 79 кластеров верхнего уровня.



**Рис 2.11. Родительские структуры кластеров 1** — **40.** Число элементов кластера указано после ElementCount.



Рис 2.12. Родительские структуры кластеров 41 — 79. Число элементов кластера указано после ElementCount.

Мы приведём лишь наиболее интересные и перспективные для дальнейшей оптимизации соединения, а также хиты, получившие наивысшие оценки отдельных оценочных функций (табл. 2.8). Особый интерес представляют также соединения, имеющие дополнительные водородные связи помимо установленных в ограничениях, а также взаимодействующие с карманом между Leu132, Lys85 и Met101. Небольшой гидрофобный заместитель в этом кармане позволяет создавать селективные относительно CDK ингибиторы, поскольку в позиции 132 CDK несут остаток фенилаланина, объём боковой цепи которого больше, чем у лейцина.

Номер	Структура	Кла-	Способ связывания
		стер	
64	ны странования с странования	1	
65	н <sub>з</sub> с , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	4	
66	Кит Chemscore, проходит по <i>ОТ</i> остальных функций, гидрофобное взаимодействие с Leu132	5	

Таблица 2.8. Результаты виртуального скрининга, основанного на структуре белка.





2.2.4.3. Виртуальный скрининг по фармакофорной гипотезе

При скрининге библиотеки соединений, описанной в разд. 2.2.1, размер хитлиста был установлен равным 5000 соединений. Последнее соединение хитлиста имеет значение TanimotoCombo = 0.440, пороговое значение 0.452 отсекает 2580 соединений, а значение 0.530 — 14 соединений. Максимальное значение подобия составляет 0.561 для соединения **73**. Соединения с более высоким подобием составляют лишь 11% истинно активных соединений (рис. 2.7), что позволяет сделать вывод о вероятном высоком обогащении хитлиста.

Ни одно соединение из отобранных не содержит все три важных элемента, не выходя при этом за пределы фармакофорной области пространства и заполняя относительно большую её часть. Следствием этого являются в целом невысокие значения молекулярного подобия для этих соединений. В то же время среди известных ингибиторов такие соединения есть, что заставляет исследователя не останавливаться на достигнутом. Наиболее рациональными выглядят две стратегии дальнейшего дизайна:
(1) введение дополнительных доноров/акцепторов водородной связи в циклах при наличии гидрофобного элемента и (2) введение гидрофобных заместителей в соединения, содержащие необходимую систему доноров/акцепторов водородной связи. Введение дополнительных доноров/акцепторов в циклах необходимо потому, что соединения с избыточной конформационной подвижностью имеют большие шансы взаимодействия со многими побочными мишенями в разных конформациях, что может иметь непредсказуемые последствия.

Анализ химического разнообразия результатов фармакофорного поиска (рис. 2.13) также проводился с использованием программы LibMCS. Оптимальное соотношение числа кластеров и их населённости достигается при использовании 5 уровней глубины и минимального размера общей подструктуры в 7 атомов: при этом имеется 64 кластера верхнего уровня, а общее число кластеров составляет 436. Более половины соединений относится к кластеру 1 (родительская структура — толуол), и более 80% соединений относится к первым трём кластерам (рис. 2.14). Двенадцать кластеров состоят из единственного соединения. При использовании параметров, аналогичных таковым для результатов докинга (5 уровней, 8 атомов в MCS), число родительских структур оказывается равным 98, а общее число кластеров — 655. Из этого следует, что химическое разнообразие фармакофорного хитлиста меньше, чем химическое разнообразие результатов докинга, поскольку при увеличении хитлиста в 1.94 раза общее число кластеров увеличивается лишь в 1.61 раза, а число родительских структур — в 1.57 раза, что свидетельствует о более высокой консервативности результатов BC по фармакофорной гипотезе по сравнению с докингом.



Рис. 2.13. Разбиение фармакофорного хитлиста на кластеры. Глубина дерева составляет 5 уровней.



Рис. 2.14. Родительские структуры кластеров результатов фармакофорного поиска. Число элементов кластера указано после ElementCount.

В таблице 2.9 приведены структуры наиболее высоко оцененных соединений, а также пример молекулы, содержащей все четыре важных фармакофорных элемента. Стоит отметить, что ни одна из приведённых здесь молекул не содержит донорных либо акцепторных фармакофорных элементов, важность которых невелика (6 крас-

ных и синих решётчатых шаров в нижней части рисунка). Данные взаимодействия не являются ключевыми для активности и соотносятся с наличием соответствующих группировок в шаблонных молекулах. Тем не менее, их наличие могло бы увеличить подобие и потенциальную активность, поскольку в данной фармакофорной гипотезе оставлены лишь те фармакофорные особенности, которые соответствуют определённым взаимодействиям с киназой. Таким образом, данные фрагменты позволяют планировать дальнейшую оптимизацию предложенных соединений лидеров с целью создания более специфичных структур.



Оценка	Номер	Кластер	Структура	Наложение на фармакофор				
0.561	73	1	СН3 СН3 ССI Отсутствует один из важных донорных атомов, небольшой объём					
0.547	74	22	н <sub>3</sub> с (H <sub>3</sub> ) н <sub>3</sub> с (H <sub>3</sub> ) (H <sub>3</sub> с) (H <sub>3</sub> ) (H <sub>3</sub> c) (H <sub>3</sub> c					

Оценка	Номер	Кластер	Структура	Наложение на фармакофор
0.543	75	3	н <sub>3</sub> с н <sub>3</sub> с отсутствует донорный атом	
0.542	76	22	неправильная ориентация донора; донорная позиция занята пиримидиновым фрагментом	
0.542	77	1	*H <sub>2</sub> N , S , NH нN , S , Br Акцептор вместо донора	
0.538	78	20	он н <sub>3</sub> с Донорная позиция занята пиримидиновым фрагментом	

Оценка	Номер	Кластер	Структура	Наложение на фармакофор			
0.537	79	15	н <sub>3</sub> с ни сн <sub>3</sub> н <sub>3</sub> с с ни сн <sub>3</sub> н <sub>3</sub> с сн <sub>3</sub> н <sub>3</sub> с сн <sub>3</sub> в сн <sub>3</sub> н <sub>3</sub> с сн <sub>3</sub>				
0.534	80	9	Калый объём, гидрофобный фрагмент удалён, однако полициклический фрагмент весьма перспективен				
0.533	81	1	сн <sub>3</sub> н ссі вг Отсутствие донора				
0.532	82	9	Сн <sub>3</sub> Малый объём, гидрофобный фрагмент удалён, однако полициклический фрагмент весьма перспективен				

Оценка	Номер	Кластер	Структура	Наложение на фармакофор
0.531	83	52	Вr н <sub>3</sub> с – N – , , , , , , , , , , , , , , , , ,	
0.531	84	1	н <sub>3</sub> с, сн <sub>3</sub> н <sub>3</sub> с, сн <sub>3</sub> Отсутствие донора, слишком высокая конформационная подвижность	
0.493	85	31	ни у в с необходимые взаимодействия имеются, однако объём слишком мал	

### 2.2.4.4. Виртуальный скрининг методом одноклассовой классификации

Ключевая особенность скрининга по нейросетевой модели с использованием одноклассового классификатора состоит в том, что никакие молекулярные особенности, важные для связывания, не задаются в явном виде при обучении модели. Единственный способ настройки модели — использование специальным образом сконструи-

рованных обучающих выборок; ограничением такого подхода является необходимость использования контроля при обучении, что требует использования объёмистых выборок. Другая проблема возникает при обучении модели на соединениях, принадлежащих к одному структурному классу: в таком случае модель позволяет лишь отличить соединения этого класса от всех остальных, что малопригодно для широкомасштабного виртуального скрининга. Наиболее надёжен вариант обучения модели на основе всех структур истинно активных соединений, что позволяет провести её всестороннюю внутреннюю валидацию.

Данный метод является наиболее консервативным из всех, использованных в данной работе, поскольку позволяет отбирать лишь соединения, обладающие относительно высоким подобием обширным классам известных ингибиторов. Всего было отобрано 8757 соединений, для которых значение индекса Танимото превышает пороговое значение 0.400, из них у 435 Tanimoto > 0.5, а у шести — > 0.6. Эти шесть соединений приведены в таблице 2.10. Нетрудно заметить, что у первого соединения в списке (**86**) отсутствует киназный фармакофор (высокий уровень подобия достигается вследствие наличия фрагментов индола и малеимида), соединения **88** — **90** являются амидами  $\alpha$ , $\beta$ -непредельных карбоновых кислот (амидная связь — единственный фрагмент потенциального киназного фармакофора) и обладают высокой конформационной подвижностью, а соединение **91** — известный ингибитор GSK-3 $\beta$  алоизин (раздел 1.4.1). Таким образом, применение одноклассового классификатора в качестве единственного метода виртуального скрининга не выглядит оправданным; более рациональный подход — сочетание классификатора с фармакофорным поиском либо докингом.

79

**Таблица 2.10.** Примеры хитов, идентифицированных с помощью одноклассового классификатора

Tanimoto	Номер	Структура
0.648	86	H <sub>3</sub> C N NH
0.639	87	HO N HO H <sub>3</sub> C
0.622	88	
0.614	89	OH HO NH H
0.614	90	HO HO HO
0.610	91	HN N

#### 2.2.4.5. Перекрёстный виртуальный скрининг

Использование трёх принципиально различных методов виртуального скрининга неизбежно приводит к вопросу: идентифицируются ли с их помощью одни и те же соединения? Для ответа на этот вопрос мы провели перекрёстный виртуальный скрининг, суть которого заключалась в скрининге хитлистов, сформированных с помощью

каждого метода, с помощью моделей двух других методов. Хиты разных методов отбирали по принципу превышения ОТ оценки; в случае докинга достаточным условием считали превышение ОТ хотя бы для одной из оценочных функций. Вследствие довольно строгих ограничений в каждой из моделей степень пересечения хитлистов достаточно невелика (рис. 2.15). Наименьшей степенью пересечения отличается одноклассовый классификатор. Причиной такого поведения является значительное число соединений, не содержащих комбинаций фармакофорных элементов, необходимых для удачного докинга либо наложения на фармакофорную гипотезу. При докинге соединений, отобранных с помощью этого классификатора, лишь два из них получили приемлемые оценки от трёх оценочных функций из пяти использованных (Chemgauss3, OEChemscore, ScreenScore); остальные хиты получили приемлемые оценки от меньшего числа функций. Напротив, пересечение хитлистов, полученных после докинга и фармакофорного поиска, довольно значительно. Ограничения, использованные при докинге, не полностью комплементарны фармакофорной гипотезе: при докинге требуется наличие двух водородных связей, в то время как фармакофорная гипотеза приветствует наличие системы из трёх водородных связей и занижает оценки тем соединениям, которые имеют лишь две из них. В то же время некоторые соединения, обладающие необходимой комбинацией фармакофорных элементов, достаточно малы и вследствие этого не могут получить высокие оценки при докинге (например, 85, табл. 2.9). Тем не менее, стремиться к более высокой степени пересечения хитлистов, полученных разными методами, не следует. Интересные соединения-лидеры могут быть идентифицированы с помощью любого метода, требуется лишь отсев заведомо неприменимых либо слишком тривиальных структур. Критерий отсева можно сформулировать следующим образом: необходимо, чтобы можно было осуществить успешный докинг предлагаемого соединения в одну из доступных структур киназы без использования структурных ограничений, результатом которого является реалистичная структура комплекса (см. раздел 2.2.4.2). Этот критерий важен не только для систем виртуального скрининга, основанных на структурах известных ингибиторов, но и для докинга со структурными ограничениями, поскольку с его помощью может быть предложена реалистичная структура, не воспроизводимая иными методами.



**Рис. 2.15. Число хитов для различных методов оценки.** Хиты попадают в пересечение, если оценка для обоих методов превосходит оптимальное пороговое значение *OT*.

Два соединения (92, 93) оцениваются как вероятные ингибиторы всеми тремя использованными методами (табл. 2.11). Эти ингибиторы близки к некоторым описанным ранее ингибиторам [144, 160], однако не являются их полными аналогами. Оба соединения образуют три необходимых водородных связи с шарнирной областью и имеют необходимый заместитель для взаимодействия с гидрофобной областью рядом с остатком Leu132. Интересно, что в наложении на фармакофор аминопиразолопиримидиновый фрагмент обеих молекул находится в одной и той же ориентации, а в структурах комплексов, предложенных с помощью докинга, — в различных, повёрнутых друг относительно друга на 180°. Это различие возникает вследствие разницы в объёмах заместителей: азепановый фрагмент второго соединения не может быть принят в гидрофобную полость рядом с Leu132 в отличие от 4-метилпиперидинового фрагмента первого соединения. Как следствие, всеми оценочными функциями за исключением Chemgauss3 второе соединение оценивается ниже. Благодаря взаимодействию с данной полостью можно предположить, что эти соединения будут селективны по отношению к CDK; для достижения же более высокой аффинности можно исследовать родственные гетероциклы и другие подобные соединения.



Таблица 2.11. Соединения, получившие приемлемые оценки всеми тремя методами.

Интересно отметить, что большинство соединений, положительно оцененных более чем одним способом, не получили высоких оценок. Причиной такого поведения является тот факт, что высокая оценка каким-то из методов означает лишь, что соединение чрезвычайно хорошо подогнано под условия, сформулированные в модели, построенной этим методом. В частности, ни одно из миллионов соединений не имеет оценки Tanimoto одноклассового классификатора выше, чем 0.65, в то время как среди соединений обучающей выборки максимальная оценка составляет 0.92. Аналогичная ситуация наблюдается для фармакофорной гипотезы, согласно которой максимальная оценка для истинно активного соединения составляет 0.739, а для наилучшего из хитов ZINC (73) — 0.561. Достижение максимально возможной оценки не обязательно приведёт к созданию соединения с необходимыми свойствами или хотя бы обладающего достаточной новизной. С другой стороны, при докинге лучшие значения оценочных функций для ZINC примерно соответствуют лучшим значениям для истинно активных соединений, что связано с возможностью удовлетворения требуемым характеристикам даже для достаточно сильно отличающихся от известных ингибиторов молекул. Таким образом, предложенные соединения отличаются структурной новизной, поскольку их подобие известным ингибиторам относительно невелико, и в то же время с высокой статистической достоверностью могут являться ингибиторами GSK-3.

#### 2.3. Неконсервативный виртуальный скрининг

Методы неконсервативного виртуального скрининга не требуют или не могут быть подвергнуты строгой статистической валидации. При использовании таких методов обычно стоит задача нахождения потенциальных ингибиторов, обладающих максимальной молекулярной новизной. Как следствие, дальнейшие действия по дизайну конкурентных ингибиторов на их основе имеет смысл предпринимать только после экспериментального доказательства их эффективности *in vitro*.

Мы использовали два метода неконсервативного скрининга: поиск по наличию подструктуры и поиск по электростатическому подобию.

#### 2.3.1. Поиск по наличию подструктуры

Ключевой вклад во взаимодействие ингибитора с киназой вносят водородные связи с основной цепью шарнирной области. Наиболее активные ингибиторы ряда индирубинов, а также химениальдизин (**35**, рис. 2.16), образуют три водородных связи с основной цепью остатков Asp133 и Val135. Минимальная структура, комплементарная данному фрагменту, выделена красным цветом на рис. 2.16А и представляет собой фрагмент глицинамида. Мы провели поиск соединений, содержащих такой фрагмент, в базе соединений, поставляемых компанией Asinex (372 187 структур). Скрининг данной библиотеки проводился без предварительной фильтрации, поскольку все соединения библиотеки доступны для приобретения и дальнейшего проведения биологических испытаний.



**Рис. 2.16. Взаимодействие химениальдизина и GSK-3.** А) Структура химениальдизина. Фрагмент, взаимодействующий с шарниром, выделен красным. Б) Способ связывания химениальдизина и GSK-3 (результат докинга AutoDock 4.01).

В ходе подструктурного поиска было идентифицировано 34323 соединения, обладающих соответствующим фрагментом, причём 1378 из них имеют по протону на каждом из атомов азота. Поскольку их химическое разнообразие весьма велико, а наличие искомой подструктуры не коррелирует с её расположением в молекуле и формой молекулы, был проведён докинг хитов в структуру 1R0E (гл. 2.2.2). Результаты докинга были получены для 834 соединений, для остальных хитов не было обнаружено допустимых ориентаций. Дополнительное внимание было уделено соединениям, в которых глицинамидный фрагмент входит в состав полициклической системы.

Подавляющее большинство хитов, извлечённых из базы Asinex, содержит глицинамидный фрагмент в качестве линкера, соединяющего ароматические группировки. Поскольку при подготовке базы данных к скринингу не производилась предварительная фильтрация, среди хитов имеется немалое количество крупных и конформационно подвижных молекул, а также многочисленные спироциклические соединения (табл. 2.12). Эти соединения представляют значительный интерес, поскольку ранее не были предложены спироциклические ингибиторы GSK-3; тем не менее, требуется некоторое изменение их структуры для достижения необходимых значений оценочных функций, в частности, изменение относительного расположения некоторых заместителей. Значительный интерес в качестве ведущих соединений представляют небольшие полициклические соединения, обладающие необходимым фармакофором. В силу своего небольшого молекулярного объёма они не получают высоких оценок программами докинга, однако при добавлении необходимых заместителей оценка их энергии связывания значительно улучшается. Необходимые заместители могут быть заимствованы из других высоко ранжированных соединений, например, 99, несущего карбонильную группу, вступающую в водородную связь с Asn185. Само соединение 99 может оказаться неактивным, поскольку в предлагаемой конформации в нём имеется цис-амидная связь. Тем не менее, небольшие изменения в его структуре (добавление соответствующего цикла) должны привести к соединению с благоприятной конфигурацией

Номер	Структура	Способ связывания
94	о	
95	Приемлемые оценки PLP, Chemgauss3, Screenscore и OEChemscore. Высокая конформационная подвижность.	
96	Приемлемые оценки Shapegauss, PLP, Chemgauss3, Screenscore. Водородная связь с Туr134. Высокая конформационная подвижность.	

Таблица 2.12. Некоторые хиты из библиотеки Asinex, содержащие глицинамидный фрагмент.

Номер	Структура	Способ связывания
97	$h_{HN}$ $f_{H}$ $f_$	
98	цис-амидная связь.	
99	$H_3C_{4}$ $G_{4}$ $H_{1}C_{5}$ $H_{1}$ $H_{1}C_{4}$ $H_{1}$	

# 2.3.2. Фармакофорный поиск по электростатическому подобию

Методология ROCS сама по себе не позволяет учитывать электростатические свойства молекул. В то же время электростатический потенциал является одной из важнейших характеристик молекулы, определяющей возможность её связывания с биомишенью. Мы провели виртуальный скрининг базы данных ZINC, подготовленной как описано в разделе 5.2.1, с целью нахождения аналогов одного из самых активных ингибиторов GSK-3, химениальдизина. Особенностью данной молекулы является специфическое электростатическое поле, возникающее благодаря наличию значительного числа гетероатомов (рис. 2.17).



**Рис. 2.17. Электростатическое поле молекулы химениальдизина.** Заряды на атомах расставлены по схеме MMFF94.

На первой стадии была подготовлена фармакофорная гипотеза ROCS, соответствующая данной структуре, после чего было проведено фильтрование библиотеки по подобию данной гипотезе. Всего было идентифицировано 85 000 соединений (по 500 хитов для каждой из 170 частей библиотеки), которые были в дальнейшем профильтрованы согласно электростатическому подобию молекуле химениальдизина с помоцью программы EON [209]. Поскольку объём молекулы химениальдизина невелик по сравнению с многими другими ингибиторами GSK-3, распределение её электронной плотности значительно отличается от большинства других ингибиторов и не позволяет провести статистическую валидацию данного фильтра. Тем не менее, молекулы близкого размера и с близким распределением электростатического потенциала должны проявлять сходные свойства, что делает оправданным применение данного метода.

Наиболее высоко оцененные результаты фильтрования по электростатическому

подобию представлены на рис. 2.18. Общий размер хитлиста EON составляет 1830 структур. В данном случае высокая оценка достигается благодаря значительному подобию в области аминоимидазолонового фрагмента; при этом подобие в области взаимодействия с шарниром значительно меньше из-за отсутствия в базе аналогов соответствующей циклической системы. Тем не менее, для некоторых из этих молекул возможно взаимодействие с шарниром вследствие образования водородных связей СН…О.



Рис. 2.18. Некоторые результаты фильтрования по электростатическому подобию молекуле химениальдизина.

Кроме того, возможно наличие молекул, взаимодействующих с шарниром, среди более низко оцененных соединений. Для проверки последнего утверждения был проведён докинг хитлиста EON в структуру киназы 1R0E, в результате чего был получен хитлист, состоящий из 831 молекулы. Структуры наиболее высоко оцененных хитов данного докинга приведены на рис. 2.19, из которого следует, что определённым электростатическим подобием обладают даже весьма непохожие на структуру шаблона молекулы, которые могут быть использованы в качестве ведущих соединений для дальнейшей оптимизации. Большая часть молекул, похожих на химениальдизин, обладает небольшим молекулярным объёмом, что делает их оценки для докинга также небольшими. Наиболее интересен тот факт, что многие хиты данного докинга (например, те, которые приведены в первой строке рис. 2.19) были также идентифицированы при виртуальном скрининге путём докинга (раздел 2.2). Таким образом, наблюдается конвергенция результатов виртуального скрининга, основанного на структуре киназы и структурах лигандов, что позволяет сделать вывод о надёжности предлагаемых результатов.



Рис. 2.19. Некоторые хиты, идентифицированные путём докинга хитлиста EON.

## 2.4. Количественные соотношения «пространственная структура — активность» для конкурентных ингибиторов GSK-3

Моделирование количественных соотношений «пространственная структура — активность» (3D-QSAR) проводилось методами сравнительного анализа молекулярного подоных полей (CoMFA [175]) и сравнительного анализа индексов молекулярного подобия (CoMSIA [176]) для наиболее обширных серий конкурентных ингибиторов GSK-3. Предпочтение отдавалось данным, полученным в одной лаборатории, что позволяло использовать для построения модели значения IC<sub>50</sub> без предварительной обработки. В случае серии малеимидов значения IC<sub>50</sub> были получены из разнородных источников, вследствие чего был осуществлён пересчёт значений IC<sub>50</sub> в значения констант ингибирования ( $K_i$ ) при помощи уравнения Ченга — Прусоффа [206]. Моделирование проводилось средствами программного комплекса SYBYL 8.0 [217]; пространственные структуры соединений выборок генерировались с помощью ConCoord 8.0. Наложение молекул проводилось по общему фрагменту. С целью построения более надёжных моделей во всех случаях был проведён анализ влияния метода расчёта частичных атомных зарядов на статистические параметры модели (подробное описание см. в гл. 5.1). При оценке предсказательной способности моделей мы руководствовались коэффициентами корреляции скользящего контроля  $q^2$ .

#### 2.4.1. Моделирование 3D-QSAR для серии алоизинов

Алоизины — серия соединений (рис. 2.20), обладающих ингибиторной активностью по отношению к киназам CDK1, CDK2, CDK5 и GSK-3 [141]. Простота выделения общего фрагмента и однородность серии делают её пригодной для анализа методами CoMFA и CoMSIA, несмотря на относительно узкий диапазон активности соединений выборки (pIC<sub>50</sub> 4.07  $\div$  7.00).



Рис. 2.20. Алоизины. А) Общая формула; Б) 100.

При анализе выборки методом CoMFA было обнаружено, что соединение **100** представляет собой выброс при использовании многих зарядовых схем, в связи с чем данное соединение было исключено из выборки, и дальнейший анализ производился без его учёта. Результаты анализа приведены в таблице 2.13. Оптимальными статистическими параметрами обладает модель, построенная с использованием зарядов RESP; среди более простых методов расчёта атомных зарядов выделяется схема КСМ.

Заряды	Г-Х	MMFF	КСМ	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	2	3	4	4	3	3	4	4	4	4
$Q^2$ (LOO)	0.345	0.464	0.485	0.485	0.222	0.489	0.506	0.503	0.506	0.429
$Q^2$ (CV)	0.306	0.423	0.445	0.440	0.247	0.392	0.461	0.483	0.447	0.396
$R^2$	0.717	0.858	0.883	0.890	0.774	0.876	0.896	0.897	0.889	0.875
S	0.328	0.237	0.218	0.212	0.296	0.220	0.206	0.205	0.213	0.225
F	(2;32) 40.572	(3;31) 62.266	(4;30) 56.356	(4;30) 60.445	(3;30) 34.223	(3;31) 73.321	(4;30) 64.359	(4;30) 65.111	(4;30) 59.946	(4;30) 52.683

**Таблица 2.13.** Результаты анализа CoMFA для выборки алоизинов с исключённым выбросом  $(N = 34)^3$ .

3 Здесь и далее в таблицах жирным шрифтом выделены оптимальные значения статистических параметров. *N* — число соединений, использованных для построения модели; *n* — число параметров модели, *Q*<sup>2</sup> (LOO) — коэффициент корреляции скользящего контроля методом исключения по одному, *Q*<sup>2</sup> (CV) — коэффициент корреляции скользящего контроля, *R*<sup>2</sup> — коэффициент корреляции модели, *S* — стандартная ошибка прогноза, *F* — критерий Фишера (*N*, *n*). Результаты анализа CoMSIA менее однозначны (табл. 2.14). Несмотря на отсутствие статистических выбросов в данном случае, статистические параметры заметно разнятся для различных схем расчёта атомных зарядов. Коэффициенты корреляции скользящего контроля оптимальны для зарядовой схемы AM1-BCC и значительно превосходят соответствующие коэффициенты для других зарядовых схем. В то же время  $R^2$  максимален, а стандартная ошибка минимальна для схемы DENR, что является следствием переучивания модели. Общая значимость модели, оцениваемая критерием Фишера, практически идентична для схем MMFF и AM1-BCC.

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	5	5	9	7	4	9	5	5	8	4
$Q^2$ (LOO)	0.080	0.097	0.072	0.364	0.268	0.099	0.046	0.075	0.190	0.207
$Q^2$ (CV)	0.053	0.033	0.086	0.361	0.244	0.115	0.061	-0.007	0.017	0.166
$R^2$	0.802	0.871	0.927	0.910	0.804	0.932	0.856	0.862	0.916	0.784
S	0.306	0.231	0.186	0.199	0.278	0.180	0.244	0.235	0.196	0.284
F	(5;30) 24.328	(5;30) 40.433	(9;26) 36.765	(7;28) 40.360	(4;30) 30.684	(9;26) 39.418	(5;30) 35.614	(5;30) 37.507	(8;27) 36.900	(4;31) 30.662

**Таблица 2.14.** Результаты анализа CoMSIA для выборки алоизинов (N = 35).

Вследствие ограниченности разнообразия заместителей в положениях 2 и 3 пирролопиридазинового фрагмента молекулярные поля окружают противоположную часть молекулы (рис. 2.21). Наиболее однозначная картина вырисовывается в случае модели CoMFA: благоприятным для увеличения активности будет наличие объёмистого заместителя в положении 7 и отрицательно заряженного заместителя в *пара*-положении фенила. В случае, если связывание алоизина определяется образованием водородных связей между шарнирной областью и пирролопиридазиновым фрагментом, данные заместители соответствуют заполнению рибозного кармана и взаимодействию с Arg141 соответственно. Молекулярные поля модели CoMSIA соответствуют тем же взаимодействиям.



**Рис. 2.21. Молекулярные поля для алоизинов.** а) Молекулярные поля модели CoMFA<sup>4</sup> с зарядами RESP; б) и в) молекулярные поля модели CoMSIA<sup>5</sup> с зарядами AM1-BCC.

#### 2.4.2. Моделирование 3D-QSAR для серии индирубинов

Индирубины — ингибиторы циклин-зависимых киназ и GSK-3, впервые выделенные из традиционного китайского противоракового лекарства. Структура индирубинов родственна структуре индиго, однако данные соединения имеют красную либо пурпурную окраску, из-за чего и получили своё название. Соединения данного ряда часто обладают значительной ингибиторной активностью (pIC<sub>50</sub> до 8.66) благодаря прочному связыванию с шарнирной областью киназы, с которой они образуют три водородных связи.

На рис. 2.22 приведена структура общего центрального фрагмента выборки индирубинов (N = 85) [74, 117-120]. Различные заместители в соединениях выборки имеются в положениях 1, 5, 6, 3', 5', 6'. Данная ситуация несколько ограничивает применимость модели для предсказания активности новых ингибиторов, поскольку особый интерес должны представлять ещё не исследованные соединения с заместителями в позициях 4 и 4', однако некоторые выводы всё-таки удаётся сделать.



**Рис. 2.22. Индирубины.** А) Подструктура, использованная для построения выравнивания; Б) соединение **101**.

<sup>4</sup> Цветовое кодирование для моделей CoMFA: красный — в данной области пространства предпочтителен отрицательный заряд в молекуле ингибитора, синий — предпочтителен положительный заряд в молекуле ингибитора, жёлтый — нежелательно наличие заместителя, зелёный — желательно наличие заместителя.

<sup>5</sup> Цветовое кодирование для моделей CoMSIA: стерические и электростатические дескрипторы — аналогично CoMFA, голубой — предпочтительно наличие донора водородной связи, фиолетовый — предпочтительно его отсутствие, серый — предпочтительно уменьшение гидрофобности, сине-зелёный — предпочтительно увеличение гидрофобности, пурпурный — предпочтительно наличие акцептора водородной связи, оранжевый — нежелательно наличие акцептора водородной связи.

Для соединения **101** все модели предсказывают завышенную активность, вследствие чего данное соединение было исключено из обучающей выборки. При моделировании CoMFA наилучшие статистические параметры моделей достигаются с использованием зарядовой схемы Гастайгера — Хюккеля, причём число компонентов в данной модели превышает число компонентов в других моделях вдвое; иными словами, улучшение статистических параметров происходит за счёт избыточного усложнения модели (табл. 2.15). Как следствие, значение критерия Фишера для данной модели одно из самых низких; оптимальное соотношение внутренней предсказательной способности и значимости моделей достигается при использовании зарядовых схем DENR и MMFF94.

