ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ
ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՍԻՐԱՆՈՒՅՇ ՎԱՀԱՆԻ ԳՐԱԲՍԿԱ

ԴԵՂԱՄԻՋՈՑՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿՈՎԱԼԵՆՏ ԿԱՄ ԲԱԶՄԱԹԻՐԱԽ
ԿԱՊՄԱՆ ՆՈՐ ՄՈՏԵՑՈՒՄՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՈՒՄԸ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒԹՅԱՆ
ԲԱՐՁՐԱՑՄԱՆ և ԿՈՂՄՆԱԿԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՆՎԱԶԵՑՄԱՆ
ՆՊԱՏԱԿՈՎ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2026

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГРАБСКА СИРАНУШ ВАГАНОВНА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ МЕХАНИЗМОВ КОВАЛЕНТНОГО ИЛИ
МНОГОЦЕЛЕВОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ И СНИЖЕНИЯ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

ЕРЕВАН 2026

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ֆիզմաթ. գիտ. թեկնածու
Ռուբեն Արմենի Աբագյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր
Կարեն Բաբկենի Նազարյան
կենս. գիտ. թեկնածու
Մարիամ Աշոտի Շահինյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Ինֆորմատիկայի և ավտոմատացման պրոբլեմների ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2026թ. դեկտեմբերի 4-ին ժամը 14^{00}-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2026թ. նոյեմբերի 4-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук,
Рубен Арменович Абагян

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Карен Бабкенович Назарян
кандидат биологических наук,
Мариам Ашотовна Шагинян

Ведущая организация: Институт проблем информатики и автоматизации НАН РА

Защита диссертации состоится 4-го декабря 2026г. в 14^{00} на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике КВОН РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, факультет биологии).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 4-го ноября 2026 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, доцент М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Современная разработка лекарственных средств существенно опирается на методы вычислительной биологии и хемоинформатики: дизайн лекарственных средств на основе пространственной структуры белков (SBDD, Structure-Based Drug Design), молекулярный докинг и биоинформатический анализ системных данных позволяют оптимизировать поиск соединений-лидеров, снизить временные и финансовые затраты на доклиническом этапе, а также прогнозировать эффективность и безопасность кандидатов. Надежность многоступенчатого дизайна лекарственных средств определяется тремя разными аспектами: выбором состояния биомедицинской мишени, конформации белковой структуры и локализации сайта связывания для скрининга; выбором фармакологического профиля лидирующего соединения, предполагающего воздействие на несколько мишеней [Hopkins, 2008; Chow et al., 2022, Krahn et al., 2020]; и выбором уровня клинической безопасности, при котором используемый препарат оценивается с учетом особенностей клинической истории пациента.

Исследование начинается с ключевой онкологической молекулярной мишени - рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), регулирующего рост и выживание клеток, и трудного для лечения вследствие возникновения мутантной резистентности, требований к селективности лекарства, а также множества экспериментальных структур, кардинально различающихся по качеству и пригодности для поиска новых ингибиторов [Uribe et al., 2021]. Более того, эффективность виртуального скрининга на основе структуры (SBVS, Structure-Based Virtual Screening) в отношении EGFR существенным образом ограничена высокой конформационной пластичностью его АТФ-связывающего сайта. Рецептор функционирует как динамический ансамбль конформационных состояний, в силу чего выбор кристаллографической структуры предопределяет результаты докинга уже на этапе подготовки рецепторной модели. Практическая значимость данной проблемы наиболее остро проявляется при моделировании необратимых ковалентно-связывающихся ингибиторов, таких как афатиниб, ковалентный ингибитор EGFR/HER2 второго поколения. В этой работе предлагается системная оценка чувствительности докинга к конформации мишени методом перекрестного докинга (cross-docking), при котором модель оценивается по правильности предсказания геометрии связывания лиганда к набору альтернативных кристаллографических структур того же белка. Способность алгоритма воспроизводить экспериментальное положение лиганда в таких условиях являлась бы прямым критерием валидности конформационной модели для последующего виртуального скрининга [Schaller et al., 2024] и значительно улучшила бы точность и скорость обнаружения доклинических кандидатов.

Следующая задача исходила из необходимости для некоторых молекулярных механизмов болезней в подавлении одним лекарством сразу нескольких мишеней. В работе рассмотрены три киназы, ответственные за патологическое гиперфосфорилирование тау-белка в болезни Альцгеймера. Белок фосфорилируется по более чем 40 сериновым, треониновым и тирозиновым остаткам, что приводит к диссоциации белка от микротрубочек и последующей агрегации с образованием нейрофибриллярных клубков [Zhang et al., 2022]. Ограниченность моноцелевого подхода наглядно подтверждается клиническими данными: селективный ингибитор GSK-3β tideglusib не обеспечил статистически значимого улучшения когнитивных функций во второй фазе клинических испытаний [Martinez et al., 2002], а ингибитор FYN saracatinib не достиг желаемых порогов эффективности [van Dyck et al., 2019]. Для