**Таблица 2.15.** Результаты анализа CoMFA для выборки индирубинов с исключённым выбросом (N = 84).

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	10	6	5	6	5	6	6	6	5	5
$Q^2$ (LOO)	0.473	0.430	0.435	0.434	0.327	0.458	0.360	0.370	0.332	0.332
$Q^2$ (CV)	0.492	0.408	0.417	0.398	0.284	0.441	0.330	0.350	0.314	0.319
$R^2$	0.848	0.803	0.769	0.806	0.739	0.800	0.800	0.800	0.793	0.787
S	0.419	0.464	0.500	0.461	0.542	0.471	0.480	0.480	0.483	0.490
F	(10;72) 40.185	(6;76) 51.677	(5;77) 51.167	(6;76) 52.611	(5;69) 39.086	(6;75) 49.909	(6;69) 46.223	(6;69) 46.643	(5;70) 53.763	(5;70) 51.850

При моделировании CoMSIA наблюдаются значительные различия между схемами расчёта зарядов как в количестве компонентов модели, так и в значениях статистических параметров (табл. 2.16). В частности, модель с зарядами Малликена обладает лучшей описательной способностью, модель с зарядами DENR — внутренней предсказательной способностью, а с зарядами AM1-BCC — статистической значимостью и простотой. Для дальнейшего анализа и прогноза активности была использована модель с зарядами DENR.

**Таблица 2.16.** Результаты анализа CoMSIA для выборки индирубинов с исключённым выбросом (N = 84).

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
N	11	9	6	5	7	8	6	6	6	10
$Q^2$ (LOO)	0.431	0.468	0.459	0.429	0.395	0.535	0.389	0.390	0.367	0.412
$Q^2$ (CV)	0.408	0.467	0.432	0.406	0.396	0.533	0.389	0.368	0.348	0.402
$R^2$	0.824	0.799	0.751	0.736	0.756	0.809	0.744	0.745	0.731	0.836
S	0.454	0.479	0.521	0.534	0.532	0.466	0.542	0.541	0.555	0.446
F	(11;71) 30.165	(9;73) 32.200	(6;76) 38.294	(5;77) 42.865	(7;67) 29.608	(8;73) 38.609	(6;69) 33.485	(6;69) 39.619	(6;69) 31.307	(10;64) 33.252

Поля неблагоприятных стерических взаимодействий (рис. 2.23) окружают в моделях CoMFA и CoMSIA области молекулы, взаимодействующие с шарниром и гейткипером Leu132; последнему остатку также соответствует поле благоприятных гидрофобных взаимодействий. Области пространства между Leu132 и Lys85, которая в структурах комплексов 6-броминдирубинов с GSK-3 заполнена молекулами воды, соответствуют поля благоприятных стерических взаимодействий. Область благоприятного отрицательного заряда в молекуле индирубина, характерная для модели CoMSIA, соответствует возможному взаимодействию с Arg141. Интересно отметить, что внутри обширных полей неблагоприятного наличия донора водородной связи в модели CoMSIA находятся небольшие поля противоположного знака, что можно интерпретировать как благоприятность наличия маленького донора — аминогруппы либо гидроксила.



**Рис. 2.23. Молекулярные поля для индирубинов.** А) Молекулярные поля модели CoMFA с зарядами Гастайгера—Хюккеля; Б) и В) молекулярные поля модели CoMSIA с зарядами DENR.

#### 2.4.3. Моделирование 3D-QSAR для серии малеимидов

Бисарилмалеимиды (рис. 2.24) представляют собой один из наиболее изученных классов ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ. В частности, более 150 молекул, относящихся к этому классу, являются ингибиторами GSK-3. Особенностью ингибиторов данного класса является неоднозначность выбора биологически активной конформации без учёта структур лиганд-белковых комплексов, поскольку различные конформации бисарилмалеимидного фрагмента имеют близкие энергии, однако конформационный переход энергетически невыгоден. Впрочем, выбор конкретной конформации в данном случае не столь важен, сколь важно правильное выравнивание молекул обучающей выборки [86, 93, 94, 96, 99-101], поскольку расположение молекулярных полей относительно арильных фрагментов, а не всей молекулы в целом, играет первоочередную роль. Тем не менее, при генерации конформаций молекул выборки необходимо генерировать для всех молекул аналогичные конформации, чему было уделено особое внимание. Большинство высокоактивных бисарилмалеимидов имеет значительную разницу в размере и свойствах заместителей при арильных фрагментах. В связи с этим при наложении молекул были использованы два критерия: во-первых, совпадение координат малеимидного фрагмента, а во-вторых, расположение молекул таким образом, чтобы более тяжёлые либо разветвлённые заместители совмещались; таким образом, можно выделить больший заместитель и меньший заместитель. Макроциклические малеимиды были исключены из рассмотрения, поскольку их конформационный анализ является отдельной задачей, выходящей за рамки данного исследования.



Рис. 2.24. Бис-арилмалеимиды. А) Типичный пример; Б) 102; В) 103.

Поскольку соединения этой выборки анализировались в разных лабораториях, производился пересчёт значений активности, представленных в оригинальных исследованиях в виде IC<sub>50</sub>, в значения *K*<sub>i</sub> с использованием уравнения Ченга—Прусоффа.

Качество моделей CoMFA (табл. 2.17) для соединений этой выборки мало зависит от использования конкретной зарядовой схемы. Заметного улучшения модели можно добиться путём исключения выброса  $102 - Q^2$  (CV, DENR) = 0.635. Для дальнейшего анализа была использована именно эта модель.

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	9	13	8	8	6	13	5	11	5	5
$Q^2$ (LOO)	0.592	0.607	0.544	0.577	0.605	0.616	0.563	0.580	0.568	0.567
$Q^2$ (CV)	0.592	0.588	0.535	0.560	0.594	0.597	0.556	0.575	0.561	0.563
$R^2$	0.844	0.898	0.830	0.844	0.813	0.895	0.790	0.874	0.774	0.783
S	0.470	0.389	0.489	0.469	0.507	0.394	0.536	0.427	0.556	0.545
F	(9;97) 58.510	(13;93) 63.077	(8;98) 59.879	(8;98) 66.065	(6;100) 72.553	(13;93) 61.164	(5;101) 75.850	(11;95) 60.151	(5;101) 69.093	(5;101) 72.756

Таблица 2.17. Результаты анализа CoMFA для выборки малеимидов (N = 107).

Анализ CoMSIA дал похожие результаты (табл. 2.18) за исключением того, что число выбросов увеличилось до двух (102, 103). Несколько неожиданным оказался тот факт, что наилучшей предсказательной способностью в данном случае обладает модель с зарядами Пюльман.

**Таблица 2.18.** Результаты анализа CoMSIA для выборки малеимидов с двумя исключёнными выбросами (N = 105).

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	7	7	7	6	7	7	6	6	6	6
$Q^2$ (LOO)	0.644	0.628	0.648	0.598	0.651	0.631	0.638	0.636	0.600	0.610
$Q^2$ (CV)	0.639	0.626	0.640	0.588	0.644	0.620	0.626	0.623	0.582	0.600
$R^2$	0.869	0.858	0.849	0.831	0.857	0.863	0.851	0.850	0.831	0.840
S	0.427	0.444	0.458	0.482	0.446	0.436	0.453	0.454	0.482	0.470
F	(7;97) 91.663	(7;97) 83.983	(7;97) 77.864	(6;98) 80.263	(7;97) 82.998	(7;97) 87.406	(6;98) 92.975	(6;98) 92.488	(6;99) 91.012	(6;99) 84.380

Почти полное отсутствие зависимости от конкретной использованной зарядовой схемы подтверждается небольшим размером и вкладом электростатических полей в CoMFA и CoMSIA, а также незначительным ухудшением модели при отключении электростатического взаимодействия (рис. 2.25). Значительно сильнее на активность влияет правильное расположение заместителей при арильных фрагментах в пространстве, а также наличие доноров и акцепторов водородной связи. В частности, замещение в позициях 1 и 7 большего арильного фрагмента благоприятно для активности, а в позициях 5 и 6 — не очень, в то время как для меньшего фрагмента стерические требования ограничиваются неблагоприятностью замещения в позициях 5 и 6 и благоприятностью замещения в позициях 1 (CoMSIA) и 2 (CoMFA). Для обоих фрагментов благоприятно наличие положительного заряда в 5-м положении. Характер замещения описывается моделью CoMSIA: в меньшем заместителе рекомендуется отсутствие акцепторов водородной связи и увеличение гидрофобности, в то время как в большем заместителе оптимальным является наличие донора, присоединённого к положениям 6 или 7 гидрофобным спейсером. Для заместителей в положении 1 рекомендуется уменьшение гидрофобности.



**Рис. 2.25. Молекулярные поля для малеимидов.** А) Молекулярные поля модели CoMFA с зарядами MK-ESP; Б) и В) молекулярные поля модели CoMSIA с зарядами Пюльман.

#### 2.4.4. Моделирование 3D-QSAR для серии пауллонов

Пауллоны — один из наиболее давно известных классов ингибиторов CDK и GSK-3. Эти соединения были идентифицированы в ходе широкомасштабного скрининга, проведённого Национальным институтом рака США в 2001 году. Ключевая особенность структуры пауллонов — специфичный тетрациклический каркас (рис. 2.26). Взаимодействие с шарнирным регионом киназ опосредуется амидной группой семичленного цикла (положения 5 и 6). Для моделирования CoMFA и CoMSIA в настоящей работе была использована выборка из 77 соединений [228]. Наложение проводилось по общему фрагменту, конформации молекул соответствовали локальному минимуму энергии.





Вследствие наличия в выборке нескольких соединений, значительно отличающихся по структуре от канонического пауллона, в некоторых случаях они представляли собой статистические выбросы. Оптимальная модель была получена после исключения двух выбросов (104, 105); необходимо отметить относительную простоту модели (почти во всех случаях число компонентов PLS равно пяти), однако внутренняя предсказательная способность моделей не очень высока. Зависимость качества моделей от зарядовой схемы также относительно невелика; различные параметры оптимальны для разных зарядовых схем, однако оптимальное сочетание предсказательной способности и доступности значений зарядов наблюдается для схемы MMFF94 (табл. 2.19).

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6
$Q^2$ (LOO)	0.436	0.589	0.501	0.539	0.412	0.548	0.611	0.603	0.556	0.547
$Q^2$ (CV)	0.414	0.566	0.478	0.528	0.404	0.509	0.562	0.565	0.514	0.561
$R^2$	0.832	0.873	0.846	0.857	0.815	0.868	0.886	0.884	0.869	0.887
S	0.486	0.422	0.465	0.449	0.511	0.432	0.406	0.410	0.435	0.407
F	(5;69) 68.319	(5;69) 95.051	(5;69) 76.100	(5;69) 82.698	(5;69) 60.608	(5;69) 90.358	(5;66) 103.089	(5;66) 100.866	(5;66) 87.902	(6;65) 85.381

**Таблица 2.19.** Результаты анализа CoMFA для выборки пауллонов с двумя исключёнными выбросами (*N* = 75).

Анализ CoMSIA позволяет лучше описать выборку, что характеризуется уменьшением числа выбросов (соединение **104** возвращается в общий тренд) и увеличением значений статистических параметров (табл. 2.20). Стоит отметить, что значимость модели, выражаемая критерием Фишера, при этом уменьшается по сравнению с моделью CoMFA. Наилучшие статистические параметры в этом случае достигаются при использовании малликеновских зарядов, а среди более доступных схем расчёта — MMFF94 и AM1-BCC.

**Таблица 2.20.** Результаты анализа CoMSIA для выборки пауллонов с исключённым выбросом (N = 76).

Заряды	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	5	4	8	5	5	4	7	7	5	5
$Q^2$ (LOO)	0.578	0.601	0.480	0.605	0.536	0.549	0.621	0.617	0.615	0.647
$Q^2$ (CV)	0.553	0.592	0.473	0.595	0.519	0.526	0.606	0.601	0.605	0.626
$R^2$	0.839	0.832	0.900	0.858	0.820	0.832	0.915	0.914	0.864	0.901
S	0.494	0.500	0.398	0.462	0.521	0.500	0.369	0.371	0.460	0.367
F	(5;70)	(4;71)	(8;67)	(5;70)	(5;70)	(4;71)	(7;65)	(7;65)	(5;67)	(6;66)
	72.784	88.116	75.154	84.857	63.789	88.015	100.210	99.318	85.498	99.778

Молекулярные поля для пауллонов в целом хорошо соотносятся с их способом связывания (рис. 2.27). Предпочтение отрицательного заряда в 9-м положении молекулы коррелирует с присутствием в этой области аминокислотного остатка Lys85, заряженного положительно. Свободная аминогруппа является необходимым условием связывания, что подтверждается наличием рядом с ней стерически неблагоприятных областей. Замещение в положениях 1 и 9—12 благоприятно сказывается на активности, однако более конкретные требования на основании соединений данной выборки сформулировать не удаётся. Интересно, что практически со всех сторон от центрального фрагмента наличие акцепторов водородной связи приводит к понижению активности. Области неблагоприятного гидрофобного взаимодействия соответствуют положительно заряженным остаткам белка.



**Рис. 2.27. Молекулярные поля для пауллонов.** А) Молекулярные поля модели CoMFA с зарядами MMFF; Б) и В) молекулярные поля модели CoMSIA с зарядами Малликена; Г) Соотношение между кристаллической структурой 1Q3W и молекулярными полями CoMFA.

## 2.4.5. Моделирование 3D-QSAR для серии *N*-фенил-4-пиразоло[1,5-*b*]пиридазин-3-илпиримидин-2-аминов

Выборка *N*-фенил-4-пиразоло[1,5-*b*]пиридазин-3-илпиримидин-2-аминов (ФППП) основана на серии ингибиторов, предложенных Таваресом с соавторами [152]. Достоинством этой серии является её значительный объём и однородность данных по биологической активности. Большинство ингибиторов данной серии селективно по отношению к циклин-зависимым киназам, что позволяет учесть в неявном виде



особенности, необходимые для достижения селективности.

Выборка состоит из 70 соединений, общий фрагмент которых изображён на рис. 2.28. Авторы всесторонне исследовали соотношения «структура — активность», благодаря чему модели, построенные на основе данной выборки, отличаются высоким статистическим качеством, которое

Рис. 2.28. Общий фрагмент мало зависит от использования конкретной зарядовой схе-

мы. Оптимальная внутренняя предсказательная способность в методе CoMFA была достигнута при использовании схемы Гастайгера-Хюккеля; практически не уступает ей схема Малликена (табл. 2.21). Полный отказ от рассмотрения электростатического поля в качестве дескрипторов не приводит к сколько-нибудь заметному ухудшению модели.

ФППП	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	16	10	12	11	16	9	11	11	13	18
$Q^2$ (LOO)	0.778	0.713	0.739	0.728	0.734	0.726	0.728	0.729	0.758	0.777
$Q^2$ (CV)	0.776	0.711	0.738	0.728	0.676	0.723	0.729	0.700	0.737	0.765
$R^2$	0.983	0.968	0.974	0.973	0.982	0.959	0.973	0.973	0.978	0.984
S	0.153	0.195	0.181	0.181	0.153	0.222	0.183	0.182	0.166	0.150
F	(16;53) 186.894	(10;59) 181.205	(12;57) 175.016	(11;58) 191.208	(16;53) 185.889	(9;60) 154.084	(11;58) 187.863	(11;58) 189.623	(13;56) 193.850	(18;51) 172.349

**Таблица 2.21.** Результаты анализа СоМFA для выборки  $\Phi\Pi\Pi\Pi$  (*N* = 70).

Различия между схемами учёта зарядов более ярко проявляются при моделировании методом CoMSIA (табл. 2.22). Модель Кирхгофа, разработанная в нашей лаборатории, значительно превосходит другие в этих условиях. Отказ от учёта электростатического поля также приводит к ухудшению модели.

ФППП	Г-Х	MMFF	KCM	AM1-BCC	Пюльман	DENR	MKESP	RESP	Лёвдин	Малликен
n	14	18	18	20	16	19	13	14	14	14
$Q^2$ (LOO)	0.652	0.702	0.763	0.705	0.544	0.720	0.589	0.616	0.722	0.711
$Q^2$ (CV)	0.634	0.685	0.740	0.685	0.554	0.703	0.579	0.621	0.723	0.690
$R^2$	0.955	0.971	0.971	0.972	0.964	0.970	0.959	0.964	0.968	0.969
S	0.242	0.201	0.200	0.200	0.220	0.206	0.228	0.217	0.204	0.200
F	(14;55) 82.776	(18;51) 95.060	(18;51) 96.101	(20;49) 86.490	(16;53) 88.598	(19;50) 85.418	(13;56) 101.211	(14;55) 103.718	(14;55) 117.623	(14;55) 123.287

**Таблица 2.22**. Результаты анализа CoMSIA для выборки ФППП (N = 70).

В соответствии с малой значимостью электростатического вклада в модели CoMFA, поля электростатических взаимодействий для неё невелики (приблизительно соответствуют по размеру метильной группе), располагаются в недоступных для заместителей областях пространства и не могут быть чётко интерпретированы (рис. 2.29). Поля стерических взаимодействий свидетельствуют о благоприятном замещении во всех циклах основного фрагмента. Напротив, аналогичные поля модели CoMSIA предлагают в качестве благоприятных для замещения лишь пиразолопиримидиновый и фенильный фрагменты; благоприятность замещения в пиразолопиримидиновом фрагменте соотносится с наличием в выборке соединений с ароматическим заместителем во втором положении. В пятом и шестом положениях этой системы благоприятно наличие небольшого гидрофобного заместителя с донором водородной связи на конце. Интересно отметить поле неблагоприятного наличия донора водородной связи рядом с аминогруппой, внутри которого находится небольшое поле предпочтительного наличия донора.



**Рис. 2.29.** Молекулярные поля для ФШШ. А) Молекулярные поля модели CoMFA с зарядами Гастайгера—Хюккеля; Б) и В) молекулярные поля модели CoMSIA с зарядами КСМ.

#### 2.4.6. Прогноз активности на основе моделей 3D-QSAR

На основе анализа молекулярных полей были предложены 103 структуры новых соединений, относящихся к классам пауллонов и индирубинов. Перебор заместителей производился на основе анализа синтетической доступности и новизны соединений. Генерация структур проводилась вручную. Величина предсказанной активности для них находилась на микромолярном уровне. Для предсказания активности пауллонов была использована модель CoMFA с зарядами MMFF, а для предсказания активности индирубинов – модель CoMFA с зарядами Гастайгера — Хюккеля вследствие более высокой предсказательной способности по сравнению с моделью CoMSIA. В табл. 2.23 приведены значения pIC<sub>50</sub> для семи соединений с наибольшей предсказанной активностью.



Таблица 2.23. Прогноз активности на основе моделей 3D-QSAR.

### 2.5. Дизайн ингибиторов GSK-3 de novo

Альтернативой поиску ингибиторов в базах данных и дальнейшей их виртуальной либо химической оптимизации является автоматизированный процесс дизайна молекул *de novo*. При использовании данного метода исследователь подаёт на вход программы дизайна некую начальную структуру в комплексе с белком-мишенью, после чего программа автоматически генерирует новые производные таким образом, чтобы сделать взаимодействие лиганда с белком более выгодным. Мы использовали для дизайна *de novo* часто применяемую программу LigBuilder [229]. Поскольку при построении новых молекул программа оптимизирует значение единственной эмпирической оценочной функции, результаты построения зачастую смещены в сторону наращивания сложных алифатических заместителей, в частности, конформационно подвижных. Кроме того, при построении новых структур не проводится оценка их синтетической доступности. Примеры наименее конформационно подвижных молекул, основанных на начальных структурах пауллона и индирубин-3'-оксима, приведены в таблице 2.24. Общей тенденцией является наличие гидрофобного заместителя в положениях 8 и 9 пауллонового каркаса, взаимодействующего с Leu132. Аналогичную роль играет циклопропильный заместитель в производном индирубина. По неизвестным причинам до сих пор не были проведены биологические испытания подобных молекул.

Номер	Структура	Способ связывания
113	HO HO HS HN HN HN HN O	A83 V135 V70 L188 R141
114	H <sub>2</sub> N NH OH	V135 V135 R141
115	HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO H	A83 V135 V80 R141 N186

Таблица 2.24. Примеры молекул, предложенных с помощью дизайна de novo.

104



Таким образом, с использованием различных методов, так или иначе использующих информацию об известных ингибиторах GSK-3, конкурентных по отношению к АТФ, мы предложили структуры новых потенциальных ингибиторов. Кроме того, нами разработана схема виртуального скрининга, позволяющая идентифицировать ингибиторы GSK-3 и основанная на трёх принципиально разных методах: докинге, фармакофорном поиске и одноклассовой классификации. Данные методы обладают разной степенью консервативности, вследствие чего их совместное использование позволяет принять взвешенное решение при планировании синтеза новых соединений. Мы также построили модели 3D-QSAR для наиболее обширных и однородных классов ингибиторов GSK-3, позволяющие осуществлять планирование синтеза близкородственных соединений. Наконец, с помощью неконсервативного виртуального скрининга и дизайна *de novo* нами предллжены структуры новых соединений, предположительно являющихся ингибиторами GSK-3.

## Глава 3. Неконкурентные ингибиторы: анализ места связывания и виртуальный скрининг

К настоящему времени известны два класса неконкурентных ингибиторов GSK-3 — манзамины и тиадиазалидиноны (TDZD). Предполагают [65], что ингибиторная активность TDZD является следствием их взаимодействия с центром связывания фосфатной группы субстрата. Поскольку этот центр достаточно мал по своему объёму, необходимо исследовать соседние с ним области пространства при поиске новых неконкурентных ингибиторов. Более сложная ситуация возникает в случае



Манзамин А

манзаминов: способ связывания этих объёмистых молекул не был установлен методами рентгеновской кристаллографии, а соотношения «структура — активность» довольно отрывочны в связи со сложностью синтеза нетривиальных производных. Исходя из структуры лиганда, можно лишь предположить, что его конкуренция с фосфат-ионом субстрата маловероятна вследствие значительной гидрофобности молекулы. В связи с этим значительный интерес представляет установление предполагаемого способа связывания манзаминов и механизма неконкурентного ингибирования.

#### 3.1. Методология исследования

В качестве модельного лиганда из серии манзаминов был выбран наиболее изученный и один из наиболее активных — манзамин А. Поиск возможных мест связывания манзамина А на поверхности GSK-3 проводили по следующей схеме:

1. Генерация структур комплекса манзамин-киназа;

2. Отбор моделей комплексов, которые можно соотнести с какими-либо функциональными аналогами либо механизмами;

3. Моделирование молекулярной динамики отобранных комплексов;

4. Анализ результатов моделирования и выбор наиболее характерных структур комплексов для дальнейших исселедований;

5. Поиск новых потенциальных неконкурентных ингибиторов методом вирту-

ального скрининга.

Методики моделирования подробно описаны в гл. 5.4.

#### 3.2. Результаты моделирования

## 3.2.1. Поиск области связывания манзамина А на поверхности киназы

Методом докинга были сгенерированы 300 вариантов комплекса манзамина A с GSK-3, относящиеся к 107 различным кластерам (пороговое значение RMSD для кластера 2 Å). Населённость кластеров составляет от одной конформации на кластер до нескольких десятков, однако значительно преобладают кластеры с малой заселённостью. Типичные представители кластеров изображены на рис. 3.1А.



**Рис. 3.1.** А) Результаты докинга. Поверхность Коннолли [230] киназы окрашена согласно глубине полости (чем глубже полость, тем ближе цвет поверхности к красной области спектра). Приведены репрезентативные структуры всех кластеров возможных конформаций. Б) Структуры комплексов, выбранные для моделирования молекулярной динамики. Поверхность Коннолли киназы окрашена согласно локальной липофильности (наиболее гидрофильные области окрашены голубым цветом, наиболее гидрофобные — коричневым, промежуточные — зелёным).

На основании анализа структур комплексов и литературных данных о значимости различных аминокислотных остатков на поверхности GSK-3 были выделены пять областей, взаимодействие с которыми может повлиять на функционирование фермента. Эти области отмечены римскими цифрами на рис. 3.1Б и имеют следующие характеристики: **I.Область взаимодействия с аксином [45] и FRAT [44].** Эта область отвечает за образование комплекса между GSK-3 и белком аксином, который участвует в фосфорилировании  $\beta$ -катенина, что играет важную роль в сигнальном пути Wnt (рис. 1.2). Белок FRAT ингибирует взаимодействие аксина с киназой, что приводит к активации этого сигнального пути. Взаимодействие с этими белками не влияет на каталитическую активность киназы, однако влияние манзамина на взаимодействие с этими белками не было изучено. Поскольку создание ингибиторов взаимодействия GSK-3 с аксином и FRAT предоставляет возможность селективного по отношению к другим функциям киназы регулирования сигнального пути Wnt, было принято решение не отказываться от исследования возможности взаимодействия манзамина A с данной областью поверхности фермента.

II. Область между глициновой петлёй (остатки 62—70), петлёй С (остатки 87—97) и активационной петлёй (остатки 200—226). Данная область ограничена важнейшими структурными элементами, участвующими в процессе активации киназы [231]; в этой области находится место взаимодействия киназы с фосфатной группой субстрата. Некоторые исследователи на основании результатов докинга полагают, что именно с этим местом взаимодействуют неконкурентные ингибиторы GSK-3, относящиеся к ряду TDZD [65, 162]. Нахождение лиганда в данной области, по их мнению, приводит к нарушению взаимодействия киназы с субстратом.

III. Место связывания манзамина А по Ибрахиму с сотр. [166]. Данная область связывания была предложена по результатам докинга манзамина А в область пространства рядом с петлёй С с помощью программы GOLD [232]. Нам не удалось в точности воспроизвести структуру комплекса, предложенную в данной работе, однако ключевое взаимодействие, водородная связь между гидроксильной группой манзамина А и карбонильным кислородом остатка Arg92, было обнаружено. В большинстве случаев такая ориентация ранжируется как программой AutoDock, так и оценочными функциями CScore чрезвычайно низко.

IV. Область возможного связывания аллостерических ингибиторов. Конверсо и сотр. [233] показали, что аллостерические ингибиторы киназы Chk1

108
могут взаимодействовать с областью фермента, расположенной рядом с АТФсвязывающим карманом и отвечающей за связывание субстрата. По аналогии с этим исследованием можно предположить, что манзамины взаимодействуют с областью IV, нарушая процесс связывания субстрата с киназой. Подробного изучения возможности такого взаимодействия для киназы GSK-3 ранее не проводилось.

V.Область связывания АТФ. Предположения о возможном взаимодействии манзамина А с этой областью лишены оснований, поскольку известно, что лиганд взаимодействует с киназой по неконкурентному механизму [165]. Тем не менее, программа докинга помещает лиганд в эту область в силу её достаточного объёма и относительно высокой гидрофобности. Относительно высокие оценки этих расположений практически всеми оценочными функциями связаны в первую очередь с большой площадью контакта между белком и лигандом. Данная область была исключена из рассмотрения методом молекулярной динамики.

Области I, II, IV и V высоко ранжируются всеми оценочными функциями, использованными в работе. Остальные ориентации лиганда, найденные с помощью докинга, ранжируются значительно ниже, не соотносятся ни с какими экспериментальными данными и не позволяют построить на их основе предположений о механизме ингибирования. Поскольку молекула манзамина A обладает значительной липофильностью, программа докинга предсказывает в качестве потенциального места связывания практически любую область поверхности белка, обладающую достаточной липофильностью и имеющую форму, приемлемую для создания достаточно большой площади контакта между белком и лигандом. В связи с этим такие ориентации были признаны артефактами докинга и отброшены.

### 3.2.2. Конформационный анализ молекулы манзамина А

Молекула манзамина А представляет собой сложный полициклический каркас, соединённый с ароматическим фрагментом. Анализ конформационного поведения этой молекулы позволяет выяснить, насколько конформация молекулы, зафиксированная в кристалле [167], соответствует конформации, характерной для растворённого состояния и комплексов с киназой. Кроме того, весьма интересно исследование возможности изменения конформации лиганда при взаимодействии с белком.

#### 3.2.2.1. Конформационный анализ молекулы манзамина А

С целью исследования возможных конформационных особенностей, связанных с качественным изменением конформаций одного или нескольких циклических фрагментов, был проведён поиск альтернативных конформаций молекулы манзамина. Систематический перебор конформаций циклических фрагментов практически невозможен из-за высокой связности полициклической системы, поэтому был применён метод LMOD [234], основанный на последовательном исследовании конформационного пространства путём движения вдоль низкоэнергетических коллективных степеней свободы молекулы и эффективно использующий ограничения конформационной подвижности системы для поиска удовлетворяющих им конформаций. Результаты проведённого конформационного поиска представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1. Список конформеров манзамина А, полученных методом LMOD с использованием неявной модели воды. Приведены номера и энергии оптимальной и последней из найденных конформаций, а также для альтернативных конформаций, использованных для моделирования МД.

		Энергия	н, ккал/моль
Конформер	Конформация	до оптимизации	после оптимизации
Начальный		136.22	67.92

		Энергия	н, ккал/моль
Конформер	Конформация	до	посла оптимизации
		оптимизации	после оптимизации
1		67.38	67.38
2		68.78	68.76
25		72.06	71.88

		Энергия	н, ккал/моль
Конформер	Конформация	до	посла оптимизании
		оптимизации	после оптимизации
30		72.81	72.8
52		74.98	74.96
67		79.37	79.36

		Энергия	і, ккал/моль
Конформер	Конформация	до	
		оптимизации	после оптимизации
72		80.13	80.1
88		82.40	82.38
96		83.10	82.96
100		83.20	83.13

Найденные конформации покрывают энергетический диапазон в 16 ккал/моль. Конформация выявленного глобального минимума совпала с начальной конформацией и отвечает также конформации манзамина в кристаллическом состоянии. Поскольку конформационный поиск был проведён с использованием неявной модели растворителя, то было целесообразно провести моделирование молекулярной динамики некоторых конформеров с использованием явной модели водного растворителя. Для этого из списка были выбраны восемь разнообразных конформеров так, чтобы исследовать в процессе моделирования МД устойчивость нескольких альтернативных конформаций циклов, входящих в систему, и возможности их взаимных переходов. Например, был выбран второй конформер полного списка, соответствующий конформации манзамина в кристалле, но с карболиновым фрагментом, повёрнутым в противоположную сторону от гидроксильной группы. Фактически именно эта конформация наблюдалась при связывании лиганда в областях III и IV.

Цикл А существует в кристаллической структуре в конформации «кресло» с экваториальным расположением заместителя у атома азота. При моделировании молекулярной динамики конформера 96 полного списка, отличающегося тем, что цикл А существует в виде «ванны» с экваториальным заместителем при атоме азота, в течение 1.5 нс произошла полная трансформация в конформацию, соответствующую глобальному минимуму. С другой стороны, при моделировании динамики конформера 88 с конформацией «кресло» данного цикла, но с аксиальным положением заместителя (макроцикла D), не произошло ее перехода к более выгодному экваториальному положению заместителя, возможно, благодаря существенным конформационным ограничениям со стороны макроцикла D.

Циклогексеновый цикл В жёстко зафиксирован в конформации «ванна» и не претерпевал существенных изменений во всех случаях, несмотря на то, что для свободного циклогексенового цикла оптимальной является конформация «полукресло».

Пятичленный цикл С, довольно плотно зафиксированный сочленением с циклом В, существует в конформации «конверт», в котором один из двух атомов углерода, не содержащихся в цикле В, выходит из плоскости.

В «кристаллографической» конформации макроцикла D два из четырёх вращаемых торсионных углов, образованных парами С<sub>sp3</sub>-атомов цикла, соответствуют транс-, а другие два – гош-конформациям (табл. 3.1). Отчетливо наблюдается тенден-

114

ция структур с различными начальными конформациями максимизировать в процессе моделирования динамики число транс-торсионных углов, что приводит к конформерам цикла, лишь два торсионных угла которых соответствуют гош-конформации. Однако не для всех стартовых конформаций это стремление реализуется за время моделирования (10 нс) при комнатной температуре.

Восьмичленный цикл Е можно эффективно рассматривать как семичленный изза наличия в нем конформационно жёсткой двойной связи. Наиболее выгодна для него конформация «кресло». В результате моделирования многие траектории приходят либо к этой конформации, либо к следующей в энергетическом списке конформаций — конформации «ванна», которая за время моделирования не переходит в конформацию «кресло» при комнатной температуре.

#### 3.2.2.2. Конформационное поведение лиганда в комплексах

Для исследования поведения манзамина в связанном состоянии его координаты были выделены из траекторий молекулярной динамики, соответствующих рассмотренным выше областям I — IV. Координаты были выравнены по фрагменту из пяти атомов углерода, составляющих основание жёсткого каркаса молекулы лиганда (см. рис. 5.2). Визуальное наблюдение за подготовленными таким образом траекториями для каждой стартовой позиции позволило выявить ряд важных особенностей конформационного поведения молекулы манзамина. Общая закономерность для всех исследованных траекторий состоит в том, что конформации всех циклов, составляющих алифатический каркас, качественно не изменяются за время моделирования в выбранных условиях его проведения. Другими словами, макроциклическая конструкция является достаточно жёсткой при комнатной температуре — происходят лишь термические флуктуации геометрии вокруг локально оптимальной структуры. Важнейшие конформационные отличия проявляются в значении двугранного (торсионного) угла поворота карболинового фрагмента относительно макроциклической части молекулы и значении торсионного угла, отражающего вращение связи С-О и наличие или отсутствие внутримолекулярной водородной связи ОН… N. Поскольку во время проведения молекулярного докинга значения этих торсионных углов могли свободно варьироваться, необходимо отметить возможность образования различных конформаций при их изменении и оценить вероятность перехода между этими конформациями при

комнатной температуре в водном растворе.

Особенности конформационного поведения для каждой траектории, отвечающей отдельной области связывания, рассмотрены с помощью предложенных выше величин. В области I карболиновый фрагмент повёрнут в сторону гидроксильной группы молекулы, а внутримолекулярная водородная связь ОН… N достаточно стабильна на протяжении всей траектории. В траектории, отвечающей области II, карболиновый фрагмент также развёрнут в сторону гидроксильной группы. Важной особенностью, выделяющей эту траекторию из всех остальных исследованных траекторий, является существенная лабильность внутримолекулярной водородной связи — вплоть до часто встречаемых случаев ее нарушения. Область III характеризуется поворотом карболинового фрагмента «от» гидроксильной группы и стабильной внутримолекулярной водородной связью вопреки тому, что в начальной конформации для этой области, найденной в результате молекулярного докинга, атом водорода гидроксильной группы повёрнут в противоположную сторону от соответствующего атома азота — акцептора водородной связи. Характер внутреннего движения лиганда в области IV качественно эквивалентен движению в третьей области.

#### 3.2.2.3. Поведение лиганда в водном растворе

Для сравнения с поведением лиганда в комплексах было проведено также исследование молекулярной динамики лиганда в несвязанном состоянии. В качестве стартовой была использована конформация, наиболее близкая к конформации манзамина А в кристалле. В этой конформации карболиновый фрагмент повернут в сторону гидроксильной группы и имеется внутримолекулярная водородная связь. Координаты атомов молекулы лиганда были извлечены из траектории МД и преобразованы аналогично координатам, извлечённым из комплексов.

Характер движения лиганда в несвязанном состоянии в водном окружении схож с тем, что было отмечено для анализа траектории комплекса I: карболиновый фрагмент направлен в сторону гидроксильной группы (табл. 3.1), а водородная связь стабильна. Важно отметить, что за время моделирования (10 нс) не происходило разворота карболинового фрагмента на 180°. Причиной этого может являться как достаточно высокий энергетический барьер соответствующего конформационного изменения, так и большие характерные времена, связанные с этим движением, включающим

116

коллективное перемещение многих атомов молекулы. С другой стороны, конформации лиганда, в которых значение двугранного угла поворота карболинового фрагмента составляет ровно 0 и  $180^{\circ}$ , не самые выгодные. Большую часть времени карболиновый фрагмент повернут на  $\pm 30^{\circ}$  относительно этих значений.

Анализ конформационного поведения манзамина А в условиях водного раствора показывает, что используемая для молекулярного докинга конформация полициклической системы лиганда отвечает глобальному минимуму энергии, что оправдывает выбор процедуры докинга, методы дальнейшего моделирования и интерпретации результатов. Поведение лиганда в областях I и II схоже с поведением лиганда в свободном состоянии в водном растворе. В областях III и IV наблюдается конформация лиганда, менее вероятная при комнатной температуре (разница 1.4 ккал/моль для несольватированных конформаций отвечает соотношению 10:1).

#### 3.2.3. Моделирование молекулярной динамики комплексов

Моделирование молекулярной динамики было проведено для четырёх структур комплексов, относящихся к каждой из областей I — IV, а также для *ano*-формы GSK-3. Выбор конкретной начальной структуры осуществляли на основе консенсусной оценки программой CScore: выбирали структуру, имеющую наилучшие значения всех четырёх оценочных функций, доступных в составе пакета (см. раздел 5.4.2). Эти структуры приведены на рис. 3.1Б. Основные результаты моделирования молекулярной динамики рассмотрены ниже.

#### 3.2.3.1. Траектория молекулярной динамики апо-формы киназы

В ходе моделирования МД структура *ano*-формы GSK-3 претерпевает незначительные изменения. Движения долей киназы друг относительно друга практически отсутствуют; движение петель также малозаметно. Аминокислотные остатки Arg96, Arg145 и Lys205, ответственные за формирование центра связывания фосфатной группы субстрата, находятся в относительной близости друг от друга на протяжении всего времени моделирования; остаток Glu211 время от времени образует солевой мостик с Lys205, но не с Arg96 (ср. другие траектории), что не приводит к сближению активационной петли и С-петли. Также наблюдается водородная связь между аминокислотными остатками Gln89 и Asn95, ответственными за распознавание субстрата [64]. Можно сделать вывод, что центр связывания фосфатной группы субстрата достаточно устойчив и доступен для субстрата даже в отсутствие стабилизирующих его отрицательно заряженных ионов. Любое воздействие, дестабилизирующее этот центр, может приводить к изменению каталитической активности киназы.

Важно также отметить устойчивость глициновой петли киназы и, в частности, остатка Phe67. Эта петля играет определяющую роль в процессе взаимодействия киназы с АТФ и подготовке акта переноса фосфатной группы от АТФ к субстрату [231]. В ходе динамики наблюдаются небольшие тепловые движения петли, однако её равновесная конформация вполне устойчива и не создаёт никаких препятствий возможному взаимодействию с АТФ.

Траектория молекулярной динамики *апо*-формы киназы была использована в качестве репера для сравнения с траекториями молекулярной динамики предложенных структур комплексов манзамина А и киназы гликогенсинтазы 3.

#### 3.2.3.2. Траектория молекулярной динамики для области І

Структура комплекса GSK-3 и манзамина А в области I быстро (менее чем за 0.5 нс) стабилизируется и остаётся относительно неизменной на протяжении всего времени моделирования (рис. 3.2А). Усреднённая по траектории структура комплекса близка к исходной (рис. 3.2Б) и отличается от неё заметным (около 60°) поворотом вокруг связи между карболиновым и полициклическим фрагментами (рис. 3.2В). Карболиновый фрагмент расположен в гидрофобном кармане, образованном аминокислотными остатками Phe229, Val263, Leu266, Ile270, Pro276, Tyr288 и Phe293 (рис. 3.2Г); остаток Phe229 взаимодействует также с кольцом D лиганда. Гидроксильная группа Tyr288 может образовывать водородные связи с пиррольным атомом водорода или с гидроксильной группой лиганда, однако эти связи не отличаются высокой стабильностью: водородная связь с пиррольным атомом лиганда присутствует лишь 11% времени, а водородная связь с гидроксильной группой лиганда овнутримолекулярной водородной связи OH…N на протяжении всего времени моделирования.



Рис. 3.2. Результаты моделирования молекулярной динамики для области I. А) Среднеквадратичное отклонение атомов лиганда в зависимости от времени моделирования. Б) Общий вид усреднённой структуры комплекса в сравнении с начальной; начальная структура окрашена по типам вторичной структуры (белок) и типам атомов (лиганд), усреднённая структура окрашена в сине-зелёный (белок) и красно-оранжевый (лиганд) цвета. В) Наложение начальной (окрашена по типам атомов) и усреднённой (оранжевая) структуры лиганда. Г) Способ связывания лиганда с белком. Возможные водородные связи показаны пунктиром.

Важно отметить, что лиганд оказывает опосредованное влияние на конформацию активационной петли благодаря взаимодействию с остатком Phe229. Вследствие этого в ходе молекулярной динамики образуется прочный солевой мостик между остатками Arg96 и Glu211. Первый из них принимает участие в формировании места связывания фосфатной группы субстрата. Также вследствие этого происходит сближение петли C с активационной петлёй, приводящее к уменьшению объёма области связывания субстрата, что может лежать в основе неконкурентного ингибирования киназы гликогенсинтазы 3 манзамином А.

#### 3.2.3.3. Траектория молекулярной динамики для области II

Лиганд в области II менее чем за 1 нс перемещается в область между глициновой петлёй и петлёй С, однако данная ориентация не отличается высокой стабильностью (рис. 3.3): в ней можно выделить несколько наиболее характерных конформаций, заметно различающихся, например, по положению карболиновой группировки. С целью накопления более полноценных статистических данных было проведено дополнительное моделирование 10 нс молекулярной динамики, в ходе которого не было обнаружено принципиальных отличий от предшествующей траектории. Дальнейший анализ проводился для траектории МД продолжительностью 20 нс.



Рис. 3.3. Результаты моделирования молекулярной динамики для области II: среднеквадратичное отклонение атомов лиганда в зависимости от времени моделирования.

Было обнаружено, что полициклическое ядро молекулы манзамина фиксируется между глициновой петлёй и петлёй С и движется как единое целое с малой долей киназы (рис. 3.4А); аминокислотные остатки Val 87, Asp90, Arg92, Phe93 (петля C) образуют гидрофобные контакты с кольцами С и Е, а остатки Leu88 (петля С) и Phe67 (глициновая петля) — с кольцами D и E (рис. 3.4Б). Взаимодействие между Gln89 и Asn95 нарушается, солевой мостик исчезает, а боковая цепь Gln89 переориентируется во внешнее пространство. Остаток Phe93 участвует также в *π*-*π*-взаимодействиях с карболиновым фрагментом лиганда. Доли киназы совершают противонаправленные движения, подобные движению челюстей в процессе пережёвывания пищи («жевательные движения» [235]). Взаимодействие карболиновой группировки с активационной петлёй (остаток Val214) происходит лишь при смыкании долей киназы. Важно отметить, что благодаря взаимодействию с лигандом петля С приближается к активационной петле, делая область связывания фосфатной группы субстрата более тесной. Вследствие этого образуется прочный солевой мостик между остатками Arg96 и Glu211. Кроме того, из-за наличия молекулы манзамина в этой же области подход потенциального предварительно фосфорилированного субстрата к месту связывания фосфатной группы также становится затруднённым. Взаимодействие между остатками Phe67 и Leu88 играет важную роль в ориентировании глициновой петли для оптимального взаимодействия с АТФ [231]. Наличие молекулы манзамина приводит к изменению характера такого взаимодействия, а нарушение солевого мостика Gln89-Asn95 приводит к невозможности распознавания субстрата [64], в связи с чем данная структура комплекса отвечает одному из возможных механизмов неконкурентного ингибирования киназы.



Рис. 3.4. Результаты моделирования молекулярной динамики для области II. А) Общий вид усреднённой структуры комплекса в сравнении с начальной; начальная структура окрашена по типам вторичной структуры (белок) и типам атомов (лиганд), усреднённая структура окрашена в сине-зелёный (белок) и фиолетовый (лиганд) цвета. Б) Способ связывания лиганда с белком. Глициновая петля окрашена зелёным, петля С — красным, активационная петля — синим.

#### 3.2.3.4. Траектория молекулярной динамики для области III

Площадь контакта между белком и лигандом в области III относительно невелика, вследствие чего при моделировании молекулярной динамики молекула лиганда начинает перемещаться по поверхности киназы. Отклонение от начальной структуры нарастает в ходе моделирования (рис. 3.5А) и достигает более чем 20 Å. Водородная связь между лигандом и белком заменяется на внутримолекулярную водородную связь в молекуле манзамина, характерную для всех остальных комплексов. На протяжении первых двух наносекунд динамики лиганд расклинивает доли киназы своей карболиновой группировкой, взаимодействуя с активационной петлёй в углублении между долями на противоположной месту связывания АТФ стороне киназы (rmsd ~10 Å), однако данная ориентация лиганда неустойчива, и молекула манзамина продолжает поступательное движение по поверхности киназы. С 3-й по 8-ю наносекунду наблюдается относительно неустойчивая ориентация молекулы лиганда, характеризующаяся отсутствием контактов между белком и карболиновой группировкой лиганда и наличием контактов между кольцом D лиганда и активационной петлёй киназы. Относительно стабильная ориентация формируется на 8-й наносекунде и характеризуется взаимодействием кольца D и карболиновой группировки с остатками Tyr171, Ser174, Phe175, Gly176, Gln206, Leu207, Gln365, Glu366 (рис. 3.5Б). Важно отметить, что остаток Phe175 вступает в *π*-*π*-взаимодействия с карболиновым фрагментом молекулы манзамина. Гидроксильная группа молекулы манзамина направлена в сторону растворителя. Наличие контактов с активационной петлёй позволяет сделать вывод о возможной важности данных взаимодействий для процесса активации киназы. Интересно отметить, что мутации в позиции 206 приводят к резкому изменению аффинности киназы к аксину и FRAT несмотря на то, что этот аминокислотный остаток находится на значительном расстоянии от места связывания FRAT [236]. С другой стороны, заметные перестройки области связывания фосфатной группы субстрата и сближение активационной петли с петлёй С практически отсутствуют, что в данном случае свидетельствует против влияния лиганда на связывание субстрата.



Рис. 3.5. Результаты моделирования молекулярной динамики для области III. А) Среднеквадратичное отклонение атомов лиганда в зависимости от времени моделирования. Б) Способ связывания лиганда в равновесном участке траектории (8— 10 нс).

#### 3.2.3.5. Траектория молекулярной динамики для области IV

Подобно области I, для области IV характерна быстрая стабилизация структуры комплекса (рис. 3.6А). Усреднённая структура комплекса (рис. 3.6Б) отличается от начальной лишь небольшим (менее 1 Å) смещением молекулы манзамина в сторону области связывания АТФ. Ориентация лиганда остаётся неизменной в течение 8 нс, после чего происходит быстрый разворот молекулы: карболиновая группировка переориентируется во внешнее простанство, а лиганд контактирует с белком посредством колец D и E, а затем только лишь кольца E, перекрывая при этом вход в центр связывания АТФ. Причиной такого изменения может быть случайная флуктуация структуры вследствие теплового движения, приводящая к преодолению соответствующего энергетического барьера. Для уточнения характеристик новой ориентации лиганда было проведено дополнительное моделирование 2 нс динамики, не приведшее к глобальным изменениям в структуре комплекса. Отметим также, что сближения активационной петли и петли C не происходит, что не позволяет соотнести механизм неконкурентного ингибирования в данном случае с нарушением связывания фосфатной группы субстрата. Тем не менее, возможно нарушение связывания других областей молекулы субстрата с киназой, необходимого для правильной ориентации сайта фосфорилирования рядом с молекулой АТФ. Более подробное исследование этого гипотетического механизма требует дополнительных экспериментальных данных.



Рис. 3.6. Результаты моделирования молекулярной динамики для области IV. А) Среднеквадратичное отклонение атомов лиганда в зависимости от времени моделирования. Б) Общий вид усреднённой структуры комплекса в сравнении с начальной; начальная структура окрашена по типам вторичной структуры (белок) и типам атомов (лиганд), усреднённая структура окрашена в зелёный (белок) и оранжевый (лиганд) цвета. В) Способ связывания лиганда с белком. Атомы водорода не изображены.

Стабильность начальной структуры позволяет сделать вывод о допустимости рассмотрения данной области в качестве потенциального места связывания неконкурентных ингибиторов. Дальнейшее рассмотрение велось для отрезка траектории от 0.6 нс до 8.2 нс.

Лиганд образует гидрофобные контакты с аминокислотными остатками Tyr140, Arg144, Arg220, Tyr221, Tyr222 и Pro255 (рис. 3.6В). Поскольку данная область связывания обладает значительной липофильностью (см. рис. 3.1Б), водородные связи практически не участвуют во взаимодействии с лигандом. Гидроксильная группа лиганда направлена в сторону растворителя, как и кольцо Е. Взаимодействие лиганда с киназой осуществляется в первую очередь за счёт карболинового фрагмента и кольца D.

#### 3.2.4. Анализ корреляционных карт

Сравнение корреляционных карт — широко используемый метод анализа траекторий молекулярной динамики, позволяющий выявить различия в согласованных движениях больших групп атомов, в частности, отдельных доменов или структурных элементов [237]. Корреляционные карты были построены для упомянутых выше равновесных участков всех пяти траекторий (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Корреляционные карты траекторий молекулярной динамики. Расположение карт указано между первой картой и цветовой легендой. Наиболее светлые области соответствуют высокой положительной корреляции, коричневые — близкой к нулю, а синие — отрицательной.

На картах для всех комплексов обнаруживаются участки структуры, движущиеся совместно. В то же время имеются и части структуры, движущиеся независимо друг от друга или в противофазе.

При сравнении корреляционных карт для *апо*-формы и области I хорошо заметно изменение характера движения в области остатков 106—116 (спираль С) и 320— 330. При наличии ингибитора возникают небольшие участки структуры, характер движения которых резко отличается от соседних областей. Значительное удаление их от места связывания ингибитора может быть объяснено наличием аллостерического влияния ингибитора на динамическое поведение молекулы белка.

Корреляционную карту для области II строили по отрезку траектории 10—18 нс, характеризующемуся стабильным расположением лиганда в области связывания между глициновой петлёй и петлёй С. При наличии молекулы в области II наибольшие отличия от апо-формы возникают в районе остатков 250—260. Эта петля взаимодействует с фосфатной группой остатка pTyr216, чрезвычайно важного для активации киназы. Таким образом, взаимодействие с лигандом изменяет характер движения активационной петли, что может быть весьма важным фактором в механизме неконкурентного ингибирования киназы. Изменения корреляционной карты в данном случае наиболее выражены, несмотря на их локальный характер.

Корреляционная карта для области III отличается меньшим разбросом значений по сравнению с остальными, из чего можно сделать вывод об отсутствии сильно связанных областей в структуре белка в данном случае. По сравнению с апо-формой комплекс области III более пластичен, однако каких-либо принципиальных отличий между корреляционными картами нет, что позволяет предположить малую степень влияния взаимодействия между манзамином и киназой в данной области на характер движений белка. Бо́льшая пластичность белка по сравнению с апо-формой может быть также следствием анализа меньшего участка траектории.

В случае связывания лиганда в области IV белок становится менее «зернистым»: коррелированные и антикоррелированные области становятся больше, наблюдается чёткое противонаправленное движение меньшей и большей доли киназы. Похожие движения наблюдались при моделировании молекулярной динамики протеинкиназы A (PKA) в комплексе с ATФ [238]. Кроме того, наблюдается заметное изменение характера движений в области активационной петли (остатки 205—220), что может соответствовать процессу неконкурентного ингибирования.

Для всех возможных областей связывания, кроме III, наблюдаются наведённые локальные изменения по сравнению с картой для апо-формы. Эти изменения могут отвечать аллостерическим процессам, связанным с ингибированием киназы. Связывание же лиганда в области III не приводит к заметным локализованным изменениям корреляционной карты, то есть мало влияет на характер движения белка.

125

#### 3.2.5. Оценка энергии связывания

Оценка энергии связывания (△G) проводилась с использованием метода трёх траекторий для следующих стабильных отрезков траекторий комплексов: апо-форма и область I — вся продуктивная траектория, область II — отрезок 10—18 нс, область III — 8—10 нс, область IV — 0.6—8.2 нс.

Результаты оценки приведены в табл. 3.2. Минимальное значение оценки энергии Гиббса связывания получено для области III, что находится в некотором несоответствии с остальными методами анализа. Наиболее вероятной причиной такой оценки является высокая гидрофобность данного участка связывания и наличие выгодных  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействий между белком и лигандом. В силу больших значений  $\Delta G$  непосредственная интерпретация значений предсказанной свободной энергии связывания в терминах статистической термодинамики, в частности, расчёт константы связывания, не несёт физического смысла. Иными словами, не имеет смысла сравнивать эту оценку с экспериментальным значением энергии связывания, однако оцененные значения энергии связывания вполне можно применять для сравнения между собой.

Область	$\Delta E_{MM}$	$\Delta G_{S_PBSA}$	$\Delta G_{S_{GBSA}}$	ΤΔ	ΔG <sub>PBSA</sub>	$\Delta G_{GBSA}$	$\Delta\Delta G_{PBSA}$	$\Delta\Delta G_{GBSA}$
Ι	-112	-30	-19	-17	-125	-113	143	154
II	-157	-23	-3	-12	-168	-149	100	118
III	-208	-75	-74	-15	-268	-267	0	0
IV	-73	-41	-60	-4	-109	-129	159	138

**Таблица 3.2.** Результаты оценки свободной энергии связывания манзамина А и киназы GSK-3β. Формальная размерность всех величин — ккал/моль.

В двух последних столбцах таблицы 3.2 приведены значения относительной энергии связывания для всех четырёх областей. Мы выбрали в качестве начала отсчёта энергию Гиббса связывания для области III. Видно, что для области II значение энергии выше, а для областей I и IV существенно выше. Таким образом, эффективность взаимодействия лиганда с областью III является максимальной, а с областями I и IV — минимальной.

#### 3.2.6. Ранжирование областей связывания

В силу того, что на данный момент ни один из методов молекулярного моделирования не может дать исчерпывающего ответа относительно механизма ингибирования, для повышения надёжности предсказания целесообразно использовать несколько различных методов. Ранжирование потенциальных областей связывания было проведено на основе трёх методов анализа траекторий: конформационного анализа лиганда, визуального анализа траектории и корреляционных карт. При этом были использованы следующие критерии.

Конформационный критерий ранжирования заключается в сопоставлении конформационного пространства лиганда в комплексе с конформационным пространством свободного лиганда. Наивысшее соответствие наблюдается для области I; область II характеризуется повышенной подвижностью внутримолекулярной водородной связи лиганда, однако его конформация близка к глобальному минимуму; для областей III и IV наблюдается неоптимальный торсионный угол при карболиновом фрагменте (табл. 3.1).

Критерий ранжирования для визуального анализа траекторий включает в себя исследование контактов между лигандом и определёнными аминокислотными остатками и важными областями белка и выявление специфичных особенностей конформации фермента, позволяющих объяснить механизм неконкурентного ингибирования; кроме того, учитывается стабильность комплекса. На основании этого критерия наиболее оптимальным представляется связывание лиганда в области II, для которой характерно стабильное расположение лиганда в структурно важной области и возникновение структурных изменений в области связывания фосфатной группы субстрата.Область I также характеризуется наличием подобных структурных изменений, однако лиганд расположен в районе взаимодействия с аксином, что снижает общую оценку, поскольку связывание в данной области не полностью объясняет механизм неконкурентного ингибирования. Область IV получает преимущество над областью III за счёт более длительного периода устойчивости системы.

Наконец, основа анализа корреляционных карт —их отличия от карты для *ano*формы и наличие заметных уникальных особенностей, соотносимых с визуальным анализом траектории. Наиболее явно такие особенности проявляются на карте для области II, в то время как на карте для области III они наименее выражены. В целом ранжирование с помощью корреляционных карт соответствует ранжированию с помощью визуального анализа.

Исходя из вышесказанного, можно признать, что область II является наиболее вероятной, поскольку по двум критериям (визуальный анализ и корреляционные карты) она оптимальна, а по конформационному критерию — субоптимальна. Этот вывод находится в соответствии с результатами поиска места взаимодействия киназы GSK-3β с неконкурентными ингибиторами ряда TDZD методом докинга [65]. Интересно отметить, что результаты ранжирования с применением сложных расчётных методов в целом совпадают с результатами внимательного визуального анализа траекторий. Метод корреляционных карт оказывается весьма эффективным при решении данной задачи, поскольку он позволяет отследить изменения структуры или её подвижности, не заметные невооружённым взглядом при анализе траектории.

Известные соотношения «структура-активность» [165] не противоречат связыванию лиганда в области II. Замещение пиррольного атома водорода на метил либо другой небольшой заместитель приводит к незначительному ослаблению связывания, что объясняется невозможностью образования внутримолекулярной водородной связи. Введение большого заместителя приводит к значительному изменению конформационного поведения лиганда и отсутствию ингибиторной активности. Введение гидроксильной группы в восьмое положение карболинового фрагмента приводит к незначительному увеличению аффинности за счёт дополнительных контактов с активационной петлёй. Гидирование двойных связей в кольцах D и E приводит к исчезновению выгодных л-л-взаимодействий с Phe67 и Phe93 и отсутствию активности. Введение кетогруппы в кольцо Е также приводит к уменьшению активности за счёт менее выгодных взаимодействий с гидрофобными аминокислотными остатками. Соединения с большим гидрофильным заместителем в 8-м положении карболина и кетогруппой в кольце Е, скорее всего, взаимодействуют с киназой в другой конформации, за счёт чего их активность приблизительно совпадает с активностью исходного манзамина.

## 3.3. Виртуальный скрининг и дизайн неконкурентных ингибиторов

В ходе нашей работы выявлено потенциальное место взаимодействия киназы гликогенсинтазы 3β с неконкурентным ингибитором манзамином А: область между глициновой петлёй, петлёй С и активационной петлёй. Наличие молекулы лиганда в данной области нарушает связывание киназы с субстратом и не позволяет ферменту осуществить реакцию фосфорилирования. Таким образом, молекулы, взаимодействующие с данной областью поверхности белка, могут выступать в качестве неконкурентных ингибиторов GSK-3. Поскольку молекула манзамина А в значительной степени гидрофобна и не образует стабильных водородных связей с киназой, использовать её в качестве шаблона при виртуальном скрининге довольно затруднительно. Тем не менее, возможно исследование соответствующей области пространства методом докинга.

Виртуальный скрининг по месту связывания манзамина проводили по тому же протоколу, что и виртуальный скрининг по АТФ-связывающему центру (раздел 5.2.4). Для докинга была использована структура, соответствующая шагу динамики 8839000 (17678 нс). Особенностью данной структуры является наличие контакта между активационной петлёй и карболиновой группой молекулы лиганда. Общий вид решётки докинга приведён на рис. 3.8. Ограничения на наличие определённых взаимодействий в области связывания не использовались.



Рис. 3.8. Решётка, использованная для виртуального скрининга неконкурентных ингибиторов. Зелёный контур ограничивает область пространства, в которой обязательно наличие хотя бы одного неводородного атома лиганда.

В результате докинга были идентифицированы 9983 различных потенциальных лиганда (хита). Поскольку докинг проводился с использованием той же базы данных, что и докинг в центр связывания АТФ, существует вероятность высокого ранжирования тех же молекул, которые были идентифицированы в качестве потенциальных конкурентных ингибиторов, либо аналогичных им. В связи с этим был предпринят повторный докинг в оба центра связывания и ранжирование хитов по значениям оценочных функций.