преодоления этого барьера в настоящей работе разработан и применен вычислительно-структурный подход, позволяющий оптимизировать единую молекулу с тройной активностью в отношении филогенетически дивергентных мишеней. Рассмотрены три киназы, образующие конвергентную нейрокиназную ось: GSK-3β, фосфорилирующая белок тау по остаткам Ser199, Ser396 и Ser413; DYRK1A, фосфорилирующая Thr212 и формирующая праймированный сайт для последующего действия GSK-3β; а также FYN-α, фосфорилирующая Tyr18. Структурная обоснованность направленного дизайна многоцелевых лигандов (multi-targeted ligands) опирается на его гибкость и возможность приспособиться к небольшим различиям АТФ-связывающих сайтов GSK-3β и DYRK1A (группа CMGC), а также FYN-α (группа TK, семейство Src). Консервативность переходного шарнирного участка (hinge region) обеспечивает пространственную комплементарность и допускает высокоаффинное связывание аминопиразольных скаффолдов со всеми тремя мишенями [Almaghrabi, 2025]. На этой основе выполнена мультикиназная вычислительно-структурная оптимизация аминопиразольной серии в отношении трёх киназ, вовлеченных в патологию болезни.

Третье измерение рассматриваемой проблемы лежит в опасных и токсичных побочных эффектах таргетной и иммунной терапии в онкологии. Разнородная популяция пациентов дополнительно усложняет задачу оценки нежелательных эффектов. Статистический анализ клинических данных позволил нам выявить необычные корреляции использования иммунных ингибиторов (immune checkpoint inhibitors, ICI), направленные против рецепторов антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4), программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) и его лиганда (PD-L1). Этот класс лекарств кардинально трансформировал лечение меланомы, немелкоклеточного рака легкого и почечно-клеточного карциномы за счёт фармакологической реактивации цитотоксических Т-лимфоцитов [Kong et al., 2024; Assal et al., 2015]. Однако блокада этих негативных регуляторных путей неизбежно приводит к индукции широкого спектра опасных побочных эффектов связанных с гиперактивными Т-клетками (immune-related adverse events, irAEs) [Spiers et al., 2019]. Потенциальная взаимосвязь тяжести этих побочных эффектов с сопутствующими инфекционными процессами отмечалась в отдельных клинических наблюдениях, а также в ретроспективных исследованиях фармакотерапии пембролизумабом [Makunts et al., 2022], однако данная закономерность до сих пор не получила систематической количественной оценки по всем мировым данным о побочных эффектах. Это представляет существенный научный пробел, учитывая активацию инфекционными патогенами врождённого и адаптивного иммунитета через сигнальные пути, перекрывающиеся с триггерами аутоиммунных патологий при применении иммунотерапии.

Таким образом, три представленных направления определяют цели новых вычислительных процедур для решения задач разработки более совершенных терапевтических агентов и их более безопасного применения. Эти процедуры требуют оптимизации и применение на конкретных практических задачах.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы - разработка структурно-биоинформатической методологии, позволяющей в рамках единого вычислительного рабочего процесса систематически преодолевать структурные, фармакологические и клинические ограничения разработки новых лекарственных средств. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние конформационной пластичности АТФ-связывающего кармана EGFR киназного домена на воспроизводимость и точность ковалентного докинга

методом перекрестного докинга (cross-docking) на ансамбле кристаллографических структур для оптимизации отбора рецепторных моделей.

2. Провести компьютерное моделирование производных аминопиразольного химического скаффолда для поиска и оценки сбалансированных многоцелевых ингибиторов, направленных на киназы вовлеченные в болезни Альцгеймера (GSK-3β / FYN-α / DYRK1A).
3. Провести молекулярное моделирование и оценить режимы связывания, пространственную конфигурацию и ключевые сети водородных связей новых производных тиено[3,2-d]пиримидина и родственных гетероциклов в АТФ-связывающих карманах киназ GSK-3β, FYN-α и DYRK1A. Рассчитать площадь полярной поверхности молекулы (polar surface area, PSA) и индекс проницаемости гематоэнцефалического барьера (BBB Score) для оптимизированных многокиназных лигандов для выявления структурных детерминант, определяющих их проникновение через гематоэнцефалический барьер.
4. Выполнить фармакоэпидемиологический анализ данных системы фармаконадзора FDA (FDA Adverse Event Reporting System, FAERS) для количественной оценки влияния сопутствующих инфекционных патологий на риск развития опасных побочных эффектов при раковой иммунотерапии.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