Единственными количественными критериями качества докинга для области связывания неконкурентных ингибиторов является величина оценки и консенсусное ранжирование, поскольку отсутствуют, во-первых, надёжно установленные способы связывания GSK-3 с неконкурентными ингибиторами, а во-вторых, достаточно обширные серии таких ингибиторов с соответствующим размером молекул. Для области связывания АТФ можно использовать количественные критерии, сформулированные в разделе 2.2 на основе анализа результатов докинга. Также имеет смысл оценить разность между значениями оценочных функций для каждой конкретной молекулы по результатам докинга в оба центра. Результаты сравнения оценок приводятся в табл. 3.4. Видно, что диапазон оценок для области связывания АТФ (1r0e) лежит ниже, чем для области связывания неконкурентных ингибиторов (1gng), то есть в области лучших оценок. Это связано прежде всего с меньшим объёмом места связывания АТФ по сравнению с областью связывания неконкурентных ингибиторов, что приводит к большей площади контакта и более высоким оценкам. Число хитов, предпочитающих неконкурентную область, сильно отличается для различных оценочных функций и мало зависит от диапазона оценок. Единственной оценочной функцией, в соответствии с которой большинство отобранных соединений имеют в неконкурентной области предпочтительные значения оценочных функций, является ScreenScore.

Таблица 3.3. Сравнение оценок д	ля хитов	виртуального	скрининга	ПО	области
связывания неконкурентных ингибиторо	B.				

Функция	1gng>1r0e <sup>a</sup>	1gng min	1gng max	1r0e min	1r0e max
Chemgauss3	144	-72.3	-24.3	-90.3	-47
Shapegauss	455	-443.2	-232.4	-511.2	-267.1
Chemscore	2068	-29.1	4.3	-31.7	-0.2
OEChemscore	2691	-43.5	-18.1	-49	-22.1
PLP	3656	-65	-26.9	-70.2	-29.1
ScreenScore	6148	-163.9	-62.6	-147.5	-57.7

<sup>а</sup> Число соединений, для которых предпочтительно связывание в неконкурентной области.

Поскольку для каждой из оценочных функций разброс значений оценок очень велик и неоднороден, наиболее разумно провести консенсусное ранжирование, основанное на значении разности между оценками 1gng и 1r0е для различных оценочных функций:

 $\Delta score(функция) = score(1gng, функция) - score(1r0e, функция).$ 

Если значение  $\Delta score(функция) < 0$ , то можно считать предпочтительным связывание в неконкурентной области по оценке данной функции. На основе этого критерия можно построить индикаторную функцию  $Ind(\Delta score(функция)) = 1$  при  $\Delta score(функция) < 0$  и = 0 в иных ситуациях. Сумма индикаторных функций по использованным оценочным функциям  $\Sigma Ind$  и будет выступать в качестве критерия консенсусного ранжирования. Распределение значений  $\Sigma Ind$  приведено в таблице 3.4. В качестве дополнительных критериев используются значения оценок Chemgauss3 и Shapegauss, поскольку для них  $\Delta score < 0$  относительно редко.

ΣInd	Общее количество хитов	$\Delta score$ (Chemgauss3) < 0	$\Delta score(Shapegauss) < 0$	Группа
6	5	5	5	3
5	69	24	48	3
4	799	22	102	2
3	1319	32	140	2
2	2405	28	110	1
1	2822	34	51	1
0	2533	0	0	1

Габлица 3.4.	Распределение	значений	$\Sigma Ind.$
--------------	---------------	----------	---------------

Таким образом, можно выделить три группы хитов:

1.«Предпочитающие» центр связывания АТ $\Phi$  области связывания неконкурентных ингибиторов ( $\Sigma Ind < 3$ );

2.Относительно высоко ранжированные в обоих центрах ( $2 < \Sigma Ind < 5$ );

3.«Предпочитающие» центру связывания АТ $\Phi$  область связывания неконкурентных ингибиторов ( $\Sigma Ind > 4$ ).

Хиты первой и второй групп вряд ли могут выступать в качестве неконкурентных ингибиторов в соответствии с принципом бритвы Оккама. Тем не менее, они могут представлять интерес в качестве потенциальных конкурентных ингибиторов. В качестве примера можно привести соединение **118** (рис. 3.9). В случае взаимодействия с АТФ-связывающим центром пиразольный атом азота образует водородную связь с Asp133, амидный атом кислорода — с Val135, гидразиновый атом азота может образовывать дополнительную водородную связь с карбонильным атомом кислорода Val135, а для *пара*-толила возможно  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействие с Phe67. В случае области связывания неконкурентных ингибиторов имеются две водородных связи с карбонильным атомом кислорода Lys94, а также водородная связь с амидным атомом водорода Arg96; также возможно  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействие с Phe67. Взаимодействие с АТФсвязывающей областью в данном случае выглядит предпочтительным, поскольку объём лиганда слишком мал по сравнению с объёмом области связывания неконкурентных ингибиторов.



**Рис. 3.9.** А) Структура соединения **118**. Б) Предложенный способ связывания в области связывания АТФ. В) Предложенный способ связывания в области связывания неконкурентных ингибиторов.

Наибольший интерес в качестве соединений-лидеров при дизайне потенциальных неконкурентных ингибиторов представляют соединения третьей группы. Пять соединений, имеющих  $\Sigma ind = 6$ , приведены в таблице 3.5. Данные соединения взаимодействуют преимущественно с различными участками петли С; кроме того, время от времени встречается гидрофобное либо  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействие с Phe67. Всего в данной области имеется три доступных донора водородной связи (амидные NH основной цепи Arg96 и Glu97 и терминальная амидная группа Asn95) и два доступных акцептора водородной связи (карбонильные атомы кислорода основной цепи Lys94 и Leu88). Ни одно из представленных в табл. 3.5 соединений не взаимодействует со всеми этими донорами и акцепторами одновременно, что открывает возможности для их модификации с целью улучшения связывания.

Номер	Структура и ключевые взаимодействия	Способ связывания
119	л-π-взаимодействия с Рhe67; водородная связь с амидным NH основной цепи Arg96	
120	водородные связи с карбонильным О Lys94 и Leu88; водородная связь с амидным NH <sub>2</sub> Asn95	

**Таблица 3.5**. Структуры и способы связывания соединений с  $\Sigma$ *ind* = 6.

Номер	Структура и ключевые взаимодействия	Способ связывания
121	н <sub>3</sub> с-N, сн <sub>3</sub> водородная связь с карбонильным О Lys94; водородная связь с амидным NH <sub>2</sub> Asn95	
122	водородная связь с карбонильным О Leu88; водородные связи с амидным NH <sub>2</sub> Asn95; CH…π- взаимодействия с Phe67	
123	водородные связи с карбонильным О Lys94 и Leu88; π-π-взаимодействия с Phe67	

Все эти соединения имеют относительно небольшой размер и могут выступать скорее в качестве соединений-лидеров, чем в качестве самостоятельных ингибиторов. Наличие свободного пространства в области связывания позволяет предложить использование более крупных ароматических фрагментов либо алифатических полициклов и каркасных структур, таких, как адамантан, бицикло[3.3.1]нонан и т. д. Замена диметилфенильного фрагмента в **123** на адамантил приводит к уменьшению значений всех оценочных функций, что свидетельствует об улучшении связывания.

Общим свойством отобранных структур является наличие тетраэдрического атома углерода либо азота, несущего как минимум три объёмистых заместителя. Для двух из этих заместителей предпочтительна высокая гидрофобность, третий и четвёртый (при его наличии) могут быть донорами или акцепторами водородных связей. Дополнительной эффективности связывания соединений можно добиться путём введения группировки, взаимодействующей с областью распознавания фосфатной группы субстрата. Поскольку эта область находится на некотором удалении от гидрофобной части ингибитора, соответствующая группировка должна быть присоединена к ингибитору через алифатический спейсер длиной не менее двух метиленовых групп. В качестве такой группировки может выступать практически любой пятичленный ароматический гетероцикл, содержащий акцепторы водородной связи, в частности, карбонильные группы.

Для предложенных молекул наиболее очевидные способы модификации — введение гидроксильных групп в имеющиеся алифатические спейсеры. В таком случае можно ожидать появления дополнительных водородных связей при сохранении ориентации молекул в области связывания. Данный вариант требует разделения энантиомеров на стадии синтеза. Более разумным выглядит вариант введения объёмистых каркасных структур, модификация которых достаточно проста.

Таким образом, нами проведено моделирование молекулярной динамики с целью идентификации возможного места связывания неконкурентного ингибитора манзамина А на поверхности киназы гликогенсинтазы З. Наиболее вероятным является связывание манзамина в области между глициновой петлёй, петлёй С и активационной петлёй, позволяющее объяснить ключевые особенности известных соотношений «структура-активность». На основе оптимизированной структуры комплекса проведён виртуальный скрининг методом докинга, идентифицированы потенциальные неконкурентные ингибиторы GSK-3. Предложены модификации соединений, приводящие к возможному увеличению активности.

# Глава 4. Киназа гликогенсинтазы 3 у паразитических организмов как мишень потенциальных антипаразитарных препаратов

Киназа гликогенсинтазы 3 имеется практически у всех эукариотических организмов и участвует в одних и тех же сигнальных путях. Как следствие, нарушение её деятельности (в частности, ингибирование) может приводить к гибели организма, что имеет смысл использовать при создании антипаразитарных средств. Было показано, что ингибиторы GSK-3 могут быть использованы для борьбы с малярией [33], лейшманиозом [35], токсоплазмозом [36] и сонной болезнью [34]. Ингибиторы GSK-3 могут применяться для регулирования популяций вредоносных насекомых, таких, как клещи *Rhipicephalus microplus* [37, 38].

#### 4.1. Анализ аминокислотных последовательностей GSK-3

К настоящему времени в базе данных Pubmed Protein [239] имеются 29 аминокислотных последовательностей, аннотированных как GSK-3 и относящихся к различным организмам (табл. 4.1): млекопитающим (свинья, мышь, крыса, человек), насекомым (дрозофила, комар *Aedes aegypti* (переносчик лихорадки Денге), клещ *R. microplus*), нематодам (*Brugia malayi*), трематодам (*Schistosoma mansoni*), споровикам (малярийные плазмодии, токсоплазмы), трипаносоматидам (трипаносомы и лейшмании), а также к грибкам, относящимся к различным отделам. Имеется также некоторое количество родственных последовательностей, для которых отсутствуют надёжные аннотации; такие последовательности были исключены нами из рассмотрения, как и GSK-3 различных растений, поскольку они не представляют значительного интереса как мишени потенциальных лекарственных средств.

Среди различных GSK-3 для одной киназы экспериментально исследованы кристаллические структуры (HsGSK-3β, см. гл. 1—3), а для трёх (PfGSK-3, TbGSK-3 и LdGSK-3) — предложены модели пространственной структуры каталитического домена [33-35, 39-40]. Модель PfGSK-3 Кругеля и Лемке [39-40] позволила объяснить некоторые особенности селективности ингибиторов HsGSK-3 по отношению к PfGSK-3. Тем не менее, систематическое исследование как самих киназ, так и критериев селективности для их ингибиторов до настоящего времени проведено не было.

Код доступа	Обозначение	Организм	Длина	Идентичность HsGSK-3β	Подобие HsGSK-3β
P49840.2	HsGSK-3α	Homo sapiens	285	89%	95%
Q6FI27	HsGSK-3β	Homo sapiens	292	100%	100%
Q2NL51.2	MmGSK-3α	Mus musculus	286	88%	94%
Q9WV60.2	MmGSK-3β	Mus musculus	292	100%	100%
P18265.1	RnGSK-3α	Rattus norvegicus	285	89%	94%
P18266.1	RnGSK-3β	Rattus norvegicus	292	99%	100%
NP_001121915.1	SsGSK-3β	Sus scrofa	292	99%	99%
ABO61882.1	RmGSK-3	Rhipicephalus microplus	285	84%	93%
Q1HRP9	AaGSK-3	Aedes aegypti	285	83%	93%
AAN09082.1	SHAGGY	Drosophila melanogaster	285	83%	93%
XP_001897721.1	BmGSK-3	Brugia malayi	277	66%	75%
XP_002572305.1	SmGSK-3	Schistosoma mansoni	285	77%	88%
EEQ85886.1	AdGSK-3	Ajellomyces dermatitidis	284	72%	84%
EEH21342.1	PbrGSK-3	Paracoccidioides brasiliensis	284	71%	83%
Q0CKX1	AtGSK-3	Aspergillus terreus	268	68%	77%
AFUA_6G05120	AfGSK-3	Aspergillus fumigatus Af293	284	72%	83%
CHGG_07166	CgGSK-3	Chaetomium globosum CBS 148.51	284	71%	81%
CNB00720	CnGSK-3	Cryptococcus neoformans	332	66%	75%
XP_002418374.1	CdGSK-3	Candida dubliniensis	283	59%	79%
CIMG_02613	CiGSK-3	Coccidioides immitis RS	284	71%	83%
077344	PfGSK-3	Plasmodium falciparum 3D7	287	56%	75%
Q4Z6R7	PbGSK-3	Plasmodium berghei	287	55%	73%
CAM67080.1	LiGSK-3	Leishmania infantum	330	44%	63%
3E3P_B	LmGSK-3	Leishmania major	330	44%	63%
ABR18737.1	LdGSK-3	Leishmania donovani	330	44%	63%
Q0PKV3	LmxGSK-3	Leishmania mexicana	330	44%	63%
XP_001563953.1	LbGSK-3	Leishmania braziliensis	327	45%	63%
P49841	TbGSK-3	Trypanosoma brucei	327	47%	64%
AF042826	ТРК3	Toxoplasma gondii	298	54%	73%

**Таблица 4.1.** Аминокислотные последовательности различных организмов, аннотированные как GSK-3.

Для исследуемых аминокислотных последовательностей было построено выравнивание (рис. 4.1). Из выравнивания видно, что каталитический домен GSK-3 отличается достаточно высокой консервативностью (наименьшая идентичность человеческой киназе наблюдается у лейшманий — 44%), в то время как остальные области вариабельны. Например, у AtGSK-3 отсутствует глициновая петля (вероятно, из-за неточной аннотации последовательности либо ошибок секвенирования), а у BmGSK-3 имеются значительные делеции в области взаимодействия с аксином. Большинство остальных инсерций и делеций расположено в петлях и не оказывает критического влияния на структуру киназы в целом. Большинство киназ содержит N-терминальный фрагмент, в котором имеется остаток серина, гомологичный Ser9 HsGSK-3β, что позволяет предположить возможность ингибирования киназы путём фосфорилирования и в иных организмах.



Рис. 4.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей GSK-3 различных организмов. Цвет фона соответствует консервативности позиции: от белого (вариабельная позиция) до чёрного (консервативная позиция).

На основе выравнивания аминокислотных последовательностей было построено филогенетическое дерево эукариотических GSK-3 (рис. 4.2). Общая структура дерева соответствует филогенетике самих исследуемых организмов. Киназы простейших образуют отдельную ветвь, другая ветвь относится к многоклеточным. Киназы грибов группируются в ветвь, отдельную от киназ животных. Киназы млекопитающих образуют две ветви, соответствующие α- и β-изоформам. Для простейших характерны наибольшее разнообразие и расстояние от человеческой киназы; например, дивергенция между киназами плазмодиев и лейшманий значительно выше, чем между киназами человека и насекомых.



Рис. 4.2. Филогенетическое дерево GSK-3.

Консервативность различных аминокислотных остатков GSK-3 изображена на рис. 4.3. Наиболее консервативна область молекулы, обеспечивающая функционирование киназы — катализ реакции переноса фосфатной группы от АТФ к субстрату (остатки Lys85<sup>6</sup>, Glu97, Asp200, Asn186, а также остатки глицина в глициновой петле). Кроме того, абсолютно консервативна область, ответственная за распознавание предварительно фосфорилированной фосфатной группы субстрата (Arg96, Arg180,

<sup>6</sup> Здесь и далее нумерация аминокислотных остатков приводится в соответствии с HsGSK-3 β, если не указано иное.

Lys205), что позволяет сделать вывод об аналогичной субстратной специфичности GSK-3 вне зависимости от организма. Также консервативен остаток Tyr216 и взаимодействующие с ним остатки аргинина 220 и 223, что свидетельствует о сохранении механизма активации киназы в ходе эволюции.



**Рис. 4.3. Консервативность аминокислотной последовательности GSK-3.** Структура 1UV5 окрашена в соответствии со значением оценки консервативности генной последовательности ConSurf: от минимальной (голубая) до максимальной (фиолетовая).

На рисунке 4.4 приведено расположение консервативных аминокислотных остатков в области связывания АТФ. Остатки Cys199, Leu188, Pro136, Thr138, Lys85 и Asp200 совершенно консервативны; боковая цепь остатка Asp133 не участвует во взаимодействии с АТФ либо ингибитором, поэтому данный остаток можно считать условно консервативным. Во всех остальных ключевых позициях области связывания имеются различия, позволяющие создавать или пытаться создавать селективные ингибиторы киназ паразитов, не действующие на GSK-3 человека. Из рис. 4.4Б следует, что создание селективных ингибиторов теоретически возможно для всех рассматриваемых киназ. Частота встречаемости различных аминокислотных остатков в области связывания АТФ приведена в табл. 4.2, из которой следует, что чаще других встречаются те остатки, которые имеются у человека, что, однако, является следствием учёта киназ всех остальных млекопитающих.



**Рис. 4.4.** А) Консервативность области связывания АТФ. Абсолютно консервативные остатки и Asp133 показаны в виде стержней, вариабельные — в виде шаростержневых моделей. Б) Вариабельные аминокислотные остатки в области связывания АТФ.

**Таблица 4.2.** Частота встречаемости (%) и консервативность различных аминокислотных остатков в области связывания АТФ. Полужирным начертанием выделены аминокислотные остатки HsGSK-3.

Позиция	A	D	E	F	Η	Ι	K	L	M	Q	R	V	Y	Консервативность
62	21					50		4				25		6
110	3					7						90		8
132								66	31	3				7
134				21	3			3					72	1
135						28						72		7
137		17	76							7				7
141							17				83			6
185					21					79				9

# 4.2. Моделирование пространственной структуры GSK-3 паразитов

Поскольку для GSK-3 паразитов известны лишь отдельные ингибиторы, являющиеся в то же время ингибиторами GSK-3 человека, наиболее рациональным подходом к созданию селективных ингибиторов является дизайн и виртуальный скрининг, основанный на модели структуры киназы. Мы провели моделирование структуры GSK-3 всех перечисленных выше паразитических и вредоносных организмов, основываясь на двух шаблонных структурах — 1UV5 и 1Q41 (табл. 1.1), которые представляют собой комплексы человеческой GSK-3 с ингибиторами ряда индирубинов. Для ингибиторов этого ряда была показана активность по отношению к GSK-3 *L. donovani, R. microplus, P. falciparum* и *T. brucei*. Параметры качества построенных моделей приведены в табл. 4.3. Видно, что большинство параметров имеет более благоприятные значения в случае моделей, основанных на шаблоне 1Q41, вследствие чего именно эти модели используются для дальнейшего рассмотрения.

	длина			1UV5		1Q41					
Название	после- дова- тель- ности	Благо- приятные	Допус- тимые	Неблаго- приятные	Запре- щённые	z- score	Благо- приятные	Допус- тимые	Неблаго- приятные	Запре- щённые	z-score
HsGSK-3β	292	84.1%	13.9%	0.0%	2.0%	-11.07	86.5%	12.5%	0.3%	0.7%	-11.11
RmGSK-3	285	91.3%	6.3%	1.2%	1.2%	-10.35	92.1%	6.7%	0.4%	0.8%	-10.47
AaGSK-3	285	90.4%	7.6%	0.8%	1.2%	-10.03	90.4%	8.4%	0.4%	0.8%	-10.05
SHAGGY	285	91.7%	6.3%	0.8%	1.2%	-9.48	90.9%	7.9%	0.4%	0.8%	-9.58
BmGSK-3	277	88.8%	9.2%	1.7%	0.4%	-9.21	89.6%	8.8%	1.7%	0.0%	-9.01
SmGSK-3	285	89.3%	8.3%	0.8%	1.6%	-9.68	92.1%	6.7%	0.4%	0.8%	-9.43
AdGSK-3	284	89.6%	8.0%	0.8%	1.6%	-9.7	89.6%	8.8%	0.4%	1.2%	-9.58
PbrGSK-3	284	88.8%	8.8%	0.8%	1.6%	-9.53	90.8%	8.0%	0.4%	0.8%	-9.51
AtGSK-3	268	89.4%	7.6%	1.3%	1.7%	-8.75	89.8%	8.9%	0.4%	0.8%	-8.74
AfGSK-3	284	89.6%	7.6%	1.2%	1.6%	-9.37	89.2%	9.2%	0.8%	0.8%	-9.36
CgGSK-3	284	88.8%	9.2%	0.8%	1.2%	-9.31	90.0%	8.8%	0.4%	0.8%	-9.29
CnGSK-3	332	89.3%	8.3%	1.7%	0.7%	-9.65	91.0%	8.0%	0.3%	0.7%	-9.40
CdGSK-3	283	89.1%	8.5%	0.8%	1.6%	-9.74	89.1%	10.1%	0.0%	0.8%	-9.37
HsGSK-3β	292	84.1%	13.9%	0.0%	2.0%	-11.07	86.5%	12.5%	0.3%	0.8%	-9.67
RmGSK-3	285	91.3%	6.3%	1.2%	1.2%	-10.35	92.1%	6.7%	0.4%	0.8%	-10.02
AaGSK-3	285	90.4%	7.6%	0.8%	1.2%	-10.03	90.4%	8.4%	0.4%	1.2%	-9.84
SHAGGY	285	91.7%	6.3%	0.8%	1.2%	-9.48	90.9%	7.9%	0.4%	0.7%	-7.97
BmGSK-3	277	88.8%	9.2%	1.7%	0.4%	-9.21	89.6%	8.8%	1.7%	1.0%	-8.27
SmGSK-3	285	89.3%	8.3%	0.8%	1.6%	-9.68	92.1%	6.7%	0.4%	1.7%	-7.87
AdGSK-3	284	89.6%	8.0%	0.8%	1.6%	-9.7	89.6%	8.8%	0.4%	1.0%	-7.94
PbrGSK-3	284	88.8%	8.8%	0.8%	1.6%	-9.53	90.8%	8.0%	0.4%	0.7%	-8.01
TbGSK-3	327	89.5%	8.8%	0.4%	1.4%	-8.92	88.4%	10.5%	0.7%	0.4%	-8.12
ТРК3	298	89.1%	8.7%	1.1%	1.1%	-9.25	90.9%	7.9%	0.4%	0.8%	-8.95

Таблица 4.3. Параметры карт Рамачандрана и оценки «z-score» для моделей GSK-3.

Модели киназ паразитов отличаются высокой схожестью с шаблонными структурами. Для большинства из них, за исключением ТРКЗ, RMSD С<sub> $\alpha$ </sub>-атомов не превышает 2.1 Å, и лишь для ТРКЗ оно составляет 5.84 Å из-за наличия значительных инсерций, приводящих к общему смещению основной цепи при оптимизации. Для тех из них, которые содержат инсерции и делеции относительно HsGSK-3 $\beta$  в каталитическом домене, проведено сравнение структур (табл. 4.4, рис. 4.5). Киназы можно сгруппировать в зависимости от наличия и характера этих отличий. Видно, что структурные отличия не затрагивают область связывания АТФ, однако могут оказывать опосредованное влияние на распознавание субстратов.

Группа	Киназы	Отличия от шаблона					
Ι	Hsα, Hsβ, Rnα, Rnβ, Mmβ, Ss, SHAGGY, Rm, Aa, Sm	нет					
Ia	Μmα	+ 1 остаток на N-конце спирали Н					
II	Lm, Li, Ld, Lmx, Lb	<ul> <li>+ 3 остатка в петле β4-β5;</li> <li>+ 1 остаток на С-конце спирали С;</li> <li>+ 2 остатка в петле αF-β7;</li> <li>+ 3 остатка на N-конце спирали Н</li> </ul>					
III	Cn	+ 9 остатков в петле β2-β3					
IV	ТРК3	<ul> <li>+ 4 остатка в петле β4-β5;</li> <li>+ 9 остатков на N-конце спирали Н</li> </ul>					
V	Bm	<ul> <li>фрагмент между активационной петлёй и спиралью F (остатки 221-241);</li> <li>петля в аксин-связывающей области (остатки 278-298)</li> </ul>					
VI	Tb	+ 2 остатка на С-конце спирали С; + 2 остатка в петле αF-β7					
VII	Pf, Pb	+ 2 остатка в петле β4-β5					
VIII	Ad, Af, Pbr, Ci, Cg	<ul> <li>– 1 остаток на N-конце спирали Н</li> </ul>					
VIIIa	Cd	<ul> <li>– 1 остаток на N-конце спирали H;</li> <li>– 1 остаток в петле β4-β5</li> </ul>					
VIIIb	At	<ul> <li>– 1 остаток на N-конце спирали H;</li> <li>– глициновая петля (цепи β1 и β2);</li> <li>+ 3 остатка в петле αF-β7</li> </ul>					

Таблица 4.4. Инсерции и делеции в GSK-3 паразитов по сравнению с шаблонами.



Рис. 4.5. Наложение структур шаблона 1Q41 (окрашен преимущественно фиолетовым) и моделей (голубые во всех случаях). Различия, описанные в табл. 4.4, обведены зелёными кружочками.

Благодаря вставкам в спирали C (TbGSK-3 и киназы лейшманий) возможно достижение значительной селективности при дизайне неконкурентных ингибиторов (см. гл. 3). Аналогичный эффект могут иметь вставки в петле αF-β7, также имеющиеся у GSK-3 лейшманий.
CnGSK-3 имеет уникальную для этой серии большую вставку в петле β2-β3, которая может влиять на подвижность глициновой петли и, как следствие, на объём и подвижность области связывания ATΦ. Кроме того, в отличие от остальных грибковых киназ CnGSK-3 не имеет вставок в области спирали H.

У GSK-3 *В. malayi* имеются уникальные особенности, отличающие её от других надёжно аннотированных GSK-3: это две больших делеции, отвечающие внешней стороне области связывания аксина [45] и области между активационной петлёй и спиралью F (рис. 4.5). Тем не менее, эти делеции не затрагивают место связывания фосфатной группы субстрата, Туг216 и место связывания АТФ. Таким образом, столь значительные изменения структуры не должны оказывать значительного влияния на ферментативную функцию киназы, однако, скорее всего, приводят к изменению профиля её субстратной селективности. Стоит отметить, что спираль G сохраняется в структуре BmGSK-3 и может взаимодействовать с аксином несмотря на отсутствие других аксин-связывающих элементов.

ATΦ-связывающие карманы киназ насекомых и червей схожи с соответствующими областями киназ млекопитающих. Во всех этих случаях имеется замена Val135Ile, приводящая к уменьшению объёма области связывания; у AaGSK-3 и SHAGGY имеется также замена Arg141Lys, консервативная функционально, поскольку остаток лизина может образовать солевой мостик с Glu137 с тем же успехом, что и аргинин. SmGSK-3 также несёт замену Tyr134Phe, однако она вряд ли может быть использована для дизайна селективных ингибиторов, поскольку водородная связь с гидроксильной группой Tyr134 неизвестна ни для одного ингибитора HsGSK-3β.



**Рис. 4.6.** Сравнение областей связывания **АТФ** SmGSK-3 (слева) и HsGSK-3β (структура 1Q41, здесь и далее обозначена оранжевым цветом). Молекулярная поверхность окрашена по гидрофобности (наиболее гидрофобные области — коричневые, наименее — голубые, промежуточные — зелёные). Видно, что у SmGSK-3 имется дополнительный небольшой выступ на нижней поверхности области связывания.

У всех грибковых киназ имеется остаток валина вместо изолейцина в позиции 62, упрощающий доступ крупных молекул в карман связывания. Два вида имеют весьма специфические замены, значительно влияющие на профиль селективности: CdGSK-3 несёт замену Val110Ala, значительно увеличивающую доступный объём области связывания вместе с заменой Ile62Val (рис. 4.7), а у CgGSK-3 имеется редко встречающийся остаток глутамина в позиции гейткипера, коренным образом изменяющий схему расположения доноров и акцепторов водородной связи в АТФ-связывающем кармане (рис. 4.8). У обеих упомянутых киназ вследствие наличия таких замен появляются дополнительные полости в области связывания, заполнение которых должно быть использовано при создании селективных лекарственных веществ.



**Рис. 4.7. Сравнение областей связывания АТФ CdGSK-3** (слева) и HsGSK-3β. Молекулярная поверхность окрашена по гидрофобности. Видно, что у CdGSK-3 имеется дополнительный карман в левой части, вход в область связывания более широкий, а сама область связывания несколько менее гидрофобна, чем аналогичная область HsGSK-3.



**Рис. 4.8. Сравнение областей связывания АТФ CgGSK-3** (слева) и HsGSK-3β. Молекулярная поверхность окрашена согласно гидрофобности. Видны значительные различия в распределении липофильности по поверхности области связывания, а также в её форме.

Наибольшее разнообразие областей связывания АТФ наблюдается в GSK-3 простейших. Главное различие между ними и HsGSK-3 — замена гейткипера Leu132Met, изменяющая объём области связывания и распределение её электронной плотности: вместо малоподвижного гидрофобного остатка лейцина появляется более конформационно гибкий аминокислотный остаток метионина, несущий акцептор водородной связи. Позиция 62 может быть занята остатком аланина (лейшмании (рис. 4.9) и трипаносомы), лейцина (токсоплазмы) либо изолейцина (плазмодии). У лейшманий и трипаносом также имеется замена Gln185His, заметно меняющая свойства аминокислотного остатка на входе в область связывания.



Рис. 4.9. Сравнение областей связывания АТФ LmGSK-3 (слева) и HsGSK-3β. Молекулярная поверхность окрашена согласно гидрофобности. Видно наличие дополнительной полости в верхней части благодаря замене Val62Ala, изменение степени гидрофобности кармана и затруднение входа в него.

У плазмодиев также имеются остатки изолейцина в позициях 110 и 135, что делает их АТФ-связывающий карман небольшим и гидрофобным. Кроме того, в киназах плазмодиев маловероятно образование прочного солевого мостика между остатками 141 и 137, поскольку во второй из этих позиций киназы плазмодиев несут остаток глутамина вместо глутамата либо аспартата, взаимодействие которого с подвижным Lys141 менее выгодно, чем гидратация (рис. 4.10); последний остаток может также образовывать водородную связь с карбонильной группой основной цепи остатка 62, как это происходит в циклин-зависимых киназах [50] и приводит к затруднению входа молекул в АТФ-связывающий карман.



**Рис. 4.10.** Сравнение областей связывания **АТФ PfGSK-3** (слева) и **HsGSK-3β.** Молекулярная поверхность окрашена согласно гидрофобности. Видно отсутствие полости рядом с гейткипером и затруднение входа в область связывания за счёт наличия замены Arg141Lys (на переднем плане слева).

Наблюдаемые различия и малое количество исследованных ингибиторов не позволяют вывести строгие критерии селективности для киназ паразитов. Тем не менее, на основе наших моделей можно объяснить наличие селективности пауллонов (от 10 до 30 раз активнее по отношению к HsGSK-3) и отсутствие селективности у индирубинов к PfGSK-3. Прежде всего, пауллоны образуют лишь две водородных связи с основной цепью шарнирного участка, в то время как индирубины образуют три таких связи. Энергия дополнительной водородной связи позволяет уменьшить влияние незначительных стерических препятствий, возникающих при замене лейцина на метионин в гейткиперной позиции, и чуть более значительных, возникающих из-за высокой подвижности Lys141 и введения остатков изолейцина в область связывания.

Киназы червей и грибов больше похожи на HsGSK-3, чем киназы простейших. Биологический эффект их ингибирования не был исследован экспериментально, однако можно предположить, что GSK-3 участвует в тех же сигнальных путях, которые имеются у людей и насекомых, в частности, в инсулиновом сигнальном пути или Wnt. Ингибирование этих путей нарушает функционирование организма и должно быть летальным для грибов и червей, и как следствие, ингибиторы GSK-3 соответствующих организмов могут быть полезны в качестве средств от грибковых заболеваний, шистосомоза и филяриатоза.

Единственная значимая замена в области связывания АТФ GSK-3 червей — Val135Ile, приводящая к незначительному уменьшению молекулярного объёма. Как

следствие, некоторые ингибиторы HsGSK-3 не будут ингибировать GSK-3 червей, в то время как ингибиторы последних, скорее всего, будут также ингибиторами HsGSK-3. Тем не менее, путём тщательной подгонки молекулярной формы ингибитора можно будет добиться требуемой селективности.

Объём сайта связывания киназ грибков превышает объём аналогичного сайта HsGSK-3, вследствие чего ингибиторы человеческой киназы могут ингибировать GSK-3 грибков. Это может быть проблемой в случае активации сигнального пути Wnt при системном ингибировании GSK-3, например, из-за быстрого развития кандидоза при терапии диабета II типа [240]. С другой стороны, наличие специфических замен позволяет создавать весьма селективные ингибиторы GSK-3 отдельных видов (*C. globosum, C. dubliniensis*).

Важной проблемой при дизайне любых противопаразитических лекарственных средств является также оптимизация структуры таким образом, чтобы добиться преимущественной абсорбции действующего вещества в теле паразита, но не человека.

Подводя итог нашего анализа, можно заключить, что на его основе можно вывести ряд рекомендаций для дизайна новых селективных ингибиторов. Прежде всего, следует учитывать возможность взаимодействия ингибитора с гейткипером: соединения, образующие водородные связи с атомом серы метионина, будут селективны по отношению к HsGSK-3, имеющей в этой позиции лейцин. Очень селективные ингибиторы могут быть найдены для CgGSK-3, содержащей глутаминовый гейткипер и большой карман связывания ATФ; другие киназы грибков способны принимать более крупные молекулы, чем киназа человека. Напротив, GSK-3 червей и малярийных плазмодиев могут принимать только меньшие ингибиторы, чем человеческая киназа. Во всех случаях наиболее важным способом достижения селективности будет правильная оптимизация молекулярной формы.

# 4.3. Виртуальный скрининг и дизайн ингибиторов GSK-3 паразитов

Поскольку для большинства киназ паразитов невозможна статистическая валидация системы виртуального скрининга вследствие отсутствия достаточного количества известных ингибиторов, мы сконцентрировались на дизайне потенциальных ингибиторов с учётом селективных особенностей различных областей связывания. Кро-

149

ме того, значительный интерес представляет задача поиска новых ингибиторов PfGSK-3 среди соединений, для которых доказана антиплазмодиальная активность — *набора антималярийных соединений Tres Cantos* (TCAMS [241]) с целью идентификации соединений, мишенью которых может являться PfGSK-3.

#### 4.3.1. Дизайн ингибиторов GSK-3 паразитов

Мы провели молекулярный дизайн потенциальных соединений-лидеров на основе моделей структур GSK-3, обладающих наиболее специфическими карманами связывания. В качестве начальной структуры был использован индирубин-3'-оксим **5**, для которого доказана ингибиторная активность по отношению к GSK-3 различных организмов и на основе структуры комплекса с которым были построены модели киназ. Во всех случаях был произведён переход от плоской структуры индирубина к неплоским спироциклическим соединениям, поскольку ключевые полости расположены над и под плоскостью индирубина; при этом были по возможности сохранены водородные связи между шарниром и ингибитором. Возможные структуры комплексов были предложены путём докинга с помощью программы FRED.

#### 4.3.1.1. Дизайн ингибитора GSK-3 Leishmania major

Благодаря аминокислотной замене Val62Ala у *L. major* имеется дополнительный карман в «верхней» части области связывания — в глициновой петле. Чтобы добиться взаимодействия с ним, мы заменили часть молекулы индирубин-3'-оксима на пятичленный цикл, получив тем самым спироциклическую структуру **124**. При этом карман соответствует третьему положению кольца, в котором у нас расположен этильный заместитель. Связывание с HsGSK-3 для такой системы крайне маловероятно при наличии этильного заместителя, но теоретически возможно при его отсутствии. Таким образом, предложенное соединение может быть селективным ингибитором GSK-3, воздействующим на лейшмании.



**Рис. 4.11.** А) Структура потенциального ингибитора LmGSK-3 (124); Б) его предсказанный способ связывания.

#### 4.3.1.2. Дизайн ингибитора GSK-3 Chaetomium globosum

Карман в глициновой петле CgGSK-3 расположен несколько глубже, чем соответствующий карман LmGSK-3, поэтому более предпочтительно замещение не в третьем, а во втором положении нового кольца. Размер кармана также несколько меньше, что делает предпочтительным введение не этильного, а метильного заместителя. Дополнительно можно увеличить селективность за счёт введения групп, взаимодействующих с глутаминовым гейткипером, в индолоновый фрагмент; это могут быть гидроксильные группы в положении 7 индолона либо замена соответствующего атома углерода на атом азота. Впрочем, атом кислорода амидной группы глутамина может образовывать водородную связь CH···O и непосредственно с предложенным соединением **125**.



**Рис. 4.12.** А) Структура потенциального ингибитора CgGSK-3 (125); Б) его предсказанный способ связывания.

#### 4.3.1.3. Дизайн ингибитора GSK-3 Candida dubliniensis

В отличие от описанных выше киназ, CdGSK-3 содержит дополнительную полость в «нижней» части области связывания, в связи с чем требуется изменение ориентации индолонового фрагмента индирубина в области связывания АТФ. Достичь необходимого результата удалось путём добавления к молекуле ингибитора **126** *н*-бутильного заместителя, который заполняет полость, образовавшуюся благодаря замене Val110Ala.



**Рис. 4.13.** А) Структура потенциального ингибитора CdGSK-3 (126); Б) его предсказанный способ связывания.

# 4.3.2. Поиск потенциальных ингибиторов PfGSK-3 в библиотеке TCAMS<sup>7</sup>

Библиотека соединений TCAMS была построена на основе коллекции корпорации GlaxoSmithKline (1986056 соединений) путём высокопроизводительного скрининга: проверяли ингибирование роста *Plasmodium falciparum 3D7* при концентрации тестируемого соединения 2 мкМ. Было отобрано 19451 соединение, для которых ингибирование роста составляло не менее 80%, после чего была проведена повторная очистка соединений, и испытания были повторены дважды. В окончательный список отбирались те соединения, которые хотя бы в двух из трёх повторов проявляли 80% ингибиторной активности. Всего было отобрано 13533 соединения [241]. Примерно для 400 соединений удалось идентифицировать потенциальные молекулярные мишени, в то время как для остальных известна лишь общая противоплазмодиальная активность. В связи с этим представляется интересным провести докинг библиотеки TCAMS с целью идентификации соединений, для которых одной из возможных молекулярных мишеней может оказаться PfGSK-3.

Докинг проводили по методике, аналогичной использованной для поиска конкурентных ингибиторов HsGSK-3β (гл. 5.2.4). При подготовке библиотеки соединений не проводили её предварительное фильтрование, поскольку поиск соединенийлидеров в данном случае не требуется. Число конформеров, генерируемых для каждого соединения, было увеличено до 500, поскольку многие соединения библиотеки

<sup>7</sup> В данном разделе нумерация аминокислотных остатков соответствует последовательности PfGSK-3.

имеют значительное количество подвижных связей. Единственным ограничением при докинге было обязательное наличие водородной связи с аминогруппой основной цепи Ile160.

Общим свойством подавляющего большинства хитов докинга является заполнение периферического пространства области связывания. Из-за контактов с Ile133 и Met157 (гейткипер) немногие соединения могут образовать водородную связь с Glu158. С другой стороны, многие хиты вследствие своего большого размера взаимодействуют с областью связывания фосфатной группы АТФ и рибозным карманом. Всего после визуального анализа результатов докинга отобраны 300 соединений, которые с высокой степенью достоверности могут оказаться ингибиторами PfGSK-3. Примеры таких соединений приведены в таблице 4.5.

Номер	Структура	Способ связывания	
127	Лучшее значение консенсусной оценки		
128	Взаимодействие 2-аминопирими- дина с шарниром, большая молекула		

Таблица 4.5. Примеры потенциальных ингибиторов PfGSK-3 из базы TCAMS.

Номер	Структура	Способ связывания
129	взаимодействие 2-аминопирими- дина с шарниром, большая моле- кула	
130	н <sub>3</sub> с () н <sub>3</sub> с () н <sub>1</sub> ) н <sub>2</sub> Взаимодействие бензопиразола с шарниром, хинолина — с Lys108	
131	н сн	

Номер	Структура	Способ связывания
132	Пирролопиридиновый фрагмент взаимодействует с шарниром	
133	Противоположная ориентация пирролопиридинового фрагмента по сравнению с предыдущим; солевой мостик с Lys108	
134	ости и при	

Номер	Структура	Способ связывания
135		
	Взаимодеиствия с областью свя- зывания фосфатной группы АТФ и рибозным карманом	

Таким образом, в ходе анализа GSK-3 паразитических организмов были выявлены те из них, для которых наиболее вероятно создание селективных ингибиторов (*C. globosum, C. dubliniensis, L. major*), и проведён дизайн потенциальных ингибиторов. Для всех киназ построены модели пространственной структуры и сформулированы критерии селективности ингибиторов по отношению к GSK-3 человека. В библиотеке соединений TCAMS проведён поиск соединений, для которых вероятным механизмом действия является ингибирование GSK-3 *P. falciparum*.

## Глава 5. Методы исследования

# 5.1. Методы исследования количественных соотношений «пространственная структура — активность»

Моделирование количественных соотношений «пространственная структура активность» (3D-QSAR) проводилось методами сравнительного анализа молекулярных полей (CoMFA [175]) и сравнительного анализа индексов молекулярного подобия (CoMSIA [176]) для наиболее обширных серий конкурентных ингибиторов GSK-3. Предпочтение отдавалось данным, исходящим из одной лаборатории, что позволяло использовать для построения модели значения IC<sub>50</sub> без предварительной обработки. В случае серии малеимидов значения IC<sub>50</sub> были получены из разнородных источников, вследствие чего был осуществлён пересчёт значений IC<sub>50</sub> в значения констант ингибирования (Кі) при помощи уравнения Ченга—Прусоффа [206]. Моделирование проводилось средствами программного комплекса SYBYL 8.0 [217]; пространственные структуры соединений выборок генерировались с помощью ConCoord 8.0 (2000 итераций минимизации, остальные параметры по умолчанию). Наложение молекул проводилось по общему фрагменту. Поскольку во всех случаях были использованы относительно небольшие выборки соединений (не более 105), при оценке предсказательной способности моделей мы руководствовались коэффициентами корреляции скользящего контроля  $q^2$ . Оценку  $q^2$  проводили путём десятикратного произвольного разбиения выборки на группы размером около 7 соединений и усреднения получаемых результатов.

С целью построения более надёжных моделей во всех случаях был проведён анализ влияния метода расчёта частичных атомных зарядов на статистические параметры модели. Заряды рассчитывались по схемам Гастайгера — Хюккеля (Г-Х) [242, 243], MMFF94 (MMFF) [244], Пюльман (PULL) [245] (данные схемы реализованы в SYBYL), Кирхгофа (КСМ, реализована О. Яковенко [246]), динамической релаксации электроотрицательности (DENR, реализована Д. А. Шульгой [247, 248]), AM1-BCC [249] (расчёт проводился в программе antechamber [250]), MK-ESP [251], RESP [252] (расчёт проводился в программе resp [253]), Лёвдина (LOW) [254] и Малликена (MULL) [255]. Квантовохимические расчёты проводились в программе PC-GAMESS/Firefly на уровне теории RHF/6-31G\* без дополнительной оптимизации структуры [256].

Моделирование CoMFA проводилось средставми SYBYL 8.0 с использованием параметров по умолчанию: силовое поле Tripos [257], пробный атом  $C_{sp3}$  с формальным зарядом +1, шаг решётки 2.0 Å, порог стерической и электростатической энергии 30 ккал/моль, диэлектрическая проницаемость обратно пропорциональна расстоянию  $(1/r^2)$ , без сглаживания.

Моделирование CoMSIA проводилось средставми SYBYL 8.0 с использованием аналогичных параметров для пробного атома и шага решётки. Использовались все пять типов индексов подобия, доступные в рамках метода: стерическое, электростатическое, донорное, акцепторное и гидрофобное. Фактор ослабления был выбран равным 0.3.

Оптимальное число компонентов в модели определяли методом исключения по одному (LOO): строились модели с различным числом компонентов (от 3 до 10, при необходимости до 20), после чего выбиралось число компонентов, приводящее к оптимальному значению  $q^2$ (LOO). Затем при фиксированном числе компонентов проводили скользящий контроль и строили окончательную модель. При наличии выбросов их исключали из рассмотрения и проводили построение модели повторно.

Прогноз на основе модели проводили путём построения и оптимизации структуры молекулы в SYBYL, расчёта зарядов соответствующим методом, наложения молекулы на использованное при построении модели выравнивание и предсказания активности с помощью модели.

#### 5.2. Виртуальный скрининг

#### 5.2.1. Подготовка библиотек соединений

Используемые нами методы виртуального скрининга основаны на политике многократного использования подготовленной базы данных для виртуального скрининга по различным мишеням либо различными методами. Как следствие, правильно подготовленная библиотека соединений представляет собой самостоятельную ценность и может в дальнейшем быть использована для совершенно других задач. В частности, стадия конформационного поиска — одна из наиболее длительных при виртуальном скрининге с использованием пространственных структур потенциаль-

ных лигандов. Преимуществом методологии, использованной в настоящей работе, является тот факт, что генерация конформаций осуществляется лишь однажды, после чего построенный ансамбль конформеров может быть использован для виртуального скрининга различными методами и по отношению к различным мишеням.

Наиболее большая и разнообразная библиотека известных к настоящему времени соединений свободно распространяется под названием ZINC и содержит более 13 миллионов структур [224]. Использование всей этой библиотеки целиком нерационально в силу наличия большого числа излишне крупных либо конформационно подвижных соединений, для которых может быть найдена приемлемая ориентация почти в любой области связывания, а также соединений, имеющих неприемлемые физикохимические свойства для создания лекарственных средств. Нами были также введены дополнительные ограничения относительно стандартной схемы с целью генерации более специфичной выборки для виртуального скрининга (табл. 5.1): например, минимальное число доноров и акцепторов водородной связи было выбрано равным 1, поскольку для эффективного взаимодействия с областью шарнира киназы требуются доноры и акцепторы водородной связи.

Параметр	Минимальное значение	Максимальное значение
Молекулярная масса	150	500
Число неводородных атомов	10	30
Число циклических систем	1	4
Число доноров водородной связи	1	4
Число акцепторов водородной связи	1	6
Число вращаемых связей	0	10
Число жёстких связей	0	25
Число гетероатомов	2	12
Рассчитанная липофильность	-5	4
Формальный заряд	-2	+2

Таблица 5.1. Критерии фильтрации базы данных ZINC.

Итогом фильтрации базы данных ZINC стала библиотека потенциальных соединений-лидеров, содержащая 1 204 522 структуры. Генерацию конформаций осуществляли с помощью программы Omega2 [258] со следующими параметрами: число генерируемых конформаций не более 350, минимальное среднеквадратичное отклонение (RMSD) между конформациями 1.0 Å. Заряды на атомах молекул рассчитывали по схеме MMFF94 [244]. Программа Omega2 осуществляет генерацию ансамблей низкоэнергетических конформаций; в подавляющем большинстве случаев в состав ансамбля входит биологически активная конформация [258]. Поскольку библиотека ZINC изначально была отфильтрована с целью отбора небольших молекул, обладающих не очень высокой конформационной подвижностью, для большинства исследуемых соединений число возможных конформаций меньше 350, что позволяет считать покрытие конформационного пространства при генерации приемлемым. Аналогичным образом осуществлялась генерация конформационных ансамблей и для других библиотек соединений, исследованных в нашей работе.

Для методов, основанных на простом анализе структурной формулы соединения (одноклассовый классификатор, поиск по наличию подструктуры), предварительная подготовка библиотек соединений не проводилась. При дальнейшем анализе хитов (докинг, наложение на фармакофор) подготовка проводилась как описано выше.

# 5.2.2. Подготовка к докингу и генерация предполагаемых структур комплексов ингибиторов и киназы

Подготовку структуры киназы к докингу осуществляли в SYBYL 8.0 путём добавления всех атомов водорода, удаления кристаллизационной воды и 200 шагов минимизации энергии методом Пауэлла в силовом поле Tripos. Дальнейшую подготовку проводили в fred\_receptor — генерировали сеточное поле для области связывания и внутренний и внешний контуры (рис. 5.1): внутренний контур ограничивает область пространства, в которой обязательно наличие хотя бы одного неводородного атома лиганда, а внешний контур ограничивает область пространства, за пределами которой запрещено наличие неводородных атомов лиганда. Кроме того, были сгенерированы структурные ограничения на наличие водородных связей между амидным NH Val135 и лигандом, а также между карбонильным атомом кислорода основной цепи Asp133 и лигандом.



Рис. 5.1. Внутренний и внешний контуры, использованные для докинга в настоящей работе.

Докинг проводили с использованием программы FRED (Fast Rigid Exhaustive Docking, быстрый жёсткий исчерпывающий докинг [209]), которая основана на поиске оптимальной ориентации жёсткой молекулы в области связывания. Ключевыми критериями правильности докинга в данном случае являются наличие требуемых лиганд-белковых взаимодействий (удовлетворение ограничениям), соответствие формы лиганда и соответствующей полости рецептора, а также наличие выгодных лигандбелковых взаимодействий. В ходе докинга производится последовательный перебор ориентаций каждой предварительно сгенерированной конформации лиганда (шаг переноса 1.0 Å, шаг вращения 1.5 Å), после чего отбираются 100 оптимальных ориентаций согласно значению оценочной функции Chemgauss3, которые повторно оптимизируются с вдвое меньшим шагом решётки согласно значению той же оценочной функции. Окончательный выбор оптимальной ориентации производится на основе консенсуса функций PLP [259], OEChemscore [260] и Chemgauss3 [261].

#### 5.2.3. Валидация системы виртуального скрининга

Валидация системы виртуального скрининга, основанной на докинге, проводилась на основе трёх критериев: (а) качество воспроизведения кристаллической структуры комплекса ингибитора с киназой; (б) общее обогащение выборки истинно активными соединениями; (в) обогащение наиболее высоко ранжированной доли хитлиста истинно активными соединениями.

Качество воспроизведения кристаллических структур оценивали путём расчёта RMSD между координатами неводородных атомов ингибитора, предложенными программой докинга, и координатами неводородных атомов ингибитора, наблюдаемыми в кристаллической структуре. С целью достижения максимального соответствия между структурами белка их наложение проводилось на основании выравнивания атомов основной цепи шарнирной области (аминокислотные остатки 132-137). Расчёт RMSD проводили с использованием программного комплекса VMD [262].

После генерации предполагаемых структур комплексов проводилась оценка энергии связывания с помощью оценочных функций Chemgauss3, PLP, OEChemscore, Screenscore [263] и Shapegauss [261], реализованных в программе FRED, а также с помощью модуля CScore [264] программного комплекса SYBYL 8.0, позволяющего производить оценку с помощью функций Chemscore, D\_score [208], G\_score [232] и PMF\_score [265] и оптимизацию структуры комплекса с повторной оценкой (ChemscoreR, DR\_score, GR\_score, PMFR\_score). При использовании CScore заряды на атомах белка были рассчитаны по схеме Коллмана [266], а на атомах лигандов — по схеме Гастайгера — Хюккеля [242, 243]. Консенсусная оценка проводилась по отдельности в программах FRED и CScore, однако не была использована при количественном анализе качества системы скрининга, поскольку её численные значения зависят не от конкретных параметров взаимодействия белка с лигандом, а от ранжирования результатов скрининга.

Для всех одиночных оценочных функций, перечисленных выше, были рассчитаны параметры обогащения с использованием методов ROC («рабочая характеристика приёмника», Receiver Operating Characteristic) и BEDROC (Boltzmann-Enhanced Discrimination of ROC, разделение ROC по распределению Больцмана), первый из которых позволяет провести анализ общего обогащения выборки, а второй — начальной части выборки.

Метод ROC [222] основан на построении кривой ROC, площадь под которой равна вероятности правильного ранжирования двух произвольных соединений: по оси абсцисс откладывается доля извлечённых истинно неактивных соединений, а по оси ординат — доля извлечённых истинно активных соединений. Минимальное значение для обеих осей составляет 0, максимальное — 1. Кроме того, имеется возможность рассчитать параметры точности предсказания (ACC), оптимального порогового значения оценочной функции (приводящего к максимальной точности) (ОТ), а также доли извлечённых истинно активных и истинно неактивных соединений при исполь-

162

зовании порогового значения. Анализ ROC проводили с использованием веб-сервера StAR, а также standalone-версии данной программы [StAR], которые позволяют также оценить статистическую значимость различий между классификаторами. Для оценки значимости было использовано значение p = 0.95. Достоинством метода является статистическая достоверность и устойчивость результатов при изменении соотношения активных и неактивных соединений в анализируемой выборке (при сохранении распределения оценок).

Метод BEDROC используется для оценки обогащения в наиболее высоко ранжированной части хитлиста — так называемого «раннего обогащения» [223]. Расчёт метрики осуществляется по следующей формуле:

$$BEDROC = \frac{\sum_{i=1}^{n} e^{\frac{-\alpha r_i}{N}}}{\frac{n}{N} \left(\frac{1-e^{-\alpha}}{e^{\alpha/N}-1}\right)} \frac{R_a \sinh(\alpha/2)}{\cosh(\alpha/2) - \cosh(\alpha/2 - \alpha R_a)} + \frac{1}{1-e^{\alpha(1-R_a)}},$$

где *п* — число активных соединений, *N* — общее число соединений в исследуемой выборке,  $R_a$  — доля активных соединений в выборке,  $r_i$  — ранг *i*-того активного соединения,  $\alpha$  — параметр раннего обогащения (обратно пропорционален доле хитлиста, для которой важно обогащение). В нашей работе было использовано значение  $\alpha = 20$ , позволяющее анализировать как исходную выборку, «пересыщенную» активными соединениями, так и её подвыборки меньшего размера. Вычисление BEDROC проводилось с помощью программы, предоставленной авторами метода. Анализ ненасыщенных подвыборок проводился с помощью процедуры бутстреппинга, заключавшейся в разделении выборки истинно активных соединений, ранжированной в соответствии с исследуемой оценочной функцией, на 20 групп, в каждой из которых содержались соединения с номерами m + 50j, где m и j варьируют от 1 до 20, m — номер группы, j итератор. Для каждой группы проводился расчёт BEDROC, после чего значения усреднялись. Получаемые таким образом значения *BEDROC*<sub>1</sub> для различных групп близки друг к другу, однако относительно невелики по абсолютному значению вследствие использования обширной выборки активных соединений, покрывающей значительный диапазон активности и значений оценочных функций.

## 5.2.4. Докинг библиотеки ZINC

Докинг подготовленной библиотеки ZINC осуществляли на вычислительном кластере с использованием программы FRED. Библиотека была разделена на 170 частей размером от 1700 до 17 000 соединений в соответствии с изначальным разделением базы данных. Проводился докинг в структуру киназы 1R0E, подготовленную как описано выше, и генерировались хитлисты по 1000 соединений с использованием оценочных функций Chemgauss3, PLP, OEChemScore, ScreenScore и Shapegauss, а также консенсусный хитлист по всем пяти функциям. Хитлисты для каждой оценочной функции были объединены и подвергнуты повторному скринингу с использованием тех же оценочных функций; для каждой функции вновь генерировался хитлист объёмом 1000 соединений. Итого было создано 36 хитлистов для всех возможных попарных комбинаций оценочных функций (табл. 2.14). Каждый из них был подвергнут визуальному анализу в программе VIDA 4.0 [209] с целью удаления соединений, не обладающих необходимой комбинацией взаимодействий с киназой либо зафиксированных в нереалистичных конформациях. В частности, были отброшены молекулы, в которых донором и акцептором водородной связи с шарнирными аминокислотными остатками является одна и та же группировка, например, гидроксил; молекулы, формально удовлетворяющие изначальным ограничениям, однако расположенные неприемлемым образом.

#### 5.2.5. Фармакофорный поиск

Фармакофорный поиск проводился с использованием программы ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures, быстрое наложение химических структур [209]). При построении фармакофорной модели ROCS было использовано наложение рентгеновских структур комплексов ингибиторов с киназой. При построении модели ROCS генерирует молекулярную форму, представляющую собой объединение молекулярных форм ингибиторов, используемых для построения модели [218], и набор всех фармакофорных элементов, имеющихся в молекулах: доноры и акцепторы водородной связи, циклы, гидрофобные элементы, катионы и анионы. Фармакофорные элементы представляются в виде «цветных атомов», каждый из которых может обладать одним или несколькими из перечисленных свойств. Если центры «цветных атомов» различных молекул расположены достаточно близко друг от друга (< 0.7 Å), проводится

объединение «цветных атомов». Каждому «цветному атому» можно приписать параметр веса, характеризующий важность этого элемента для проявления искомой биологической активности.

При построении модели генерируются все возможные фармакофорные гипотезы, основанные на не более чем n молекулах из тех, что были предъявлены пользователем. Число n не может быть больше исходного числа молекул; в нашем случае n = 5. Отбор гипотез осуществляется на основе их соответствия всем остальным структурам, использованным при построении модели.

Оценка соответствия молекулы фармакофорной гипотезе производится с помощью индекса подобия Танимото. Используются два критерия: подобие молекулярной формы (ShapeTanimoto) и подобие расположения «цветных атомов» в гипотезе и в молекуле (ColorTanimoto). Сумма этих параметров (TanimotoCombo) является общей мерой подобия молекулы гипотезе и может быть использована при оценке качества модели методами ROC и BEDROC. Методология валидации аналогична методологии валидации BC методом докинга (см. гл. 5.2.3).

#### 5.2.6. Одноклассовая классификация

Одноклассовая классификация основана на идее, что вся необходимая информация для нахождения новых активных соединений содержится в выборке известных активных соединений [268]. Таким образом, на основе достаточно обширной выборки ингибиторов GSK-3 возможно создание новых ингибиторов, руководимое одноклассовым классификатором.

Нами был разработан одноклассовый классификатор, основанный на искусственной нейронной сети (ИНС) с обратным распространением ошибки с кодированием и декодированием сигнала [220]. Суть метода заключается в обучении ИНС воспроизводить молекулярный отпечаток FP2 [269]: на вход сети подаётся молекулярный отпечаток длиной 1024 бита, на выходе сети этот отпечаток должен быть реконструирован. Точность реконструкции определяется путём сравнения воспроизведённого отпечатка с исходным с помощью индекса Танимото; чем выше подобие исходного и воспроизведённого отпечатка, тем выше вероятность, что данное соединение будет активным. Классификатор можно статистически валидировать с помощью методов ROC и BEDROC.

165

Построение молекулярного отпечатка FP2 основано на индексировании линейных путей в молекулярном графе длиной от одного до семи атомов (атомы C, N и O игнорируются); путь прерывается, если атомы образуют цикл. Для каждого из таких фрагментов записываются атомы, способ их связи и факт замкнутости цикла, после чего фрагмент сохраняется в канонической форме. Каждый фрагмент учитывается лишь однажды, после чего ему приписывается номер от 0 до 1020, определяющий позицию бита в строке из 1024 бит.