- Улучшение точности и многоступенчатого протокола ковалентного докинга химически реактивных лекарственных кандидатов: на ансамбле кристаллографических структур киназного домена рецептора эпидермального фактора роста найден способ улучшить модель АТФ-связывающего сайта (включая ковалентную связь с цистеином 797) и геометрическая точность связывающих конформаций ковалентных ингибиторов. Показано, что точность ковалентного докинга определяется выбором модели и предложена методика отбора.
- Рациональный дизайн ингибиторов со сложным профилем: разработана оригинальная схема многоцелевой *in silico* оптимизации, обеспечивающая переход от базового тиено[3,2-d]пиримидинового ядра к сбалансированным аминопиразольным лигандам, одновременно ингибирующим киназы GSK-3β, FYN-α и DYRK1A.
- Популяционная закономерность иммуноопосредованной токсичности: впервые на выборке из 80927 документов о нежелательных побочных эффектах иммуно-терапевтических антител против PD-1, PD-L1 и CTLA-4 показано, что сопутствующие инфекции у онкологических больных достоверно ассоциированы с повышением риска развития иммуно опосредованных побочных эффектов.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на 4 научных конференциях: BSES-SDGs (Ереван, Армения, 2025) - устный доклад; Lab Expo 2024, UCSD (Сан-Диего, США, 2024) - постерный доклад; 4th Annual Roger Tsien Cell Signaling Symposium (Сан-Диего, США, 2024) - постерный доклад; конференция AESA (Лос-Анджелес, США, 2023) - постерный доклад.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 работы (3 статьи и 1 тезис).

Объем и структура работы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 13 рисунков и 6 таблиц. Библиография включает 137 наименований литературных источников. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материала и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы систематизированы интегративные подходы к анализу молекулярных механизмов действия лекарственных средств. Особое внимание уделено роли конформационной динамики белков при связывании лигандов, в частности структурной пластичности EGFR и принципам его ковалентного ингибирования в онкологии. Подробно рассмотрена полифармакология взаимосвязанных киназных путей GSK-3β, FYN-α и DYRK1A при таупатиях. Отдельно проанализированы биологические механизмы действия ингибиторов иммунных контрольных точек (PD-1, PD-L1, CTLA-4) и спектр развивающихся нежелательных явлений на фоне иммунотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все процедуры молекулярного моделирования ковалентного и нековалентного докинга, структурный анализ и визуализация результатов выполнены в программном пакете MolSoft ICM-Pro (v.3.9-4a; Molsoft LLC, США) [Abagyan et al., 1994].

Ковалентный и ансамблевый докинг в киназный домен EGFR. Из базы данных PDB отобрано пять кристаллографических структур киназного домена EGFR человека с разрешением <3,0 Å, охватывающих активные и неактивные конформации. Валидацию ковалентного само-докинга (self-docking) проводили на структуре PDB ID: 4G5J (2,8 Å), где акриламидный электрофильный фрагмент афатиниба образует тиоэфирную ковалентную связь с S-атомом Cys797 [Solca et al., 2012]). Для ансамблевого перекрестного докинга (cross-docking) использованы PDB ID: 4I22, 3W33, 3POZ и 5U8L. Средняя оценка рассчитывалась как среднее значение ICM Score [Totrov & Abagyan, 1997] и нейросетевой модели RTCNN. Анализировали среднеквадратичное отклонение (root-mean-square deviation, RMSD) лиганда и сайта связывания относительно экспериментальной конформации 4G5J.

Моделирование и докинг мультикиназных ингибиторов. Структурные модели для докинг анализа были выбраны, PDB ID: 7OY5 (GSK-3β с **ARN25068**), 7OY6 (DYRK1A с **ARN25068**) [Demuro et al., 2022] и 2DQ7 (FYN-α со стауроспорином), с последующим включением структур PDB ID: 9FR6, 9FR9, 9FUF и 9FT2 [Demuro et al., 2026] в итеративный цикл экспериментальной валидации. Докинг лигандов серий I–IV проводили в ICM-Pro [Abagyan et al., 1994] при параметре thoroughness = 3,0. Для отобранных лигандов предсказывали PSA и BBB [Gupta et al. 2019]. Соединение считается способным проникать через BBB при значении выше 4 и PSA менее 100 Å^2.

Фармаконадзорный анализ данных FAERS. Ретроспективный анализ выполняли на основе базы данных FAERS (I кв. 2004 - II кв. 2023 гг., N = 19609804). Словарь наименований лекарственных средств унифицировали с привлечением баз данных ChEMBL, ZINC, PubChem и DrugBank; дубликаты (0,4%) удаляли. Из 233915 документов о применении ICI путём фильтрации по признаку монотерапии сформирована когорта объёмом n = 80927 (таблица 1).

Наличие сопутствующей инфекции определяли по 2454 терминам MedDRA (FDA Medical Query). К irAEs относили только патологии воспалительных терминов аутоиммунной или иммунодисрегуляторной этиологии (пневмонит, миокардит, нефрит, колит и др.), исключая инфекционные процессы [Spiers et al., 2019]. Частоту рассчитывали как долю документов, содержащих хотя бы один irAEs, от общего числа документов в анализируемой подкогорте.

Таблица 1. Состав когорт монотерапии ингибиторов PD-1, PD-L1, CTLA-4 , сформированных на основе базы данных FAERS (I кв. 2004 г. - II кв. 2023 г.).

Класс ICI	Препарат (торговое название)	Число документов о монотерапии (n)
PD-1 ингибитор	Пембролизумаб (Keytruda)	22580
PD-1 ингибитор	Ниволумаб (Opdivo)	38218
PD-1 ингибитор	Цемиплимаб(Libtayo)	680
PD-L1 ингибитор	Атезолизумаб (Tecentriq)	5310
PD-L1 ингибитор	Дурвалумаб(Imfinzi)	4398
PD-L1 ингибитор	Авелумаб (Bavencio)	912
CTLA-4 ингибитор	Ипилимумаб (Yervoy)	8829

Анализ диспропорциональности проводили путем расчета отношения шансов сообщений (Reporting Odds Ratio, ROR) с использованием четырехпольной таблицы сопряженности. Стандартную ошибку логарифма ROR применяли для построения 95% доверительных интервалов (Confidence Interval, CI); сигнал считали статистически значимым, если нижняя граница 95% CI превышала 1,0. Дополнительно рассчитывали относительный риск (Relative Risk, RR) как отношение частот irAEs между подкогортами. Анализ выполняли независимо для семи отдельных препаратов и трех классовых когорт; совпадение значимости по показателям ROR и RR рассматривали как мультиметрическую валидацию сигнала [Bleumink et al., 2004].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конформационная пластичность EGFR и её влияние на докинг ковалентного ингибитора

Валидация протокола. Надежность вычислительно-структурного подхода начинается с выбора рецепторной модели, поэтому первым этапом работы стала проверка того, в какой мере этот выбор предопределяет результат ковалентного докинга. Киназный домен EGFR был выбран в качестве модельной системы для проверки гипотезы о том, что даже незначительные конформационные вариации остатков сайта связывания критически влияют на точность предсказания позы лиганда, геометрию ковалентной связи и работу оценочных функций. Само-докинг афатиниба в кокристаллизованную конформацию (PDB ID: 4G5J) продемонстрировал высокую воспроизводимость: топ поза имела RMSD 0,95 Å относительно экспериментальной конформации, что существенно ниже порога в 2,0 Å (рисунок 1).

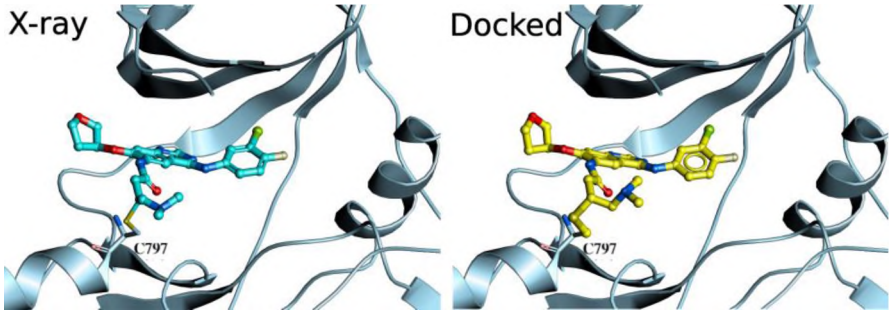


Рисунок 1. Конформация ко-кристаллизованного и докированного афатиниба.

Оценки составили -29,00 для ICM Score, -30,72 для RTCNN и -29,86 для средней оценки. Воспроизведение экспериментальной геометрии с субангстремной точностью подтверждает валидность протокола для перекрестного докинга.

Полученные результаты полностью согласуются с биохимическими характеристиками системы EGFR–афатиниб: данный ингибитор образует прочную необратимую тиоэфирную ковалентную связь с остатком Cys797. Это подтверждается высокими экспериментальными значениями константы инактивации второго порядка (k_{inact}/K_i), составляющей $1{,}5\times10^{7}$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$ для двойного мутанта EGFR-L858R/T790M и $6{,}3\times10^{6}$ $M^{-1}\cdot c^{-1}$ для рецептора дикого типа (WT) [Schwartz et al., 2014].

Перекрёстный докинг: зависимость точности от конформации рецептора. Само-докинг нативного лиганда задаёт эталонный уровень воспроизведения, относительно которого оцениваются альтернативные конформационные состояния рецептора. Перекрёстный докинг афатиниба в четыре альтернативные структуры EGFR продемонстрировал выраженное двухуровневое распределение результатов (таблица 2). Структура 4I22 дала RMSD лиганда 1,02 Å при средней оценке -37,62, то есть превзошла само-докинг в 4G5J по оценке связывания при сопоставимой точности воспроизведения позы. Три оставшиеся структуры дали RMSD 4,29 Å (3W33), 4,37 Å (3POZ) и 4,21 Å (5U8L) - более чем двукратное превышение порога 2,0 Å, что соответствует позам, лишь поверхностно напоминающим кристаллографическую.

Таблица 2. Результаты само- и перекрёстного докинга афатиниба в ансамбль из пяти кристаллографических конформаций EGFR. Структура PDB ID: 4G5J использовалась в качестве эталонной системы для редокинга. Более отрицательные значения энергетических оценок соответствуют более высокой предсказанной аффинности связывания.