Обучение нейронной сети проводилось с использованием 67% активных соединений в качестве обучающей выборки и 33% в качестве внутреннего контроля. Обучение прекращали при возрастании ошибки на внутренней контрольной выборке в течение 50 циклов обучения. Поскольку разбиение выборки и само обучение — стохастические процессы, проводился отбор различных моделей («экспертов»), для которых качество воспроизведения данных было наилучшим: были отобраны три модели с тремя нейронами в скрытом слое и три модели с четырьмя нейронами в скрытом слое. Окончательная оценка представляет собой среднее арифметическое оценок, выставляемых индивидуальными моделями.

#### 5.2.7. Виртуальный скрининг по наличию подструктуры

Виртуальный скрининг по наличию подструктуры осуществляли с использованием программы 3DFS [270]. Данная программа анализирует файлы структурных данных (SDF), выводя те молекулы, которые содержат фрагмент, подаваемый на вход программы.

#### 5.2.8. Виртуальный скрининг по электростатическому подобию

При проведении виртуального скрининга по электростатическому подобию использовалась единственная шаблонная молекула — химениальдизин **35**. Для неё была построена фармакофорная гипотеза ROCS, состоящая из молекулярной формы и всех цветных атомов, по которой проводилось первичное фильтрование 170 выборок из библиотеки ZINC (см. 5.2.4). Объём хитлиста каждой выборки составлял 500 соединений, поскольку вследствие небольшого объёма шаблонной молекулы большинство более крупных соединений получает заниженные оценки. Хитлисты были объединены, профильтрованы по подобию электростатического потенциала с помощью программы EON [209, 271] и ранжированы по значению оценочной функции ET\_combo. Докинг проводился для 1830 хитов с наивысшими значениями оценочной функции по процедуре, описанной в разделе 5.2.2. Результаты докинга были получены для 831 структуры; причины неудачного докинга — отсутствие необходимых для удовлетворения структурным ограничениям фрагментов молекулы либо неприемлемая ориентация при удовлетворении структурным ограничениям.

Оценка электростатического подобия проводилась с использованием функции ET\_combo, являющейся суммой двух параметров: подобие формы по Танимото и подобие электростатического потенциала по Танимото (ET\_pb, используется диэлектрическая постоянная  $\varepsilon = 80$ ). Электростатический потенциал рассчитывается путём решения уравнения Пуассона — Больцмана с помощью метода Zap [271].

#### 5.3. Дизайн ингибиторов de novo

Дизайн ингибиторов *de novo* проводился с помощью программы LigBuilder [229]; был использован алгоритм GROW — наращиваются путём извлечения структурных фрагмента. Заместители наращиваются путём извлечения структурных фрагментов из библиотеки и присоединения их к центральному фрагменту. На каждой стадии происходит оценка энергии связывания с помощью эмпирической оценочной функции, сохраняются только те заместители, которые приводят к улучшению связывания. Кроме того, имеется список нежелательных фрагментов, наличие которых в молекуле приводит к нежелательному увеличению её реакционной способности либо привносит токсичность. Также было использовано ограничение на молекулярную массу генерируемых структур — не более 600 г/моль. Отбор соединений для дальнейшего исследования проводился на основе оценки их новизны и синтетической доступности.

## 5.4. Анализ механизма неконкурентного ингибирования манзаминами

В качестве модельного лиганда из серии манзаминов был выбран наиболее изученный и один из наиболее активных — манзамин А. Поиск возможных мест связывания манзамина А на поверхности GSK-3 проводили по следующей схеме:

1. Генерация структур комплекса манзамин-киназа;

167

2. Отбор моделей комплексов, которые можно соотнести с какими-либо функциональными аналогами либо механизмами;

3. Исследование устойчивости и механических свойств отобранных комплексов методом моделирования молекулярной динамики;

4. Анализ результатов моделирования и выбор приоритетной структуры комплекса для дальнейших исселедований;

5. Поиск новых потенциальных неконкурентных ингибиторов методом виртуального скрининга.

#### 5.4.1. Молекулярный докинг

Поиск возможных способов связывания манзамина A с киназой гликогенсинтазы 3 проводили методом докинга с помощью программы AutoDock 4.01, в которой реализован генетический алгоритм поиска оптимального решения [272, 273]. Использовали структуру киназы в активированной форме (pTyr216), извлечённую из базы данных PDB (код доступа 1GNG [44]). Оптимизацию и первичную подготовку структуры белка проводили с помощью средств программного комплекса SYBYL 8.0 [217]. Подготовку структур белка и лиганда к докингу осуществляли с помощью программного комплекса AutoDockTools 1.4.5 [274]. Заряды на атомах белка и лиганда рассчитывали по схеме Гастайгера [242].

Расчёт потенциалов лиганд-рецепторного взаимодействия проводился в узлах сетки, включающей все области, пригодные для связывания лиганда. В связи с внутренними ограничениями программы докинга на размер сеток были построены три сетки, для каждой из которых генерировались 100 ориентаций лиганда. Связь между карболиновой и полициклической группировками лиганда была явным образом помечена как подвижная. Построенные таким образом наборы ориентаций лиганда разбивались на кластеры на основе значения среднеквадратичного отклонения между структурами; пороговое значение отклонения составляло 2.0 Å. Представительные структуры из каждого кластера использовались для дальнейшего анализа.

#### 5.4.2. Анализ результатов докинга

Оценку энергии связывания для различных ориентаций лиганда проводили с помощью оценочной функции AutoDock [273] и набора оценочных функций CScore [264], входящего в состав программного пакета SYBYL 8.0 и включающего в себя

оценочные функции G\_score [232], D\_score [208], PMF\_score [265] и ChemScore [260]. Выбор ориентаций лиганда в различных областях связывания для дальнейшего исследования осуществляли на основе значений оценочных функций и визуального анализа.

#### 5.4.3. Моделирование молекулярной динамики

Моделирование молекулярной динамики для всех систем проводили с использованием программного комплекса AMBER 10 [275]. Использовали силовое поле AMBER ff99SB [276] для молекулы белка и силовое поле GAFF [277] для молекулы лиганда. Заряды на атомах белка расставляли в соответствии с силовым полем AMBER ff99SB, а на атомах лиганда вычисляли по схеме AM1-BCC [249] с помощью программы Antechamber 1.27 [250]. С целью сокращения времени расчёта на длины связей, в которых принимают участие атомы водорода, были наложены ограничения с помощью алгоритма SHAKE [278]. Суммарный заряд системы нейтрализовали путём добавления необходимого числа хлорид-ионов.

При моделировании молекулярной динамики использовали явное представление молекул воды с помощью модели ТІРЗР [279] и периодические граничные условия. Форма бокса с растворителем представляла собой усечённый октаэдр. Температуру системы поддерживали равной 300 К с помощью метода Ланжевена, параметр частоты столкновений брали равным 2 пс<sup>-1</sup>. Процедура подготовки системы к накоплению траектории включала в себя следующие стадии:

1. Минимизация энергии молекул растворителя (500 итераций методом наискорейшего спуска, 500 итераций методом сопряжённых градиентов) с наложением силовых ограничений на положение атомов белка и лиганда (500 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>));

2.Постепенный нагрев системы от 0 К до 300 К в течение 50 пс (шаг интегрирования — 2 фс) с использованием силовых ограничений на положение атомов белка и лиганда (2 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>)) при постоянном объёме системы;

3.Оптимизация плотности системы в течение 50 пс (шаг интегрирования — 2 фс) при постоянном давлении и температуре с использованием силовых ограничений на положение атомов белка и лиганда (2 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>));

4. Уравновешивание (equilibration) системы в течение 500 пс (шаг интегрирования — 2 фс) при постоянном давлении и температуре без силовых ограничений.

169

Моделирование молекулярной динамики проводили на 256 процессорах суперкомпьютера СКИФ МГУ «ЧЕБЫШЁВ» (НИВЦ МГУ) с использованием шага интегрирования, равного 2 фс. Моделировали 10 нс динамики; в случае недостаточно однозначных результатов проводили дополнительное моделирование.

#### 5.4.4. Конформационный поиск

Конформационный поиск для молекулы манзамина проводился при помощи программы LMOD [234], входящей в состав пакета AMBER 10, с целью сравнения конформационного поведения лиганда в комплексах и в свободном состоянии. Метод основан на последовательном исследовании конформационного пространства путём движения вдоль низкоэнергетических коллективных степеней свободы молекулы. Колебательные (нормальные) моды и соответствующие им собственные векторы определялись только в точке локального минимума геометрии. В каждом последующем поиске геометрические параметры структуры последовательно изменялись вдоль одного из выбранных собственных векторов до тех пор, пока энергия системы после начального роста не начинала понижаться, что часто соответствует пересечению конформационного барьера. Далее проводилась локальная минимизация и оптимальная геометрия сравнивалась с набором уже полученных конформаций на предмет совпадения. В качестве начальной была выбрана конформация манзамина А, построенная в программе SYBYL 8.0 и оптимизированная в силовом поле Tripos [257] так, чтобы добиться визуального соответствия всех торсионных углов и конформаций циклов с рентгеноструктурными данными [167]. В процессе конформационного поиска для моделирования водного окружения применялась континуальная модель воды GBSA (граничное расстояние для несвязевых взаимодействий 25Å, обобщенная модель Борна [280], площадь поверхности молекул рассчитана по методу [281], константа поверхностного натяжения 0.005 ккал/(моль·Å)) в силу невозможности применения модели явного растворителя из-за сильно неравновесных геометрий полной системы, возникавших бы в противном случае в процессе конформационного поиска. В результате получен список из 100 конформаций, для некоторых из которых было проведено моделирование молекулярной динамики по схеме, описанной выше, с целью исследования их поведения в условниях модели явного растворителя (воды TIP3P).

# 5.4.5. Анализ результатов молекулярной динамики и конформационного поиска

Визуальный анализ траекторий молекулярной динамики проводили с помощью программы молекулярной графики VMD [262]. Построение корреляционных матриц осуществляли с помощью программы ptraj, входящей в состав AMBER 10; элементы такой матрицы отражают корреляцию координат С<sup> $\alpha$ </sup>-атомов различных аминокислотных остатков вдоль траектории. Коэффициент корреляции, близкий к единице, свидетельствует о преимущественно однонаправленном движении, близкий к минус единице — о противонаправленном движении, а близкий к нулю свидетельствует об отсутствии связи между движением соответствующих фрагментов белка. Изображение корреляционных матриц в виде карт строили с помощью программы LabPlot 1.5.1 [282].

Для повышения наглядности результатов конформационных исследований траектории лиганда в комплексах и свободном состоянии были модифицированы следующим образом: конформации манзамина А выравнивались по максимальному наложению (RMSD) пяти атомов углерода, образующих самую «жёсткую» часть каркаса молекулы манзамина (рис. 5.2).



Рис. 5.2. Конформация молекулы манзамина, соответствующая глобальному минимуму энергии. Жёлтым цветом выделен фрагмент, использованный для наложения. Оранжевым цветом выделен фрагмент макроцикла D, обсуждаемый в разд. 3.2.4. Остальные атомы окрашены согласно типам: Н — голубой, С — серый, N — синий, О — красный.

#### 5.4.6. Методология MM-PBSA

Оценку энергии связывания проводили с использованием методологии MM-PBSA [283], реализованной в рамках AMBER 10. Суть метода заключается в вычислении изменения свободной энергии ΔG для процесса связывания путём оценки средней по траектории свободной энергии Гиббса <G> для структур комплекса (С), лиганда (L) и свободного белка (Р):

 $\Delta < G > = < G_C > - < G_P > - < G_L >.$ 

Оценка энергии Гиббса производится на основе соотношения

 $< G > = < E_{MM} > + < G_S > - < TS_{MM} >$ ,

где <E<sub>MM</sub>> — средняя энергия структуры, оцененная методом молекулярной механики с помощью следующего соотношения:

 $< E_{MM} > = < E_{bond} > + < E_{angle} > + < E_{tors} > + < E_{vdW} > + < E_{el} >$ ,

члены которого соответствуют средним энергиям связей, валентных углов, торсионных углов, ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий. G<sub>S</sub> — это свободная энергия сольватации, вычисляемая путём численного решения уравнения Пуассона — Больцмана [284] (G<sub>S\_PBSA</sub>) или с помощью более простого вычислительно обобщённого метода Борна [285] (G<sub>S\_GBSA</sub>). Энтропийный вклад TS<sub>MM</sub> рассчитывается с помощью анализа нормальных мод траектории [286].

Во всех случаях для оценки энергии связывания использовали метод трёх траекторий, оценивая энергетические параметры свободных белка и лиганда на основе независимых траекторий. Альтернативой ему является метод одной траектории, при использовании которого оценка термодинамических параметров свободного белка и лиганда проводится на основе координат, извлечённых из траектории комплекса. Такая оценка допустима в случае небольших структурных изменений, индуцированных связыванием лиганда, однако при сравнении нескольких различных лиганд-рецепторных комплексов данное приближение является слишком грубым и в то же время более ресурсоёмким по сравнению с методом трёх траекторий.

## 5.5. Биоинформационный анализ

#### 5.5.1. Филогенетический анализ

Аминокислотные последовательности GSK-3 различных организмов были извлечены из базы данных Pubmed Protein [239]. Извлекали все последовательности, аннотированные как GSK-3, после чего отбрасывали те из них, которые были аннотированы явно ошибочно: слишком короткие последовательности, последовательности со слишком большими вставками или разрывами (> 30 аминокислотных остатков), последовательности со слишком низкой идентичностью GSK-3 человека (< 20%).

Выравнивание аминокислотных последовательностей строили с помощью ClustalX 2.0.11 [287], при необходимости вносили изменения вручную. Степень идентичности рассчитывали с помощью GENEDOC [288]. Филогенетическое дерево строили в программе MEGA 4 [289] методом объединения соседей с использованием анализа реконструкции филогении. Тысяча реплик была использована при бутстреппинге, модель — *p*-расстояние.

Анализ консервативности проводили с использованием веб-сервера ConSurf 3.0 [290-292], на котором производится анализ вариабельности остатков с точки зрения кодирующих их генных триплетов, а также визуализация консервативности при наличии структуры белка. Некоторые функционально консервативные замены достаточно маловероятны с точки зрения генетики, но в то же время некоторые неконсервативные ные замены соответствуют высокой консервативности генной последовательности.

#### 5.5.2. Построение моделей структуры киназы

Модели структуры GSK-3 были построены с помощью программы Modeller 9v7 [293]. В качестве шаблонов были использованы структуры GSK-3 в комплексе с индирубинами — 1UV5 [52] и 1Q41, цепь В [49]. Использование данных структур продиктовано тем фактом, что индирубины обладают высокой ингибиторной активностью как по отношению к GSK-3 человека, так и по отношению к GSK-3 других организмов [33-35]. С помощью каждого шаблона были построены 50 моделей для каждого исследуемого белка. Оптимизацию модели проводили методом моделирования отжига, реализованным в Modeller: оптимизация модели *slow*, 300 итераций метода сопряжённых градиентов, уточнение модели методом моделирования отжига *ve*- *ry\_slow*, 3 повтора оптимизации до достижения значения объектной функции Modeller > 10<sup>6</sup>. Выбор лучшей модели осуществляли на основе функции DOPE, объектной функции Modeller и оценки качества модели PROCHECK [294]. Лучшие модели, основанные на каждом из шаблонов, сравнивались с точки зрения параметров карты Рамачандрана и *z*-оценки метода ProSA [295] (табл. 4.3), которые свидетельствуют, что модели, основанные на шаблоне 1Q41, обладают лучшим стереохимическим качеством несмотря на отсутствие в шаблоне фрагмента петли  $\beta$ 4- $\beta$ 5. Сравнение моделей проводилось с помощью SYBYL 8.0.

Докинг библиотеки TCAMS [241] в модели проводился по методике, описанной в 5.2.4; единственное отличие состояло в генерации 500 конформаций для каждого соединения библиотеки, поскольку многие соединения в ней отличаются наличием значительного числа подвижных связей.

### Выводы

1. Разработана система консервативного виртуального скрининга, нацеленная на поиск конкурентных по отношению к АТФ ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3 (GSK-3) человека и основанная на трёх взаимодополняющих методах: молекулярном докинге, фармакофорном поиске и одноклассовой классификации. Надёжность системы подтверждена статистическими методами. С использованием системы предложены структуры новых потенциальных ингибиторов GSK-3.

2. С помощью неконсервативного виртуального скрининга, основанного на наличии подструктуры и электростатическом подобии, предложены структуры потенциальных ингибиторов GSK-3, принадлежащие к не исследованным ранее структурным классам.

3. Впервые построены модели количественных соотношений «пространственная структура — активность» для конкурентных ингибиторов GSK-3 человека методами CoMFA и CoMSIA с использованием новых схем расчёта частичных атомных зарядов KCM и DENR, приводящих к моделям с более высокой предсказательной способностью.

4. На основе систематического анализа механизма взаимодействия манзамина A с GSK-3 установлено наиболее вероятное место связывания неконкурентных ингибиторов. Впервые идентифицированы потенциальные неконкурентные ингибиторы GSK-3 путём виртуального скрининга библиотеки коммерчески доступных соединений ZINC, включающей 13 млн структур.

5. Впервые построены модели структуры GSK-3 паразитических организмов, вызывающих социально значимые заболевания. Сформулированы рекомендации по поиску потенциальных антипаразитарных лекарств, действующих на эти киназы; на основе молекулярного дизайна впервые предложены потенциальные ингибиторы GSK-3 *Candida dubliniensis, Chaetomium globosum* и *Leishmania major*. Для ряда соединений из библиотеки TCAMS, обладающих общей противомалярийной активностью, предложен потенциальный механизм действия — ингибирование GSK-3 малярийного плазмодия.

175

## Список литературы

- Embi N., Rylatt D. B., Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 107. P. 519–527.
- Mazanetz M. P., Fischer P. M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. // Nat. Rev. Drug Disc. 2007. V. 6. P. 464-479.
- Phiel C. J., Wilson C. A., Lee V. M.-Y., Klein P. S. GSK-3α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-β peptides. // Nature. 2003. V. 423. P. 435-439.
- Van Noort M., Meeldijk J., van der Zee R., Destree O., Clevers H. Wnt Signaling Controls the Phosphorylation Status of β-Catenin. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 17901-17905.
- Doble B. W., Woodgett J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1175-1186.
- Woodgett J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/Factor A. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 2431-2438.
- 7. Lau K.-F., Miller C. C. J., Anderton B. H., Shaw P.-C. Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. // J. Peptide Res. 1999. V. 54. P. 85-91.
- Wood-Kaczmar A., Kraus M., Ishiguro K., Philpott K. L., Gordon-Weeks P. R. An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3β is targeted to growing neurites and growth cones. // Mol. Cell. Neurosci. 2009. V. 42. P. 184–194.
- Patel S., Woodgett J. Glycogen Synthase Kinase-3 and Cancer: Good Cop, Bad Cop? // Cancer Cell. 2008. V. 14. P. 351-353.
- Rayasam G. V., Tulasi V. K., Sodhi R., Davis J. A., Ray A. Glycogen synthase kinase
  3: more than a namesake. // Br. J. Pharm. 2009. V. 156. P. 885–898.
- Cross D. A. E., Alessi D. R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. // Nature. 1995. V. 378. P. 785-789.
- 12. Henriksen E. J., Dokken B. B. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. // Current Drug Targets. 2006. V. 7. P. 1435-1441.
- Wagman A. S., Johnson K. W., Bussiere D. E. Discovery and Development of GSK3 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes. // Curr. Pharm. Des. 2004. V. 10. P.

1105-1137.

- Frame S., Zheleva D. Targeting glycogen synthase kinase-3 in insulin signalling. // Expert Opin. Ther. Targets. 2006. V. 10. P. 429-444.
- Eldar-Finkelman H. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. // TRENDS in Molecular Medicine. 2002. V. 8. P. 126-132.
- Jope R. S., Yuskaitis C. J., Beurel E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. // Neurochem. Res. 2007. V. 32. P. 577-595.
- Ougolkov A. V., Billadeau D. D. Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy? // Future Oncol. 2006. V. 2. P. 91-100.
- Martinez A. Preclinical Efficacy on GSK-3 Inhibitors: Towards a Future Generation of Powerful Drugs. // Med. Res. Rev. 2008. V. 28. P. 773-796.
- Peineau S., Bradley C., Taghibiglou C., Doherty A., Bortolotto Z. A., Wang Y. T., Collingridge G. L., The role of GSK-3 in synaptic plasticity. // Br. J. Pharm. 2008. V. 153. P. S428–S437.
- Zhu L.-Q., Wang S.-H., Liu D., Yin Y.-Y., Tian Q., Wang X.-C., Wang Q., Chen J.-G., Wang J.-Z. Activation of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibits Long-Term Potentiation with Synapse-Associated Impairments. // J. Neurosci. 2007. V. 27. №45. P. 12211–12220.
- Giese K. P. GSK-3: A Key Player in Neurodegeneration and Memory. // IUBMB Life.
  2009. V. 61. P. 516–521.
- Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. // J. Neurochem. 2008. V. 104. P. 1433–1439.
- Huang H.-C., Klein, P. S. Multiple Roles for Glycogen Synthase Kinase-3 as a Drug Target in Alzheimer's Disease. // Current Drug Targets. 2006. V. 7. P. 1389-1397.
- Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., Honda T., Yasutake K., Nihonmatsu N., Mercken M., Yamaguchi H., Sugiharai S., Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3β and its substrate tau. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95 P. 9637-9641.
- Miura T., Nishihara M., Miki T. Drug Development Targeting the Glycogen Synthase Kinase-3β (GSK-3β)-Mediated Signal Transduction Pathway:Role of GSK-3β in Myocardial Protection Against Ischemia/Reperfusion Injury. // J. Pharmacol. Sci.

2009. V. 109. P. 162-167.

- Blankesteijn W. M., van de Schans V. A. M., ter Horst P., Smits J. F. M. The Wnt/frizzled/GSK-3β pathway: a novel therapeutic target for cardiac hypertrophy. // Trends Pharm. Sci. 2008. V. 29. P. 175-180.
- Nishihara M., Miura T., Miki T., Tanno M., Yano T., Naitoh K., Ohori K., Hotta H., Terashima Y., Shimamoto K., Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3β-mediated myocardial protection. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2007. V. 43. P. 564–570.
- 28. Rowe M. K., Wiest C., Chuang D.M. GSK-3 is a viable potential target for therapeutic intervention in bipolar disorder. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2007. V. 31. P. 920-931.
- Beaulieu J.-M., Sotnikova T. D., Yao W.-D., Kockeritz L., Woodgett J. R., Gainetdinov R. R., Caron M. G. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 5099-5104.
- Woodgett J. R. Glycogen Synthase Kinase 3: An Introductory Synopsis. // Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) And Its Inhibitors. Eds.: Martinez A., Castro A., Medina M. Wiley-VCH. Hoboken, NJ, USA. 2006. P. 3-23.
- Kassir Y., Rubin-Bejerano I., Mandel-Gutfreund Y. The Saccharomyces cerevisiae GSK-3β homologs. // Current Drug Targets. 2006. V. 7. P. 1455-1465.
- Hoskins R. A., Carlson J. W., Kennedy C., Acevedo D., Evans-Holm M., Frise E., Wan K. H., Park S., Mendez-Lago M., Rossi F., Villasante A., Dimitri P., Karpen G. H., Celniker S. E. Sequence finishing and mapping of Drosophila melanogaster heterochromatin. // Science. 2007. V. 316. P. 1625-1628.
- Droucheau E., Primot A., Thomas V., Mattei D., Knockaert M., Richardson C., Sallicandro P., Alano P., Jafarshad A., Baratte B., Kunick C., Parzy D., Pearl L., Doerig C., Meijer L. *Plasmodium falciparum* glycogen synthase kinase-3: molecular model, expression, intracellular localisation and selective inhibitors. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1607. P. 181-196.
- Ojo K. K., Gillespie J. R., Riechers A. J., Napuli A. J., Verlinde C. L. M. J., Buckner F. S., Gelb M. H., Domostoj M. M., Wells S. J., Scheer A., Wells T. N. C., Van Voorhis W. C. Glycogen Synthase Kinase 3 Is a Potential Drug Target for African Trypanosomiasis Therapy. // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 3710-

3717.

- 35. Xingi E., Smirlis D., Myrianthopoulos V., Magiatis P., Grant K. M., Meijer L., Mikros E., Skaltsounis A.-L., Soteriadou K. 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. // Int. J. Parasitol. 2009. V. 39. P. 1289-1303.
- Qin C., Tang J., Kim K. Cloning and in vitro expression of TPK3, a *Toxoplasma gondii* homologue of shaggy/glycogen synthase kinase-3 kinases. // Mol. Biochem. Parasitol. 1998. V. 93. P. 278-283.
- Fabres A., Pinto de Andrade C., Guizzo M., Sorgine M. H. F., Paiva-Silva G. D. O., Masuda A., Da Silva Vaz Jr. I., Logullo C. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. // Parasitology. 2010. V. 137. P. 1537-1546.
- Logullo C., Witola W. H., Andrade C., Abreu L., Gomes J., da Silva Vaz Jr. I., Imamura S., Konnai S., Ohashi K., Onuma M. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. // Veterinary Parasitology. 2009. V. 161. P. 261-269.
- Kruggel A., Lemcke T. Comparative investigation of the ATP-binding site of human and plasmodial glycogen synthase kinase-3. // QSAR Comb. Sci. 2009. V. 28. P. 885-890.
- Kruggel A., Lemcke T. Generation and evaluation of a homology model of *Pf*GSK-3. // Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2009. V. 342. P. 327-332.
- Xiao J.-F., Li Z.-S., Sun M., Zhang Y., Sun C.-C. Homology modeling and molecular dynamics study of GSK3/SHAGGY-like kinase. // Comp. Biol. Chem. 2004. V. 28. P. 179-188.
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E., The Protein Data Bank. // Nucleic Acids Research. 2000. V. 28. P. 235-242.
- Ojo K. K., Arakaki T. L., Napuli A. J., Inampudi K. K., Keyloun K. R., Zhang L., Hol W. G. J., Verlinde C. L. M. J., Merritt E. A., Van Voorhis W. C. Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure–activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. // Mol.

Biochem. Parasitol. 2011. In Press. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2010.12.009.

- Bax B., Carter P. S., Lewis C., Guy A. R., Bridges A., Tanner R., Pettman G., Mannix C., Culbert A. A., Brown M. J. B., Smith D. G., Reith A. D., The Structure of Phosphorylated GSK-3β Complexed with a Peptide, FRATtide, that Inhibits β-Catenin Phosphorylation. // Structure. 2001. V. 9. P. 1143-1152.
- 45. Dajani R., Fraser E., Roe S. M., Yeo M., Good V. M., Thompson V., Dale T. C., Pearl L. H., Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3β to the axin-APC scaffold complex. // EMBO J. 2003. V. 22. P. 494-501.
- 46. Dajani R., Fraser E., Roe S. M., Young N., Good V. M., Dale T. C., Pearl L. H., Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3β: Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. // Cell. 2001. V. 105. P. 721–732.
- 47. Haar T. E., Coll J.T., Austen D.A. Structure of GSK3beta Reveals a Primed Phosphorylation Mechanism. // Nat. Struct. Biol. 2001. V. 8. P. 593-596.
- Aoki M., Yokota T., Sugiura I., Sasaki C., Hasegawa T., Okumura C., Ishiguro K., Kohno T., Sugio S., Matsuzaki T. Structural insight into nucleotide recognition in tauprotein kinase I/glycogen synthase kinase 3β. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 439-446.
- Bertrand J. A., Thieffine S., Vulpetti A., Cristiani C., Valsasina B., Knapp S., Kalisz H. M., Flocco M. Structural Characterization of the GSK-3beta Active Site Using Selective and Non-Selective ATP-Mimetic Inhibitors. // J. Mol. Biol. 2003. V. 333. P. 393–407.
- Bhat R., Xue Y., Berg S., Hellberg S., Ormö M., Nilsson Y., Radesäter A.-C., Jerning E., Markgren P.-O., Borgegård T., Nylöf M., Giménez-Cassina A., Hernández F., Lucas J. J., Díaz-Nido J., Avila J. Structural Insights and Biological Effects of Glycogen Synthase Kinase 3-specific Inhibitor AR-A014418. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 45937–45945.
- Gong L., Hirschfeld D., Tan Y.-C., Hogg J. H., Peltz G., Avnur Z., Dunten P. Discovery of potent and bioavailable GSK-3β inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. P. 1693-1696.
- Meijer L., Skaltsounis A.-L. L., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X. P., Vonica C. A. A., Brivanlou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Musacchio A., Roe S. M., Pearl L., Greengard P. GSK-3-selective
inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. // Chem. Biol. 2003. V. 10. P. 1255–1266.