PDB ID	Разрешение структуры, Å	Тип докинга	RMSD контактирующих атомов белка, Å	RMSD лиганда, Å	ICM Score	RTCNN Score	Средняя оценка
4G5J	2,80	само	0	**0,95**	−29,00	−30,72	−29,86
4I22	1,71	перекрёстный	2,39	**1,02**	−31,14	**−44,11**	**−37,62**
3W33	1,70	перекрёстный	2,74	4,29	−9,12	**−38,03**	−23,57
3POZ	1,50	перекрёстный	2,56	4,37	−14,21	−31,28	−22,75
5U8L	1,60	перекрёстный	2,83	4,21	−8,72	−23,24	−15,98

Ключевые остатки сайта связывания (Lys745, Met793, Cys797) сохраняют сходную пространственную ориентацию, и докинг в структуру 4I22 воспроизводит нативную геометрию лиганда (рисунок 2). Это позволяет рассматривать 4I22 как конформационно адекватную модель афатиниб-связывающего состояния. Высокая точность модели 4I22 объясняется двумя причинами. Во-первых, при рентгеноструктурном разрешении 1,71 Å (против 2,80 Å у 4G5J) снижается позиционная неопределенность атомов и возрастает селективность оценки энергии связывания. Во-вторых, играет роль мутационный контекст: если 4G5J отражает EGFR дикого типа, где редокинг облегчён конформационной преорганизацией кармана под афатиниб [Solca et al., 2012], то 4I22 представляет собой лекарственно-устойчивую мутантную форму (L858R/T790M/V948R), кокристаллизованный с гефитинибом [Gajiwala et al., 2013]. Именно против таких мутантных форм фармакологическое преимущество афатиниба над обратимыми ингибиторами первого поколения выражено наиболее ярко [Sequist et al. 2013], что и объясняет более высокую комплементарность его предсказанной позы в 4I22.

Снижение точности докинга для структур 3W33, 3POZ и 5U8L имеет четкое структурно-биологическое обоснование. В структуре 3W33 пространственное смещение остатка Met766 относительно 4G5J вынуждает 3-хлор-4-фторанилиновую

группу афатиниба принимать энергетически невыгодную конформацию. Для всех трёх неудачных моделей общей причиной служит утрата водородной связи с Met793, а также контакта с Gln791.

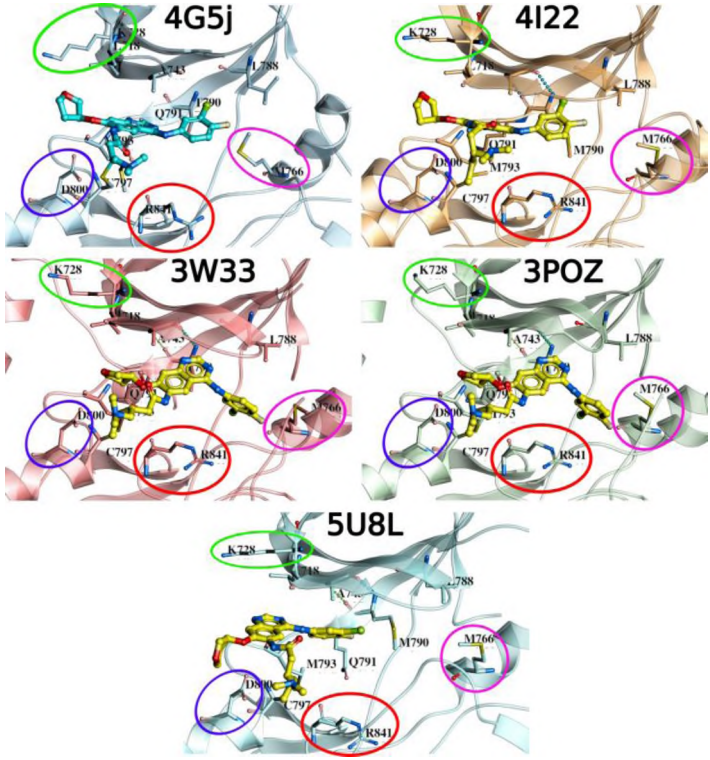
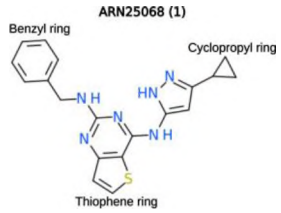


Рисунок 2. Сравнение кристаллографической конформации афатиниба (PDB ID: 4G5J) и его предсказанных поз, полученных в результате перекрестного докинга в структуры EGFR (4I22, 3W33, 3POZ, 5U8L). Окружностями отмечены ключевые аминокислотные остатки сайта связывания, демонстрирующие конформационную изменчивость между исследуемыми кристаллографическими состояниями.

Согласно предложенной схеме отбора рецепторных структур, предполагается использование 4G5J и 4I22 в качестве взаимодополняющего ансамбля; три остальные структуры исключены как несовместимые с целевой фармакофорной моделью, несмотря на приемлемое качество их разрешения. Схема представляет собой валидированный и переносимый протокол выбора рецепторных моделей для ковалентного виртуального скрининга.