- Atilla-Gokcumen G. E., Pagano N., Streu C., Maksimoska J., Filippakopoulos P., Knapp S., Meggers E. Extremely Tight Binding of a Ruthenium Complex to Glycogen Synthase Kinase 3. // ChemBioChem. 2008. V. 9. P. 2933-2936.
- Shin D., Lee S.-C., Heo Y.-S., Lee W.-Y., Cho Y.-S., Kim Y. E., Hyun Y.-L., Cho J. M., Lee Y. S., Ro S. Design and synthesis of 7-hydroxy-1H-benzoimidazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3β. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007. V. 17. P. 5686-5689.
- Zhang H.-C., Boñaga L. V. R., Ye H., Derian C. K., Damiano B. P., Maryanoff B. E. Novel bis(indolyl)maleimide pyridinophanes that are potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007. V. 17. P. 2863-2868.
- Menichincheri M., Bargiotti A., Berthelsen J., Bertrand J. A., Bossi R., Ciavolella A., Cirla A., Cristiani C., Croci V., D'Alessio R., Fasolini M., Fiorentini F., Forte B., Isacchi A., Martina K., Molinari A., Montagnoli A., Orsini P., Orzi F., Pesenti E., Pezzetta D., Pillan A., Poggesi I., Roletto F., Scolaro A., Tatò M., Tibolla M., Valsasina B., Varasi M., Volpi D., Santocanale C., Vanotti E. First Cdc7 Kinase Inhibitors: Pyrrolopyridinones as Potent and Orally Active Antitumor Agents. 2. Lead Discovery. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 293-307.
- 57. Saitoh M., Kunitomo J., Kimura E., Hayase Y., Kobayashi H., Uchiyama N., Kawamoto T., Tanaka T., Mol C. D., Dougan D. R. Design, synthesis and structure– activity relationships of 1,3,4-oxadiazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3β. // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 2017-2029.
- 58. Saitoh M., Kunitomo J., Kimura E., Iwashita H., Uno Y., Onishi T., Uchiyama N., Kawamoto T., Tanaka T., Mol C. D., Dougan D. R., Textor G. P., Snell G. P., Takizawa M., Itoh F., Kori M. 2-3-[4-(Alkylsulfinyl)phenyl]-1-benzofuran-5-yl-5methyl-1,3,4-oxadiazole derivatives as novel inhibitors of glycogen synthase kinase-3β with good brain permeability. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 6270-6286.
- Aronov A. M., Tang Q., Martinez-Botella G., Bemis G. W., Cao J., Chen G., Ewing N. P., Ford P. J., Germann U. A., Green J., Hale M. R., Jacobs M., Janetka J. W., Maltais F., Markland W., Namchuk M. N., Nanthakumar S., Poondru S., Straub J., ter Haar E., Xie X. Structure-Guided Design of Potent and Selective Pyrimidylpyrrole Inhibitors of

Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Using Conformational Control. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 6362-6368.

- Arnost M., Pierce A., ter Haar E., Lauffer D., Madden J., Tanner K., Green J. 3-Aryl-4-(arylhydrazono)-1H-pyrazol-5-ones: Highly ligand efficient and potent inhibitors of GSK3β. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. P. 1661-1664.
- Fiol C. J., Mahrenholz A. M., Wang Y., Roeske R. W., Roach P. J. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 14042-14048.
- Cho J.-H., Johnson G. V. W. Glycogen Synthase Kinase 3β Phosphorylates Tau at Both Primed and Unprimed Sites: Ddifferential Impact on Microtubule Binding. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 187-193.
- Frame S., Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. // Biochem. J. 2001. V. 359. P. 1-16.
- Ilouz R., Pietrokovski S., Eisenstein M., Eldar-Finkelman H. New Insights into the Autoinhibition Mechanism of Glycogen Synthase Kinase-3β. // J. Mol. Biol. 2008. V. 383. P. 999-1007.
- Martinez A., Alonso M., Castro A., Dorronsoro I., Gelpí J. L., Luque F. J., Pérez C., Moreno F. J., SAR and 3D-QSAR Studies on Thiadiazolidinone Derivatives: Exploration of Structural Requirements for Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 7103-7112.
- Cole A., Frame S., Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. // Biochem. J. 2004. V. 377. P. 249-255.
- Thornton T. M., Pedraza-Alva G., Deng B., Wood C. D., Aronshtam A., Clements J. L., Sabio G., Davis R. J., Matthews D. E., Doble B., Rincon M. Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3β Inactivation. // Science. 2008. V. 320. P. 667-670.
- Kaku S., Chaki S., Muramatsu M. GSK-3 Inhibitors: Recent Developments and Therapeutic Potential. // Current Signal Transduction Therapy. 2008. V. 3. P. 195-205.
- 69. Obligado S. H., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Zuk A., Meijer L., Nelson P. J. CDK/GSK-3 inhibitors as therapeutic agents for parenchymal renal diseases. // Kidney

Int. 2008. V. 73. P. 684-690.

- Rinnab L., Schütz S. V., Diesch J., Schmid E., Küfer R., Hautmann R. E., Spindler K.-D., Cronauer M. V. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 in Androgen-Responsive Prostate Cancer Cell Lines: Are GSK Inhibitors Therapeutically Useful? // Neoplasia. 2008. V. 10. P. 624-633.
- Wang Z., Smith K. S., Murphy M., Piloto O., Somervaille T. C. P., Cleary M. L. Glycogen synthase kinase 3 in *MLL* leukaemia maintenance and targeted therapy // Nature. 2008. V. 455. P. 1205-1209.
- Stambolic V., Ruel L., Woodgett J. R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. // Curr. Biol. 1996. V. 6. P. 1664-1668.
- Ryves W. J., Harwood, A. J. Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 by Competition for Magnesium. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2001. V. 280. P. 720-725.
- 74. Leclerc S., Garnier M., Hoessel R., Marko D., Bibb J. A., Snyder G. L., Greengard P., Biernat J., Wu Y.-Z., Mandelkow E.-M., Eisenbrand G., Meijer L. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease. A Property Common to Most Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors? // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 251-260.
- 75. Medina M., Castro A. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors reach the clinic.
  // Current Opinion in Drug Discovery & Development. 2008. V. 11. P. 533-543.
- Dokken B. B., Henriksen E. J. Chronic selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances glucose disposal and muscle insulin action in prediabetic obese Zucker rats. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006. V. 291. P. E207-E213.
- 77. Kelly S., Zhao H., Sun G. H., Cheng D., Qiao Y., Luo J., Martin K., Steinberg G. K., Harrison S. D., Yenari M. A.Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor Chir025 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucosedeprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. // Exp. Neurol. 2004. V. 188. P. 378–386.
- Cline G. W., Johnson K., Regittnig W., Perret P., Tozzo E., Xiao L., Damico C., Shulman G. I. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulinstimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. // Diabetes. 2002. V. 51. P. 2903–2910.

- Trowbridge J. J., Xenocostas A., Moon R. T., Bhatia M. Glycogen synthase kinase-3 is an in vivo regulator of hematopoietic stem cell repopulation. // Nat. Med. 2006. V. 12. P. 89-98.
- Kaidanovich-Beilin O., Eldar-Finkelman H. Long-term treatment with novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor improves glucose homeostasis in ob/ob mice: Molecular characterization in liver and muscle. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006. V. 316. P. 17-24.
- Serenó L., Coma M., Rodríguez M., Sánchez-Ferrer P., Sánchez M. B., Gich I., Agulló J. M., Pérez M., Avila J., Guardia-Laguarta C., Clarimón J., Lleó A., Gómez-Isla T. A novel GSK-3β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss *in vivo*. // Neurobiology of Disease. 2009. V. 35. P. 359-367.
- Rosa A., Kaster M., Binfare R., Morales S., Martinaparicio E., Navarrorico M., Martinez A., Medina M., Garcia A., Lopez M. Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. // Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008. V. 32. P. 1549-1556.
- Gross E. R., Hsu A. K., Gross G. J. Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase 3β. // Diabetes. 2007. V. 56. P. 127-136.
- Coghlan M. P., Culbert A. A., Cross D. A.E., Corcoran S. L., Yates J. W., Pearce N. J., Rausch O. L., Murphy G. J., Carter P. S., Cox L. R., Mills D., Brown M. J., Haigh D., Ward R. W., Smith D. G., Murray K. J., Reith A. D., Holder J. C. Selective Small Molecule Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 Modulate Glycogen Metabolism and Gene Transcription // Chem. Biol. 2000. V. 7. P. 793-803.
- Stukenbrock H., Mussmann R., Geese M., Ferandin Y., Lozach O., Lemcke T., Kegel S., Lomow A., Burk U., Dohrmann C., Meijer L., Austen M., Kunick C. 9-Cyano-1-azapaullone (Cazpaullone), a Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitor Activating Pancreatic β Cell Protection and Replication. // J. Med. Chem. 2008. V. 51. P. 2196-2207.
- Engler T. A., Henry J. R., Malhotra S., Cunningham B., Furness K., Brozinick J., Burkholder T. P., Clay M. P., Clayton J., Diefenbacher C., Hawkins E., Iversen P. W., Li Y., Lindstrom T. D., Marquart A. L, McLean J., Mendel D., Misener E., Briere D., O'Toole J. C., Porter W. J., Queener S., Reel J. K., Owens R. A., Brier R. A., Eessalu

T. E., Wagner J. R., Campbell R. M., Vaughn R. Substituted 3-Imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl-4-(1,2,3,4-tetrahydro-[1,4]diazepino-[6,7,1-hi]indol-7-yl)pyrrole-2,5-diones as Highly Selective and Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 3934-3937.

- Noble W., Planel E., Zehr C., Olm V., Meyerson J., Suleman F., Gaynor K., Wang L., LaFrancois J., Feinstein B., Burns M., Krishnamurthy P., Wen Y., Bhat R., Lewis J., Dickson D., Duff K. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 6990-6995.
- Uno Y., Iwashita H., Tsukamoto T., Uchiyama N., Kawamoto T., Kori M., Nakanishi A. Efficacy of a novel, orally active GSK-3 inhibitor 6-Methyl-N-[3-[[3-(1-methylethoxy)propyl]carbamoyl]-1H-pyrazol-4-yl]pyridine-3-carboxamide in tau transgenic mice. // Brain Research. 2009. V. 1296. P. 148-163.
- Eldar-Finkelman H., Eisenstein M. Peptide inhibitors targeting protein kinases. // Curr. Pharm. Des. 2009. V. 15. P. 2463-2470.
- Davis P. D., Hill C. H., Lawton G., Nixon J. S., Wilkinson S. E., Hurst S. A., Keech E., Turner S. E. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-bisarylmaleimides. // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 177-184.
- 91. Hers I., Tavaré J. M., Denton R. M. The Protein Kinase C Inhibitors Bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) Are Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 Activity. // FEBS Lett. 1999. V. 460. P. 433-436.
- 92. Kuo G.-H., Prouty C., DeAngelis A., Shen L., O'Neill D. J., Shah C., Connolly P. J., Murray W. V., Conway B. R., Cheung P., Westover L., Xu J. Z., Look R. A., Demarest K. T., Emanuel S., Middleton S. A., Jolliffe L., Beavers M. P., Chen X. Synthesis and Discovery of Macrocyclic Polyoxygenated Bis-7-azaindolylmaleimides as a Novel Series of Potent and Highly Selective Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitors. // J. Med. Chem. 2003. V. 46. P. 4021-4031.
- 93. Kozikowski A. P., Gaisina I. N., Petukhov P. A., Sridhar J., King L. T., Blond S. Y., Duka T, Rusnak M., Sidhu A. Highly Potent and Specific GSK-3b Inhibitors That Block Tau Phosphorylation and Decrease a-Synuclein Protein Expression in a Cellular Model of Parkinson's Disease // Chem. Med Chem. 2006. V. 1. P. 256-266.
- 94. Kozikowski A. P., Gaisina I. N., Yuan H., Petukhov P. A., Blond S. Y., Fedolak A.,

Caldarone B., McGonigle P. Structure-Based Design Leads to the Identification of Lithium Mimetics That Block Mania-like Effects in Rodents. Possible New GSK-3β Therapies for Bipolar Disorders. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. P. 8328-8332.

- Smith D. G., Buffet M., Fenwick A. E., Haigh D., Ife R. J., Saunders M., Slingsby B. P., Stacey R., Ward R. W. 3-Anilino-4-arylmaleimides: Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001. V. 11. P. 635-639.
- 96. Zhang H.-C., Derian C. K., McComsey D. F., White K. B., Ye H., Hecker L. R., Li J., Addo M. F., Croll D., Eckardt A. J., Smith C. E., Li Q., Cheung W.-M., Conway B. R., Emanuel S., Demarest K. T., Andrade-Gordon P., Damiano B. P., Maryanoff B. E. Novel Indolylindazolylmaleimides as Inhibitors of Protein Kinase C-β: Synthesis, Biological Activity, and Cardiovascular Safety. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 1725-1728.
- 97. Zhang H. C., White K. B., Ye H., McComsey D. F., Derian C. K., Addo M. F., Andrade-Gordon P., Eckardt A. J., Conway B. R., Westover L., Xu J. Z., Look R., Demarest K. T., Emanuel S., Maryanoff B. E. Macrocyclic Bisindolylmaleimides as Inhibitors of Protein Kinase C and Glycogen Synthase Kinase-3. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. V. 13. P. 3049-3053.
- 98. Zhang H.-C., Ye H., Conway B. R., Derian C. K., Addo M. F., Kuo G.-H., Hecker L. R., Croll D. R., Li J., Westover L., Xu J. Z., Look R., Demarest K. T., Andrade-Gordon P., Damiano B. P., Maryanoff B. E. 3-(7-Azaindolyl)-4-arylmaleimides as potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 3245-3250.
- 99. O'Neill D. J., Shen L., Prouty C., Conway B. R., Westover L., Xu J. Z., Zhang H. C., Maryanoff B. E., Murray W. V., Demarest K. T., Kuo G. H. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 7-azaindolyl-heteroaryl-maleimides as Potent and Selective Glycogen Synthase Kinase-3beta (GSK-3beta) Inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. 2004. V. 12. P. 3167-3185.
- 100. Shen L., Prouty C., Conway B. R., Westover L., Xu J. Z., Look R. A., Chen X., Beavers M. P., Roberts J., Murray W. V., Demarest K. T., Kuo G. H. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Macrocyclic Bis-7-azaindolylmaleimides as Potent and Highly Selective Glycogen Synthase Kinase-3 beta (GSK-3 beta) Inhibitors. // Bioorg.

Med. Chem. 2004. V. 12. P. 1239-1255.

- Engler T. A., Malhotra S., Burkholder T. P., Henry J. R., Mendel D., Porter W. J., Furness K., Diefenbacher C., Marquart A., Reel J. K., Li Y., Clayton J., Cunningham B., McLean J., O'toole J. C., Brozinick J., Hawkins E., Misener E., Briere D., Brier R. A., Wagner J. R., Campbell R. M., Anderson B. D., Vaughn R., Bennett D. B., Meier T. I., Cook J. A. The Development of Potent and Selective Bisarylmaleimide GSK3 Inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 899-903.
- 102. Ye Q., Xu G., Lv D., Cheng Z., Li J., Hu Y. Synthesis and biological evaluation of novel 4-azaindolyl-indolyl-maleimides as glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 4302-4312.
- 103. Bourderioux A., Beneteau V., Merour J.-Y., Baldeyrou B., Ballot C., Lansiaux A., Bailly C., Guevel R. L., Guillouzo C., Routier S. Synthesis and biological evaluation of novel oxophenylarcyriaflavins as potential anticancer agents. // Org. Biomol. Chem. 2008. V. 6. P. 2108-2117.
- 104. Gaisina I. N., Gallier F., Ougolkov A. V., Kim K. H., Kurome T., Guo S., Holzle D., Luchini D. N., Blond S. Y., Billadeau D. D., Kozikowski A. P. From a Natural Product Lead to the Identification of Potent and Selective Benzofuran-3-yl-(indol-3-yl)maleimides as Glycogen Synthase Kinase 3β Inhibitors That Suppress Proliferation and Survival of Pancreatic Cancer Cells. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 1853-1863.
- 105. Al-Awar R. S., Ray J. E., Hecker K. A., Joseph S., Huang J., Shih C., Brooks H. B., Spencer C. D., Watkins S. A., Schultz R. M., Considine E. L., Faul M. M., Sullivan K. A., Kolis S. P., Carr M. A., Zhang F. Preparation of novel aza-1,7-annulated indoles and their conversion to potent indolocarbazole kinase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 3925-3928.
- 106. Routier S., Peixoto P., Mérour J.-Y., Coudert G., Dias N., Bailly C., Pierré A., Léonce S., Caignard D.-H. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Naphthocarbazoles as Potential Anticancer Agents. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 1401-1413.
- 107. Bregman H., Williams D. S., Atilla G. E., Carroll P. J., Meggers E. An Organometallic Inhibitor for Glycogen Synthase Kinase 3. // J. Amer. Chem. Soc. 2004. V. 126. P. 13594-13595.
- 108. Williams D. S., Atilla G. E., Bregman H., Arzoumanian A., Klein P. S., Meggers E. Switching on a Signaling Pathway with an Organoruthenium Complex. // Angew.

Chem. Int. Ed. 2005. V. 44. P. 1984-1987.

- 109. Atilla-Gokcumen G. E., Williams D. S., Bregman H., Pagano N., Meggers E. Organometallic Compounds with Biological Activity: A Very Selective and Highly Potent Cellular Inhibitor for Glycogen Synthase Kinase 3. // ChemBioChem. 2006. V. 7. P. 1443-1450.
- 110. Bregman H., Carroll P. J., Meggers E. Rapid Access to Unexplored Chemical Space by Ligand Scanning around a Ruthenium Center: Discovery of Potent and Selective Protein Kinase Inhibitors. // J. Amer. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 877-884.
- 111. Bregman H., Meggers E. Ruthenium Half-Sandwich Complexes as Protein Kinase Inhibitors: An N-Succinimidyl Ester for Rapid Derivatizations of the Cyclopentadienyl Moiety. // Org. Lett. 2006. V. 8. P. 5465-5468.
- 112. Williams D. S., Carroll P. J., Meggers E. Platinum Complex as a Nanomolar Protein Kinase Inhibitor. // Inorg. Chem. 2007. V. 46. P. 2944-2946.
- 113. Pagano N., Maksimoska J., Bregman H., Williams D. S., Webster R. D., Xue F., Meggers E. Ruthenium half-sandwich complexes as protein kinase inhibitors: derivatization of the pyridocarbazole pharmacophore ligand. // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. P. 1218-1227.
- 114. Anand R., Maksimoska J., Pagano N., Wong E. Y., Gimotty P. A., Diamond S. L., Meggers E., Marmorstein R. Toward the Development of a Potent and Selective Organoruthenium Mammalian Sterile 20 Kinase Inhibitor. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 1602-1611.
- 115. Zhong H., Zou H., Semenov M. V., Moshinsky D., He X., Huang H., Li S., Quan J., Yang Z., Lin S. Characterization and development of novel small-molecules inhibiting GSK3 and activating Wnt signaling. // Mol. BioSyst. 2009. V. 5. P. 1356-1360.
- 116. Hoessel R., Leclerc S., Endicott J. A., Nobel M. E. M., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberger E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. // Nat. Cell Bio. 1999. V. 1. P. 60-67.
- 117. Guengerich F. P., Sorrells J. L., Schmitt S., Krauser J. A., Aryal P., Meijer L. Generation of New Protein Kinase Inhibitors Utilizing Cytochrome P450 Mutant Enzymes for Indigoid Synthesis. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 3236-3241.
- 118. Polychronopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis A.-L., Myrianthopoulos V., Mikros E.,

Tarricone A., Musacchio A., Roe S. M., Pearl L., Leost M., Greengard P., Meijer L. Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 935-946.

- 119. Wu Z.-L., Aryal P., Lozach O., Meijer L., Guengerich F. P. Biosynthesis of New Indigoid Inhibitors of Protein Kinases Using Recombinant Cytichrome P450 2A6. // Chemistry & Biodiversity. 2005. V. 2. P. 51.
- 120. Beauchard A., Ferandin Y., Frère S., Lozach O., Blairvacq M., Meijer L., Thiéry V., Besson T. Synthesis of Novel 5-substituted Indirubins as Protein Kinases Inhibitors. // Bioorg Med Chem. 2006. V. 14. P. 6434-6443.
- 121. Vougogiannopoulou K., Ferandin Y., Bettayeb K., Myrianthopoulos V., Lozach O., Fan Y., Johnson C. H., Magiatis P., Skaltsounis A.-L., Mikros E., Meijer L. Soluble 3',6-Substituted Indirubins with Enhanced Selectivity toward Glycogen Synthase Kinase -3 Alter Circadian Period. // J. Med. Chem. 2008. V. 51. P. 6421-6431.
- 122. Beauchard A., Laborie H., Rouillard H., Lozach O., Ferandin Y., Guével R. L., Guguen-Guillouzo C., Meijer L., Besson T., Thiéry V. Synthesis and kinase inhibitory activity of novel substituted indigoids. // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 6257-6263.
- 123. Hamann M. T., Hill R., Roggo S. Marine Natural Products. Key Advances to the Practical Application of this Resource in Drug Development. // CHIMIA International Journal for Chemistry. 2007. V. 61. P. 313-321.
- 124. Laport M. S., Santos O. C., Muricy G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2009. V. 10. P. 86-105.
- 125. Gompel M., Leost M., De Kier Joffe E. B., Puricelli L., Franco L. H., Palermo J., Meijer L. Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the Ascidian Aplidium meridianum. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 1703-1707.
- 126. Simone M., Erba E., Damia G., Vikhanskaya F., Di Franchesco A. M., Riccardi R., Bailly C., Cuevas C., Fernandez Sousa-Faro J. M., D'Incalci M. Variolin B and its derivate deoxy-variolin B: New marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity. // Eur. J. Cancer. 2005. V. 41. P. 2366-2377.
- 127. Echalier A., Bettayeb K., Ferandin Y., Lozach O., Clément M., Valette A., Liger F.,

Marquet B., Morris J. C., Endicott J. A., Joseph B., Meijer L. Meriolins (3-(Pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): Synthesis, Kinase Inhibitory Activity, Cellular Effects, and Structure of a CDK2/Cyclin A/Meriolin Complex. // J. Med. Chem. 2008. V. 51. P. 737-751.

- 128. Akue-Gedu R., Debiton E., Ferandin Y., Meijer L., Prudhomme M., Anizon F., Moreau P. Synthesis and biological activities of aminopyrimidyl-indoles structurally related to meridianins. // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 4420-4424.
- 129. Baunbaek D., Trinkler N., Ferandin Y., Lozach O., Ploypradith P., Rucirawat S., Ishibashi F., Iwao M., Meijer L. Anticancer alkaloid lamellarins inhibit protein kinases. // Mar. Drugs. 2008. V. 6. P. 514-527.
- 130. Meijer L., Thunnissen A.-M.W.H., White A.W., Garnier M., Nikolic M., Tsai L.-H., Walter J., Cleverley K.E., Salinas P.C., Wu Y.-Z., Biernat J., Mandelkow E.-M., Kim S.-H., Pettit G.R. Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases, GSK-3β and CK1 by Hymenialdisine, A Marine Sponge Cconstituent // Chem. Biol. 2000. V. 7. P. 51-65.
- 131. Lu H., Chang D. J., Baratte B., Meijer L., Schulze-Gahmen U. Crystal Structure of a Human Cyclin-Dependent Kinase 6 Complex with a Flavonol Inhibitor, Fisetin. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 737-743.
- Zhai S., Senderowicz A. M., Sausville E. A., Figg W. D. Flavopiridol, a novel cyclindependent kinase inhibitor, in clinical development. // Ann. Pharmacother. 2002. V. 36. P. 905-911.
- 133. Zaharevitz D. W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A. M., Lahusen T., Kunick C., Meijer L., Sausville E. A. Discovery and Initial Characterization of the Paullones, a Novel Class of Small-Molecule Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases. // Cancer Res. 1999. V. 59. P. 2566-2569.
- 134. Leost M., Schultz C., Link A., Wu Y. Z., Biernat J., Mandelkow E. M., Bibb J. A., Snyder G. L., Greengard P., Zaharevitz D. W., Gussio R., Senderowicz A. M., Sausville E. A., Kunick C., Meijer L. Paullones are Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3beta and Cyclin-Dependent Kinase 5/p25. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 5983-5994.
- 135. Schultz C., Link A., Leost M., Zaharevitz D. W., Gussio R., Sausville E. A., Meijer L., Kunick C. Paullones, a Series of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis, Evaluation of CDK1/Cyclin B Inhibition, and in Vitro Antitumor Activity. // J. Med.

Chem. 1999. V. 42. P. 2909-2919.

- 136. Wieking K., Knockaert M., Leost M., Zaharevitz D. W., Meijer L., Kunick C. Synthesis of paullones with aminoalkyl side chains. // Archiv der Pharmazie. 2002. V. 335. P. 311-317.
- 137. Pies T., Schaper K.-J. J., Leost M., Zaharevitz D. W., Gussio R., Meijer L., Kunick C. CDK1-inhibitory activity of paullones depends on electronic properties of 9-substituents. // Archiv der Pharmazie 2004. V. 337. P. 486-492.
- 138. Kunick C., Lauenroth K., Leost M., Meijer L., Lemcke T. 1-Azakenpaullone Is a Selective Inhibitor of Glycogen Synthase Kinase-3 beta. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 413-416.
- 139. Kunick C., Zeng Z., Gussio R., Zaharevitz D., Leost M., Totzke F., Schächtele C., Kubbutat M. H. G., Meijer L., Lemcke T. Structure-Aided Optimization of Kinase Inhibitors Derived from Alsterpaullone. // ChemBioChem. 2005. V. 6. P. 541-549.
- 140. Xie X., Lemcke T., Gussio R., Zaharevitz D. W., Leost M., Meijer L., Kunick C. Epoxide-Containing Side Chains Enhance Antiproliferative Activity of Paullones. // Eur. J. Med. Chem. 2005. V. 40. P. 655-661.
- 141. Mettey Y., Gompel M., Thomas V., Garnier M., Leost M., Ceballos-Picot I., Noble M., Endicott J., Vierfond J.-M., Meijer L. Aloisines, a New Family of CDK/GSK-3 Inhibitors. SAR Study, Crystal Structure in Complex with CDK2, Enzyme Selectivity, and Cellular Effects. // J. Med. Chem. 2003. V. 46. P. 222-236.
- 142. Bandarage U., Hare B., Parsons J., Pham L., Marhefka C., Bemis G., Tang Q., Moody C. S., Rodems S., Shah S., Adams C., Bravo J., Charonnet E., Savic V., Come J. H., Green J. 4-(Benzimidazol-2-yl)-1,2,5-oxadiazol-3-ylamine derivatives: Potent and selective p7086 kinase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 5191-5194.
- 143. Jacquemard U., Dias N., Lansiaux A., Bailly C., Logé C., Robert J.-M. M., Lozach O., Meijer L., Mérour J.-Y. Y., Routier S. Synthesis of 3,5-bis(2-indolyl)pyridine and 3-[(2-indolyl)-5-phenyl]pyridine derivatives as CDK inhibitors and cytotoxic agents. // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 4932-4953.
- 144. Witherington J., Bordas V., Haigh D., Hickey D. M., Ife R. J., Rawlings A. D., Slingsby B. P., Smith D. G., Ward R. W. 5-aryl-pyrazolo[3,4-b]pyridazines: Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003.

V. 13. P. 1581-1584.

- 145. Witherington J., Bordas V., Garland S. L., Hickey D. M., Ife R. J., Liddle J., Saunders M., Smith D. G., Ward R. W. 5-aryl-pyrazolo[3,4-b]pyridines: Potent Inhibitors of Glycogen Gynthase Kinase-3 (GSK-3). // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. V. 13. P. 1577-1580.
- 146. Witherington J., Bordas V., Gaiba A., Garton N. S., Naylor A., Rawlings A. D., Slingsby B. P., Smith D. G., Takle A. K., Ward R. W. 6-aryl-pyrazolo[3,4-b]pyridines: Potent Inhibitors of Gglycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. V. 13. P. 3055-3057.
- 147. Witherington J., Bordas V., Gaiba A., Naylor A., Rawlings A. D., Slingsby B. P., Smith D. G., Takle A. K., Ward R. W. 6-heteroaryl-pyrazolo[3,4-b]pyridines: Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. V. 13. P. 3059-3062.
- 148. Chioua M., Samadi A., Soriano E., Lozach O., Meijer L., Marco-Contelles J. Synthesis and biological evaluation of 3,6-diamino-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives as protein kinase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009 V. 19. P. 4566-4569.
- 149. Peat A. J., Garrido D., Boucheron J. A., Schweiker S. L., Dickerson S. H., Wilson J. R., Wang T. Y., Thomson S. A. Novel GSK-3 Inhibitors with Improved Cellular Activity. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 2127-2130.
- 150. Peat A. J., Boucheron J. A., Dickerson S. H., Garrido D., Mills W., Peckham J., Preugschat F., Smalley T., Schweiker S. L., Wilson J. R., Wang T. Y., Zhou H. Q., Thomson S. A. Novel pyrazolopyrimidine derivatives as GSK-3 inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 2121-2125.
- 151. Smalley Jr. T. L., Peat A. J., Boucheron J. A., Dickerson S., Garrido D., Preugschat F., Schweiker S. L., Thomson S. A., Wang T. Y. Synthesis and evaluation of novel heterocyclic inhibitors of GSK-3. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. V. 16. P. 2091-2094.
- 152. Tavares F. X., Boucheron J. A., Dickerson S. H., Griffin R. J., Preugschat F., Thomson S. A., Wang T. Y., Zhou H.-Q. N-Phenyl-4-pyrazolo[1,5-b]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3 with Good Cellular Efficacy. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 4716-4730.
- 153. Stevens K. L., Reno M. J., Alberti J. B., Price D. J., Kane-Carson L. S., Knick V. B.,

Shewchuk L. M., Hassell A. M., Veal J. M., Davis S. T., Griffin R. J., Peel M. R. Synthesis and evaluation of pyrazolo[1,5-b]pyridazines as selective cyclin dependent kinase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 5758-5762.