Исследование дизайна мультикиназных ингибиторов для ингибирования тау-белка



Серия I: Варьирование заместителей аминопиразольного ядра. Если выбор одной конформации рецептора уже определяет исход, то переход к трём мишеням требует не выбора, а совмещения, и вопрос смещается от отбора структуры к конструкции лиганда. Исследование начиналось с родительского соединения **ARN25068** (**1**), которое проявило высокую активность в отношении GSK-3β (IC50 = 4,8 ± 0,3 нМ) и FYN-α (IC50 = 4,1 ± 0,7 нМ), а также 53,3 ± 2,6% ингибирования DYRK1A при 5 мкМ [Demuro et al., 2022]. По результатам докинга аминопиразольный фрагмент соединения **1** образует водородные связи с остатками шарнирной области всех трёх киназ: Glu239 и Leu241 у DYRK1A, Asp133 и Val135 у GSK-3β, Glu83 и Met85 у FYN-α. Циклопропильный заместитель при этом формирует гидрофобные контакты с Ile165, Gly166, Phe170 и остатком-gatekeeper Phe238 в АТФ-связывающем кармане DYRK1A.

Удаление циклопропильной группы (соединение **2**) привело к падению активности по всем мишеням (IC50 для GSK-3β и FYN-α возросли до 334,0 ± 99,3 нМ и 249,0 ± 46,0 нМ; ингибирование DYRK1A упало до 12,4 ± 1,8%) [Demuro et al., 2026]. Докинг подтвердил ухудшение оценок связывания: без циклопропила лиганд теряет взаимодействия с Ile165, Phe238, Gly166 и Phe170 DYRK1A.

Введение метильного, изопропильного и циклобутильного заместителей (соединения **3–5**) частично восстанавливало гидрофобный контакт. Циклобутильное производное **5** стало наиболее активным ингибитором DYRK1A в серии (IC50 = 1,7 ± 0,1 мкМ; 64,3 ± 0,7% ингибирования при 5 мкМ), сохранив высокий профиль против GSK-3β (IC50 = 10,8 ± 0,3 нМ) и FYN-α (IC50 = 3,8 ± 0,2 нМ) (рисунок 3). Наложение поз **1** и **5** показывает, что более объемный циклобутильный фрагмент формирует с Phe238 более обширный гидрофобный контакт, обусловливая прирост аффинности к DYRK1A.

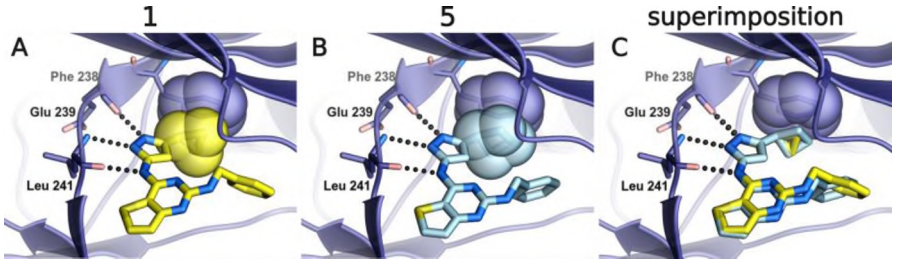


Рисунок 3. Результаты молекулярного докинга соединений **1** и **5** в АТФ-связывающий сайт DYRK1A. (A) Поза родительского соединения **1**; (B) Поза циклобутильного аналога **5**; (C) Наложение конформаций соединений **1** (жёлтый) и **5** (голубой).

Ароматические и гетероароматические модификации показали иную тенденцию: фенильное (**6**) и 3-пиридильное (**7**) производные снизили активность против FYN-α (IC50 = 220,0 ± 67,6 нМ и 78,1 ± 19,3 нМ, соответственно) [Demuro et al., 2026]. Докинг подтвердил энергетическую невыгодность данных соединений, вызванную утратой гидрофобных взаимодействий с Val25 и Ala147 в кармане FYN-α.

Результаты анализа серии I показали, что компактные алифатические и циклоалифатические фрагменты существенно превосходят арильные заместители и незамещенный аналог по сбалансированности многоцелевого профиля.

Серия II: Оптимизация бензильного кольца и *мета*-карбамоильного мотива. Варьирование заместителей аминопиразольного ядра обеспечило наномолярную активность в отношении GSK-3β и FYN-α, однако ингибирование DYRK1A оставалось микромолярным (лучший результат в серии 1,7 мкМ для соединения **5**). Дальнейший прирост активности потребовал модификации С2-бензильного фрагмента тиено[3,2-d]пиримидинового остова.

Молекулярный докинг показал, что *пара*-фторбензильное производное **8** сохраняет водородные связи с шарнирной областью и погружает бензильную группу в липофильный карман DYRK1A и FYN-α, однако в GSK-3β *пара*-замещение вызывает отклонение ориентации лиганда (рисунок 4). Это согласуется с биохимическими данными: активность **8** против GSK-3β упала в 11 раз (IC50 = 53,7 ± 6,8 нМ) при сохранении связывания с FYN-α (IC50 = 2,8 ± 0,6 нМ) и DYRK1A (IC50 = 2,1 ± 0,3 мкМ) [Demuro et al., 2026]. Для *пара*-хлорбензильного аналога **9** докинг предсказал стерические столкновения во всех трех карманах, что подтвердилось 23-кратным падением активности против GSK-3β (IC50 = 108,8 ± 11,1 нМ) и снижением аффинности к FYN-α и DYRK1A [Demuro et al., 2026].

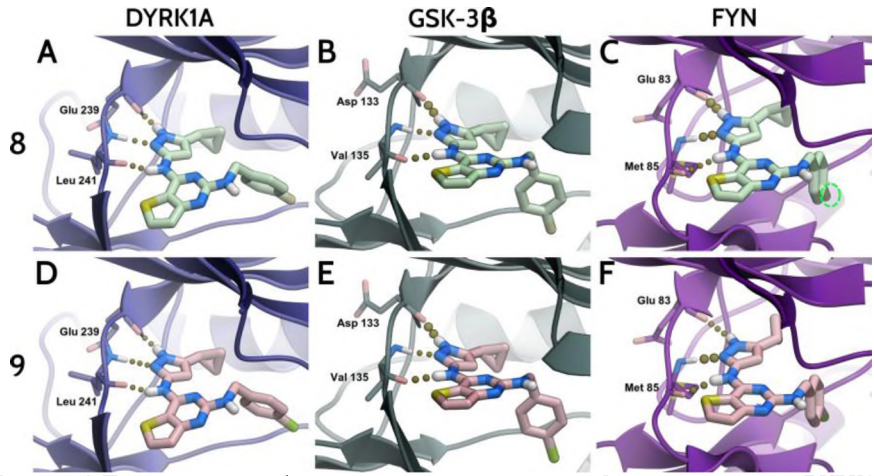


Рисунок 4. Предсказанные конформации связывания соединения **8** в активных центрах DYRK1A (A), GSK-3β (B) и FYN-α (C), а также соединения **9** в активных центрах DYRK1A (D), GSK-3β (E) и FYN-α (F). Зеленой пунктирной окружностью выделена область наиболее благоприятного связывания с карманом.

Перенос карбамоильной группы в *мета*-положении (*мета*-изомер **16**) привел к радикальному повышению активности (IC50 для GSK-3β и FYN-α: 1,2 ± 0,2 нМ и 1,7 ± 0,2 нМ; DYRK1A: 1,0 ± 0,1 мкМ) [Demuro et al., 2026]. В кристаллографической структуре GSK-3β (PDB ID: 9FR6) конформация **16** идентична родительскому соединению **1**, а в DYRK1A (PDB ID: 9FUF) сохраняются три водородные связи аминопиразола и формируется контакт *мета*-карбамоила с Asn292 [Demuro et al., 2026]. Докинг соединения **16** в FYN-α предсказал аналогичный паттерн водородных связей с Glu83, Met85 (рисунок 5). Совпадение геометрии связывания в FYN-α с

кристаллографическими данными для GSK-3β и DYRK1A дает надежное обоснование тройного ингибирующего профиля **16**.

Сравнительный анализ предсказанных моделей связывания для соединений серии II показал, что *мета*-заместители бензильного кольца комплементарны связывающему карману DYRK1A существенно лучше, чем *пара*-заместители.

Модификации центрального гетероциклического ядра (серия III) были оценены как конформационно нейтральные: для дигидротиофенового аналога **19** и фуропиримидинового производного **20** (PDB ID: 9FT4) полученные мотивы связывания во всех трёх активных центрах практически не отличались от таковых для соединения **1**. Соединение **20** сохранило высокую ингибиторную активность в отношении GSK-3β (IC50 = 13,7 ± 1,8 нМ) и FYN-α (IC50 = 15,5 ± 4,0 нМ) [Demuro et al., 2026]. На основании этих результатов ароматическое ядро было сохранено, а фуропиримидиновый каркас выбран для дальнейшей оптимизации в рамках гибридной серии.

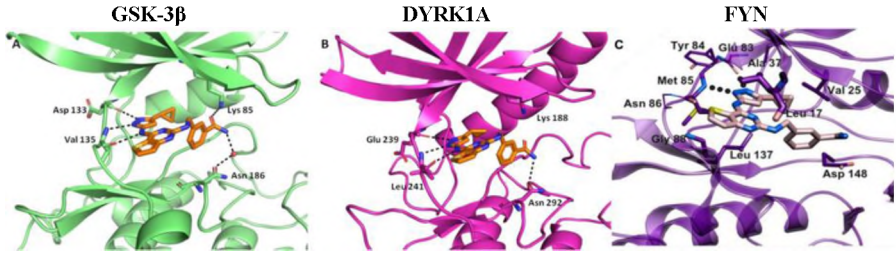


Рисунок 5. Экспериментальные структуры комплексов соединения **16** с GSK-3β (PDB ID: 9FR6, панель A) и DYRK1A (PDB ID: 9FUF, панель B), полученные методом рентгеноструктурного анализа [Demuro et al., 2026]. (C) Предсказанная конформация связывания соединения **16** в связывающем кармане киназы FYN-α. Водородные связи показаны пунктирными линиями.