- 154. Ha H.-H., Kim J. S., Kim B. M. Novel heterocycle-substituted pyrimidines as inhibitors of NF-κB transcription regulation related to TNF-α cytokine release. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 653-656.
- 155. Maeda Y., Nakano M., Sato H., Miyazaki Y., Schweiker S. L., Smith J. L., Truesdale A. T. 4-Acylamino-6-arylfuro[2,3-d]pyrimidines: potent and selective glycogen synthase kinase-3 inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004. V. 14. P. 3907-3911.
- 156. Miyazaki Y., Maeda Y., Sato H., Nakano M., Mellor G. W. Rational design of 4amino-5,6-diaryl-furo[2,3-d]pyrimidines as potent glycogen synthase kinase-3 inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 1967-1971.
- 157. Laronze M., Boisbrun M., Léonce S., Pfeiffer B., Renard P., Lozach O., Meijer L., Lansiaux A., Bailly C., Sapi J., Laronze J.-Y. Synthesis and anticancer activity of new pyrrolocarbazoles and pyrrolo-β-carbolines. // Bioorg. Med. Chem. 2005. V. 13. P. 2263-2283.
- 158. Koryakova A. G., Ivanenkov Y. A., Ryzhova E. A., Bulanova E. A., Karapetian R. N., Mikitas O. V., Katrukha E. A., Kazey V. I., Okun I., Kravchenko D. V., Lavrovsky Y. V., Korzinov O. M., Ivachtchenko A. V. Novel aryl and heteroaryl substituted N-[3-(4phenylpiperazin-1-yl)propyl]-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamides as selective GSK-3 inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 3661-3666.
- 159. Рыжова Е. А., Корякова А. Г., Буланова Е. А., Микитась О. В., Карапетян Р. Н., Лавровский Я. В., Иващенко А. В. Синтез, биологическое тестирование и молекулярный докинг новых селективных ингибиторов гликоген-синтазыкиназы-3β. // Хим.-Фарм. Ж. 2009. Т. 43. №3. С. 26-31.
- 160. Lum C., Kahl J., Kessler L., Kucharski J., Lundström J., Miller S., Nakanishi H., Pei Y., Pryor K., Roberts E., Sebo L., Sullivan R., Urban J., Wang Z. 2,5-Diaminopyrimidines and 3,5-disubstituted azapurines as inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 3578-3581.
- 161. Pierce A. C., ter Haar E., Binch H. M., Kay D. P., Patel S. R., Li P. CH…O and CH…N Hydrogen Bonds in Ligand Design: A Novel Quinazolin-4-ylthiazol-2-ylamine Protein Kinase Inhibitor. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 1278-1281.

- 162. Martinez A., Alonso M., Castro A., Pérez C., Moreno F. J. First Non-ATP Competitive Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3β) Inhibitors: Thiadiazolidinones (TDZD) as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. // J. Med. Chem. 2002. V. 45. P. 1292-1299.
- 163. Castro A., Encinas A., Gil C., Bräse S., Porcal W., Pérez C., Moreno F. J., Martínez A. Non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β) inhibitors: Study of structural requirements for thiadiazolidinone derivatives. // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 495-510.
- 164. Rao K. V., Donia M. S., Peng J., Garcia-Palomero E., Alonso D., Martinez A., Medina M., Franzblau S. G., Tekwani B.L., Khan S. I., Wahyuono S., Willett K. L., Hamann M. T. Manzamine B and E and Ircinal A Related Alkaloids from an Indonesian Acanthostrongylophora Sponge and Their Activity Against Infectious, Tropical Parasitic, and Alzheimer's Diseases. // J. Nat. Prod. 2006. V. 69. P. 1034-1040.
- 165. Hamann M., Alonso D., Martín-Aparicio E., Fuertes A., Pérez-Puerto M. J., Castro A., Morales S., Navarro M. L., del Monte-Millán M., Medina M., Pennaka H., Balaiah A., Peng J., Cook J., Wahyuono S., Martínez A. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitory Activity and Structure–Activity Relationship (SAR) Studies of the Manzamine Alkaloids. Potential for Alzheimer's Disease. // J. Nat. Prod. 2007. V. 70. P. 1397-1405.
- 166. Ibrahim M. A., Shilabin A. G., Prasanna S., Jacob M., Khan S. I., Doerksen R. J., Hamann M. T., 2-N-Methyl modifications and SAR studies of manzamine A. // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 6702-6706.
- 167. Sakai R., Higa T., Jefford C. W., Bernardinelli G. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 6404-6405.
- 168. Kobayashi J., Tsuda M. Structures and Biogenesis of Manzamines and Related Alkaloids. // Heterocycles. 1997. V. 46. P. 765-794.
- 169. Yousaf M., Hammond N. L., Peng J., Wahyuono S., McIntosh K. A., Charman W. N., Mayer A. M. S., Hamann M. T. New Manzamine Alkaloids from an Indo-Pacific Sponge. Pharmacokinetics, Oral Availability, and the Significant Activity of Several Manzamines against HIV-I, AIDS Opportunistic Infections, and Inflammatory Diseases. // J, Med. Chem. 2004. V. 47. P. 3512-3517.
- 170. El Sayed K. A., Kelly M., Kara U. A. K., Ang K. K. H., Katsuyama I., Dunbar D. C.,

Khan A. A., Hamann M. T. New Manzamine Alkaloids with Potent Activity against Infectious Diseases. // J. Amer. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 1804-1808.

- 171. Shilabin A. G. G., Kasanah N., Tekwani B. L., Hamann M. T. Kinetic studies and bioactivity of potential manzamine prodrugs. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 1218-1221.
- 172. Plotkin B., Kaidanovich O., Talior I., Eldar-Finkelman H. Insulin mimetic action of synthetic phosphorylated peptide inhibitors of glycogen synthase kinase-3. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. P. 974-980.
- 173. Conde S., Pérez D. I., Martínez A., Perez C., Moreno F. J. Thienyl and Phenyl α-Halomethyl Ketones: New Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase (GSK-3β) from a Library of Compound Searching. // J. Med. Chem. 2003. V. 46. P. 4631-4633.
- 174. Perez D. I., Conde S., Pérez C., Gil C., Simon D., Wandosell F., Moreno F. J., Gelpí J. L., Luque F. J., Martínez A. Thienylhalomethylketones: Irreversible glycogen synthase kinase 3 inhibitors as useful pharmacological tools. // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 6914-6925.
- 175. Cramer III R. D., Patterson D. E., Bunce J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. // J. Am. Chem. Soc. 1988. V. 110. P. 5959-5967.
- 176. Klebe G., Abraham U., Mietzner T. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. // J. Med. Chem. 1994. V. 37. P. 4130-4146.
- 177. Kunick C., Lauenroth K., Wieking K., Xie X., Schultz C., Gussio R., Zaharevitz D., Leost M., Meijer L., Weber A., Jørgensen F. S., Lemcke T., Evaluation and Comparison of 3D-QSAR CoMSIA Models for CDK1, CDK5, and GSK-3 Inhibition by Paullones. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 22-36.
- 178. Lescot E., Bureau R., Sopkova-de Oliveira Santos J., Rochais C., Lisowski V., Lancelot J.-C., Rault S., 3D-QSAR and Docking Studies of Selective GSK-3β Inhibitors. Comparison with a Thieno[2,3-*b*]pyrrolizinone Derivative, a New Potential Lead for GSK-3β Ligands. // J. Chem. Inf. Model. 2005. V. 45. P. 708-715.
- Zeng M., Jiang Y., Zhang B., Zheng K., Zhang N., Yu Q., 3D QSAR studies on GSK-3 inhibition by aloisines. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 395–399.
- 180. Xiao J., Guo Z., Guo Y., Chu F., Sun P., Inhibitory mode of N-phenyl-4-pyrazolo[1,5-

*b*]pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amine series derivatives against GSK-3: molecular docking and 3D-QSAR analyses. // Prot. Eng. Des. Sel. 2006. V. 19. P. 47–54.

- 181. Zhang N., Jiang Y., Zou J., Zhang B., Jin H., Wang Y., Yu Q. 3D QSAR for GSK-3β inhibition by indirubin analogues. // Eur. J. Med. Chem. 2006. V. 41. P. 373–378.
- 182. Dessalew N., Patel D. S., Bharatam P. V., 3D-QSAR and molecular docking studies on pyrazolopyrimidine derivatives as glycogen synthase kinase-3β inhibitors. // J. Mol. Graph. Model. 2007. V. 25. P. 885–895.
- 183. Dessalew N., Bharatam P. V., 3D-QSAR and molecular docking study on bisarylmaleimide series as glycogen synthase kinase 3, cyclin dependent kinase 2 and cyclin dependent kinase 4 inhibitors: An insight into the criteria for selectivity. // Eur. J. Med. Chem. 2007. V. 42. P. 1014-1027.
- 184. Patel D. S., Bharatam P. V., Selectivity criterion for pyrazolo[3,4-b]pyrid[az]ine derivatives as GSK-3 inhibitors: CoMFA and molecular docking studies. // Eur. J. Med. Chem. 2008. V. 43. P. 949-957.
- 185. Wei Z., Zhang H., Cui W., Ji M.-J., Molecular Docking and 3D-QSAR on Maleimide Derivatives as Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitors. // Acta Phys.-Chim. Sin. 2009. V. 25. P. 890-896.
- 186. Prasanna S., Daga P. R., Xie A., Doerksen R. J., Glycogen synthase kinase-3 inhibition by 3-anilino-4-phenylmaleimides: insights from 3D-QSAR and docking. // J. Comput. Aided Mol. Des. 2009. V. 23. P.113–127.
- 187. Lather V., Kristam R., Saini J. S., Kristam R., Karthikeyan N. A., Balaji V. N., QSAR Models for Prediction of Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitory Activity of Indirubin Derivatives. // QSAR Comb. Sci. 2008. V. 27. P. 718 – 728.
- 188. Katritzky A. R., Pacureanu L. M., Dobchev D. A., Fara D. C., Duchowicz P. R., Karelson M., QSAR modeling of the inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3. // Bioorg. Med. Chem. 2006. V. 14. P. 4987–5002.
- 189. Sivaprakasam P., Xie A., Doerksen R. J., Probing the physicochemical and structural requirements for glycogen synthase kinase-3α inhibition: 2D-QSAR for 3-anilino-4phenylmaleimides. // Bioorg. Med. Chem. 2006. V. 14. P. 8210–8218.
- 190. Freitas M. P., A 2D image-based approach for modelling some glycogen synthase kinase 3 inhibitors. // Med. Chem. Res. 2007. V. 16. P. 461–467.
- 191. Prasanna S., Doerksen R. J., Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in

2D-QSAR. // Curr. Med. Chem. 2009. V. 16. P. 21-41.

- 192. Goodarzi M., Freitas M. P., Jensen R., Feature Selection and Linear/Nonlinear Regression Methods for the Accurate Prediction of Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitory Activities. // J. Chem. Inf. Model. 2009. V. 49. P. 824–832.
- 193. Kumar V., Madan A. K., Application of graph theory: prediction of glycogen synthase kinase-3 inhibitory activity of thiadiazolidinones as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. // Eur. J. Pharm. Sci. 2005. V. 24. P. 213–218.
- 194. Dessalew N., Bharatam P. V. Investigation of Potential Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors Using Pharmacophore Mapping and Virtual Screening. // Chem. Biol. Drug Des. 2006. V. 68. P. 154-165.
- 195. Dessalew N., Bharatam P. V. Identification of potential glycogen kinase-3 inhibitors by structure based virtual screening. // Biophys. Chem. 2007. V. 128. P. 165-175.
- 196. Liu L., Zhang L.-N., Jiang F.-C. Construction of the Pharmacophore Model of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors. // Chin. J. Chem. 2007. V. 25. P. 892-897.
- 197. Kim H.-J., Choo H., Cho Y. S., No K. T., Pae A. N. Novel GSK-3β inhibitors from sequential virtual screening. // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 636-643.
- 198. Taha M. O., Bustanji Y., Al-Ghussein M. A. S., Mohammad M., Zalloum H., Al-Masri I. M., Atallah N. Pharmacophore Modeling, Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis, and in Silico Screening Reveal Potent Glycogen Synthase Kinase-3β Inhibitory Activities for Cimetidine, Hydroxychloroquine, and Gemifloxacin. // J. Med. Chem. 2008. V. 51. P. 2062-2077.
- 199. Vadivelan S., Sinha B. N., Tajne S., Jagarlapudi S. A. R. P. Fragment and knowledgebased design of selective GSK-3β inhibitors using virtual screening models. // Eur. J. Med. Chem. 2009. V. 44. P. 2361-2371.
- 200. Gadakar P. K., Phukan S., Dattatreya P. M., Balaji V. N., Enrichment of potent GSK-3β inhibitors from docking studies in the enzyme active site. // Curr. Sci. 2007. V. 93. P. 1100-1107.
- 201. Gadakar P. K., Phukan S., Dattatreya P., Balaji V. N., Pose Prediction Accuracy in Docking Studies and Enrichment of Actives in the Active Site of GSK-3β. // J. Chem. Inf. Model. 2007. V. 47. P. 1446-1459.
- 202. Polgár T., Baki A., Szendrei G. I., Keseru G. M., Comparative Virtual and Experimental High-Throughput Screening for Glycogen Synthase Kinase-3β

Inhibitors. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 7946-7959.

- 203. Mishra N., Basu A., Jayaprakash V., Sharon A., Basu M., Patnaik K. K., Structure based virtual screening of GSK-3β: Importance of protein flexibility and induced fit. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 5582–5585.
- 204. Kang N. S., Lee G. N., Kim C. H., Bae M. A., Kim I., Cho Y. S., Identification of small molecules that inhibit GSK-3β through virtual screening. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 533–537.
- 205. Ventimila N., Dupont P.-Y., Laguerre M., Dessolin J. Description and assessment of a model for GSK-3β database virtual screening. // J. Enz. Inhib. Med. Chem. 2010. V. 25. P. 152-157.
- 206. Cheng Y., Prusoff W. H. Relationship Between the Inhibition Constant (K1) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. // Biochem. Pharmacol. 1973. V. 22. P. 3099-3108.
- 207. Cohen N. C. The Molecular Modeling Perspective in Drug Design. // Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. Ed.: Cohen N. C. Academic Press. Burlington, MS, USA. 1996. P. 1-17.
- 208. Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. // J. Mol. Biol. 1982. V. 161. P.269-288.
- 209. OpenEye Scientific Software. 9 Bisbee Court, Suite D. Santa Fe. New Mexico. 87508. USA.
- 210. Wolber G., Langer T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. // J. Chem. Inf. Model. 2005. V. 45. P. 160-169.
- 211. Rush T. S., Grant J. A., Mosyak L., Nicholls A. A Shape-Based 3-D Scaffold Hopping Method and Its Application to a Bacterial Protein–Protein Interaction. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 1489-1495.
- 212. Peltason L., Bajorath J. Molecular Similarity Analysis in Virtual Screening. // Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening. Eds.: Varnek A., Tropsha A. RSC Publishing. Cambridge, UK. 2008. P. 120-149.
- 213. Höltje H.-D., Sippl W., Rognan D., Folkers G. Molecular Modeling. Wiley-VCH. 2008. P. 233-263.
- 214. Карпов П. В., Баскин И. И., Палюлин В. А., Зефиров Н. С. Виртуальный

скрининг на основе одноклассовой классификации. // Докл. Акад. наук. 2011. В печати.

- 215. Huang N., Shoichet B. K., Irwin J. J. Benchmarking Sets for Molecular Docking. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 6789-6801.
- 216. Международный патент №2003/068932 на имя Chiron Corporation (США), опубликован 21 августа 2003 года.
- 217. SYBYL 8.0. Tripos International. 1699 South Hanley Rd. St. Louis. Missouri. 63144. USA.
- Nicholls A., McGaughey G. B., Sheridan R. P., Good A. C., Warren G., Mathieu M., Muchmore S. W., Brown S. P., Grant J. A., Haigh J. A., Nevins N., Jain A. N., Kelley B. Molecular Shape and Medicinal Chemistry: A Perspective. // J. Med. Chem. 2010. V. 53. P. 3862-3886.
- 219. Osolodkin D. I., Palyulin V. A., Zefirov N. S. Structure-based virtual screening of glycogen synthase kinase 3β inhibitors: Analysis of scoring functions applied to large true actives and decoy sets. // Chem. Biol. Drug Des. 2011. Submitted.
- 220. Hinton G. E., Salakhutdinov R. R. Reducing the Dimensionality of Data with Neural Networks. // Science. 2006. V. 313. P. 504-507.
- 221. Pierce A. C., Sandretto K. L., Bemis G. W. Kinase inhibitors and the case for CH…O hydrogen bonds in protein–ligand binding. // Proteins. 2002. V. 49. P. 567-576.
- 222. Triballeau N., Acher F., Brabet I., Pin J.-P., Bertrand H.-O. Virtual Screening Workflow Development Guided by the "Receiver Operating Characteristic" Curve Approach. Application to High-Throughput Docking on Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 4. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. P. 2534-2547.
- 223. Truchon J.-F., Bayly C.I. Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the "Early Recognition" Problem. // J. Chem. Inf. Model. 2007. V. 47. P. 488-508.
- 224. Irwin J. J., Shoichet B. K. ZINC-a free database of commercially available compounds for virtual screening. // J. Chem. Inf. Model. 2005. V. 45. P. 177-182.
- 225. Oprea T. I. Property distribution of drug-related chemical databases. // J. Comput. Aided Mol. Des. 2000. V. 14. P. 251-264.
- 226. Wang R., Wang S. How Does Consensus Scoring Work for Virtual Library Screening? An Idealized Computer Experiment. // J. Chem. Inf. Comp. Sci. 2001. V. 41. P. 1422-

1426.

- 227. ChemAxon Inc. http://chemaxon.com.
- 228. Осолодкин Д.И., Шульга Д.А., Царева Д.А., Олиференко А.А., Палюлин В.А., Зефиров Н.С. Выбор атомных зарядов при моделировании количественных соотношений пространственная структура — активность на примере пауллонов ингибиторов киназы гликогенсинтазы 3β // Докл. Акад. наук. 2010. Т. 434. №5. С. 692-696.
- 229. Wang R., Gao Y., Lai L. LigBuilder: A Multi-Purpose Program for Structure-Based Drug Design. // J. Mol. Model. 2000. V. 6. P. 498-516.
- Connolly M. L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. // Science.
  1983. V. 221. P. 709-713.
- 231. Zhang N., Jiang Y., Zou J., Yu Q., Zhao W. Structural basis for the complete loss of GSK3β catalytic activity due to R96 mutation investigated by molecular dynamics study. // Proteins. 2009. V. 75. P. 671-681.
- 232. Jones G., Willett P., Glen R., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. // J. Mol. Biol. 1997. V. 267. P. 727-748.
- 233. Converso A., Hartingh T., Garbaccio R. M., Tasber E., Rickert K., Fraley M. E., Yan Y., Kreatsoulas C., Stirdivant S., Drakas B., Walsh E. S., Hamilton K., Buser C. A., Mao X., Abrams M. T., Beck S. C., Tao W., Lobell R., Sepp-Lorenzino L., Zugay-Murphy J., Sardana V., Munshi S. K., Jezequel-Sur S. M., Zuck P. D., Hartman G. D., Development of thioquinazolinones, allosteric Chk1 kinase inhibitors. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 1240-1244.
- 234. Kolossváry I., Guida W. C. Low Mode Search. An Efficient, Automated Computational Method for Conformational Analysis: Application to Cyclic and Acyclic Alkanes and Cyclic Peptides. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 5011-5019.
- 235. Осолодкин Д.И., Шульга Д.А., Палюлин В.А., Зефиров Н.С. Моделирование методом молекулярной динамики взаимодействия манзамина А и киназы гликогенсинтазы 3β. // Изв. АН. Сер. хим. 2010. №10. С. 1932-1943.
- 236. Fraser E., Young N., Dajani R., Franca-Koh J., Ryves J., Williams R. S. B., Yeo M., Webster M.-T., Richardson C., Smalley M. J., Pearl L. H., Harwood A., Dale T. C. Identification of the Axin and FRAT Binding Region of Glycogen Synthase Kinase-3. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 2176-2185.

- 237. McCammon J. A. Protein dynamics. // Rep. Progr. Phys. 1984. V. 47. P. 1-46.
- 238. Cheng Y., Zhang Y., McCammon J. A. How does activation loop phosphorylation modulate catalytic activity in the cAMP-dependent protein kinase: A theoretical study. // Protein Sci. 2006. V. 15. P. 672-683.
- 239. Pubmed Protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein.
- 240. Chellan G., Shivaprakash S., Ramaiyar S. K., Varma A. K., Varma N., Sukumaran M. T., Vasukutty J. R., Bal A., Kumar H. Spectrum and Prevalence of Fungi Infecting Deep Tissues of Lower-Limb Wounds in Patients with Type 2 Diabetes. // J. Clin. Microbiol. 2010. V. 48. P. 2097-2102
- 241. Gamo F.-J., Sanz L. M., Vidal J., de Cozar C., Alvarez E., Lavandera J.-L., Vanderwall D. E., Green D. V. S., Kumar V., Hasan S., Brown J. R., Peishoff C. E., Cardon L. R., Garcia-Bustos J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. // Nature. 2010. V. 465. P. 305-310.
- 242. Gasteiger J., Marsili M. Iterative Partial Equalization of Orbital Electronegativity—A Rapid Access to Atomic Charges. // Tetrahedron. 1980. V. 36. P. 3219-3228.
- 243. Purcell W. P., Singer J. A. A brief review and table of semiempirical parameters used in the Hueckel molecular orbital method. // J. Chem. Eng. Data. 1967. V. 12. P. 235-246.
- 244. Halgren T. A. Merck Molecular Force Field. II. MMFF94 Van Der Waals and Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. // J. Comp. Chem. 1996. V. 17. P. 520-552.
- 245. Berthod H., Giessner-Prettre C., Pullman A. Sur les rôles respectifs des électrons  $\sigma$  et  $\pi$  dans les propriétés des dérivés halogénés des molécules conjuguées. Application à l'étude de l'uracile et du fluorouracile. // Theor. Chim. Acta. 1967. V. 8. P. 212-222.
- 246. Yakovenko O., Oliferenko A. A., Bdzhola V. G., Palyulin V. A., Zefirov N. S. Kirchhoff Atomic Charges Fitted to Multipole Moments: Implementation for a Virtual Screening System. // J. Comp. Chem. 2008. V. 29. P. 1332-1343.
- 247. Шульга Д. А. Разработка и параметризация топологически симметричных атомных зарядов для целей молекулярного моделирования. // Дисс. ... канд. хим. наук. Москва. 2009.
- 248. Shulga D. A., Oliferenko A. A., Pisarev S. A., Palyulin V. A., Zefirov N. S. Fast Tools for Calculation of Atomic Charges Well Suited for Drug Design. // SAR QSAR Env.

Res. 2008. V. 19. P. 153 – 165

- 249. Jakalian A., Jack D. B., Bayly C. I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: II. Parameterization and Validation. // J. Comp. Chem. 2002. V. 23. P. 1623-1641.
- 250. Wang J., Wang W., Kollman P., Case D. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. // J. Mol. Graph. Model. 2006. V. 25. P. 247-260.
- 251. Besler B. H., Merz Jr. K. M., Kollman P. A. Atomic charges derived from semiempirical methods. // J. Comput. Chem. 1990. V. 11. P. 431-439.
- 252. Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. P. 10269-10280.
- 253. http://ambermd.org/Questions/resp.html.
- 254. Löwdin P.-O. Approximate Formulas for Many-Center Integrals in the Theory of Molecules and Crystals. // J. Chem. Phys. 1953. V. 21. P. 374-382.
- 255. Mulliken R. S. Electronic Population Analysis on LCAOMO Molecular Wave Functions. I. // J. Chem. Phys. 1955. V. 23. P. 1833-1840.
- 256. Granovsky A. A. PC GAMESS version 7.0. http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html.
- 257. Clark M., Cramer III R. D., Van Opdenbosch N. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. // J. Comput. Chem. 1989. V. 10. P. 982-1012.
- 258. Hawkins P. C. D., Skillman A. G., Warren G. L., Ellingson B. A., Stahl M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. // J. Chem. Inf. Model. 2010. V. 50. P. 572-584.
- 259. Verkhivker G. M., Bouzida D., Gehlhaar D. K., Rejto P. A., Arthurs S., Colson A. B., Freer S. T., Larson V., Luty B. A., Marrone T., Rose P. W. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. // J. Comput. Aided Mol. Des. 2000. V. 14. P. 731-751.
- 260. Eldridge M. D., Murray C. W., Auton T. R., Paolini G. V., Mee R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. // J. Comput. Aided Mol. Des.

1997. V. 11. P. 425-445.

- 261. McGann M. R., Almond H. R., Nicholls A., Grant J. A., Brown F. K. Gaussian docking functions. // Biopolymers. 2003. V. 68. P. 76-90.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. P. 33-38.
- 263. Stahl M., Rarey M. Detailed Analysis of Scoring Functions for Virtual Screening. // J. Med. Chem. 2001. V. 44. P. 1035-1042.
- 264. Clark R., Strizhev A., Leonard J. M., Blake J. F., Matthew J. B. Consensus scoring for ligand/protein interactions. // J. Mol. Graph. Model. 2002. V. 20. P. 281-295.
- 265. Muegge I., Martin Y. C. A General and Fast Scoring Function for Protein–Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. // J. Med. Chem. 1999. V. 42. P. 791-804.
- 266. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C., Ghio C., Alagona G., Profeta Jr. S., Weiner P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 765-784.
- 267. Vergara I. A., Norambuena T., Ferrada E., Slater A. W., Melo F. StAR: a simple tool for the statistical comparison of ROC curves. // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. P. 265.
- 268. Baskin I. I., Kireeva N., Varnek A. The One-Class Classification Approach to Data Description and to Models Applicability Domain. // Mol. Inf. 2010. V. 29. P. 581-587.
- 269. Guha R., Howard M. T., Hutchison G. R., Murray-Rust P., Rzepa H., Steinbeck C., Wegner J., Willighagen E. L. The Blue Obelisk — Interoperability in Chemical Informatics. // J. Chem. Inf. Model. 2006. V. 46. P. 991-998.
- 270. Wang T., Zhou J. 3DFS: 3D Flexible Searching System for Lead Discovery New Version 1.2. // J. Mol. Model. 1999. V. 5. P. 231-251.
- 271. Grant J. A., Pickup B. T., Nicholls A. A smooth permittivity function for Poisson– Boltzmann solvation methods. // J. Comput. Chem. 2001. V. 22. P. 608-640.
- 272. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. // J. Comput. Chem. 1998. V. 19. P. 1639-1662.
- 273. Huey R., Morris G. M., Olson A. J., Goodsell D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. // J. Comput. Chem. 2007. V. 28. P. 1145-1152.
- 274. Sanner M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and

Development. // J. Mol. Graph. Mod. 1999. V. 17. P. 57-61.

- 275. Case D. A., Darden T. A., Cheatham, III T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Crowley M., Walker R. C., Zhang W., Merz K. M., Wang B., Hayik S., Roitberg A., Seabra G., Kolossváry I., Wong K. F., Paesani F., Vanicek J., Wu X., Brozell S. R., Steinbrecher T., Gohlke H., Yang L., Tan C., Mongan J., Hornak V., Cui G., Mathews D. H., Seetin M. G., Sagui C., Babin V., Kollman P. A. AMBER 10. University of California, San Francisco. 2008.
- 276. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. // Proteins. 2006. V. 65. P. 712-725.
- 277. Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A. Development and testing of a general amber force field. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. P. 1157-1174.
- 278. Ryckaert J., Ciccotti G., Berendsen H. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. // J. Comp. Phys. 1977. V. 23. P. 327-341.
- 279. Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R. W., Klein M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. // J. Chem. Phys. 1983. V. 79. P. 926-935.
- Onufriev A., Bashford D., Case D. A. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. // Proteins. 2004. V. 55. P. 383-394.
- 281. Hawkins G. D., Cramer C. J., Truhlar D. G. Parametrized Models of Aqueous Free Energies of Solvation Based on Pairwise Descreening of Solute Atomic Charges from a Dielectric Medium. // J. Phys. Chem. V. 100. P. 19824-19839.
- 282. Gerlach S. LabPlot: Data analysis and visualisation. 2009. http://labplot.sourceforge.net.
- 283. Kollman P. A., Massova I., Reyes C., Kuhn B., Huo S., Chong L., Lee M., Lee T., Duan Y., Wang W., Donini O., Cieplak P., Srinivasan J., Case D. A., Cheatham T. E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. // Acc. Chem. Res. 2000. V. 33. P. 889-897.
- 284. Luo R., David L., Gilson M. K. Accelerated Poisson–Boltzmann calculations for static and dynamic systems. // J. Comput. Chem. 2002. V. 23. P. 1244-1253.

- 285. Tsui V., Case D. A. Theory and applications of the generalized born solvation model in macromolecular simulations. // Biopolymers. 2000. V. 56. P. 275-291.
- 286. Srinivasan J., Cheatham T. E., Cieplak P., Kollman P. A., Case D. A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate–DNA Helices. // J. Amer. Chem. Soc. 1998. V. 120. P. 9401-9409.
- 287. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. // Bioinformatics. 2007. V. 23. P. 2947-2948.
- 288. Nicholas K. B., Nicholas Jr. H. B., Deerfield II D. W. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. // EMBnet.news. 1997. V. 4. P. 14-17.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Molecular Biology and Evolution. 2007. V. 24. P. 1596-1599.
- 290. Ashkenazy H., Erez E., Martz E., Pupko T., Ben-Tal N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. // Nucleic Acids Research. 2010. V. 38 (Web Server issue). P. W529-W533.
- 291. Landau M., Mayrose I., Rosenberg Y., Glaser F., Martz E., Pupko T., Ben-Tal N. Con-Surf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. // Nucleic Acids Research. 2005. V. 33 (Web Server issue). P. W299-W302.
- 292. Glaser F., Pupko T., Paz I., Bell R. E., Bechor D., Martz E., Ben-Tal N. ConSurf: Identification of Functional Regions in Proteins by Surface-Mapping of Phylogenetic Information. // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 163-164.
- 293. Šali A., Blundell T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. // J. Mol. Biol. 1993. V. 234. P. 779-815
- 294. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. PROCHECK a program to check the stereochemical quality of protein structures. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 283-291.
- 295. Sippl M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. // Proteins. 1993. V. 17. P. 355-362.