Гибридная серия IV: соединения 28 и 31. Поскольку *мета*-карбамоильная группа сформировала устойчивый и воспроизводимый мотив связывания, следующим шагом стала её комбинация с ключевыми структурными фрагментами, выявленными в сериях I и III, в рамках единой молекулярной платформы. Соединение **28** (**ARN25699**), объединяющее циклобутильный аминопиразольный фрагмент, *мета*-карбамоилбензиламинный заместительный блок и фуропиримидиновое ядро, продемонстрировало субмикромолярное ингибирование DYRK1A (IC50 = 242,3 ± 50,2 нМ) при сохранении высокой активности в отношении GSK-3β (IC50 = 5,5 ± 1,6 нМ) и FYN-α (IC50 = 2,2 ± 0,4 нМ); для сравнения, близкое производное **27** ингибировало DYRK1A с IC50 = 461,5 ± 62,5 нМ [Demuro et al., 2026].

В связывающем кармане DYRK1A *мета*-карбамоильная группа формирует две дополнительные водородные связи с боковыми остатками Asn292 и Asp307 (рисунок 6). В структуре комплекса с GSK-3β карбамоильная группа соединения **28** координируется Asp200. Для FYN-α результаты молекулярного докинга предсказывают формирование водородных связей аминопиразольного фрагмента с шарнирной областью (Glu83 и Met85), что полностью аналогично экспериментальным данным, полученным для GSK-3β и DYRK1A.

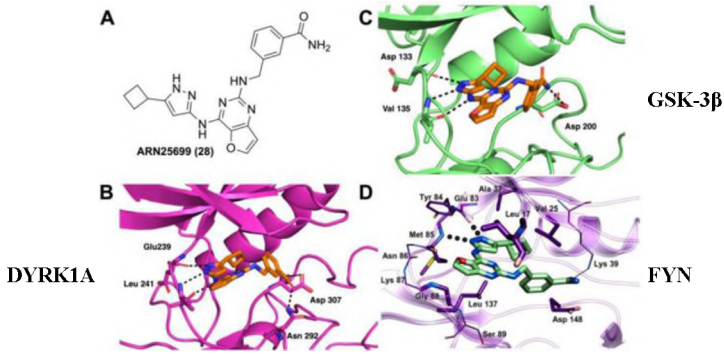


Рисунок 6. Структурная характеристика и профиль селективности соединения **28**. (A) Двумерная (2D) химическая структура **28**. Кристаллическая структура комплекса **28** с (B) DYRK1A (PDB ID: 9FT2) и с (C) GSK-3β (PDB ID: 9FR9). (D) Предсказанная конформация связывания **28** в АТФ-связывающем кармане киназы FYN-α. Пунктирными линиями показаны водородные связи.

Соединение **31** (**ARN26646**) получено в рамках альтернативного подхода, основанного на инверсии схемы замещения, при которой фенильное кольцо, несущее карбамоильную группу, присоединено непосредственно к пиразольному каркасу. Валидация гипотезы проводилась путем сравнения предсказанных конформаций связывания соединений **1, 29, 30** и **31** в активном центре DYRK1A (рисунок 7).

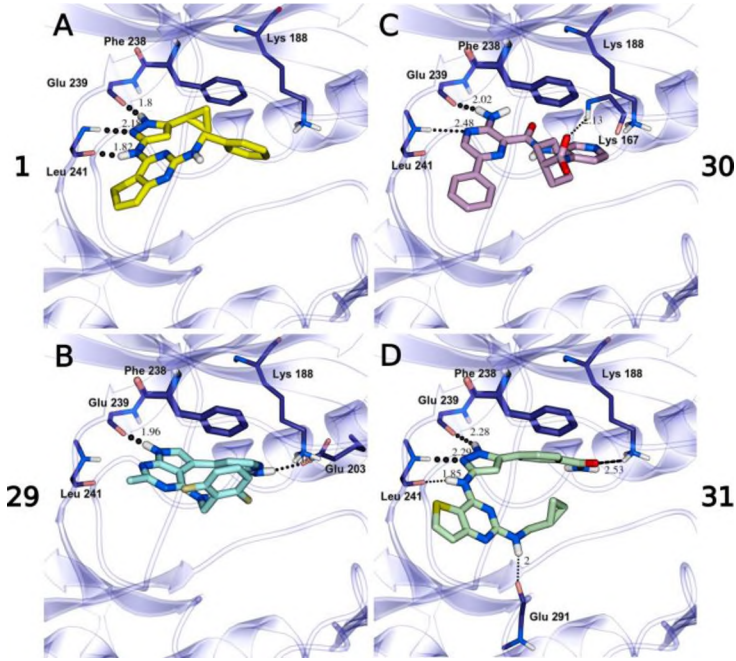


Рисунок 7. Предсказанные конформации связывания соединений **1** (панель A), **29** (панель B), **30** (панель C) и **31** (**ARN26646**, панель D) в АТФ-связывающем кармане киназы DYRK1A.

Экспериментальное тестирование полностью подтвердило теоретические предсказания: соединение 31 продемонстрировало сбалансированный наномолярный профиль ингибирования в отношении всех трёх мишеней: GSK-3β (IC50 = 125,5±5,0 нМ), FYN-α (IC50 = 83,0±11,8 нМ) и DYRK1A (IC50 = 198,6±10,7 нМ) [Demuro et al., 2026], что соответствует наивысшей ингибиторной активности в отношении DYRK1A в данной серии. Дизайн опирался на структурный анализ ранее описанных селективных ингибиторов DYRK1A 29 [Lee Walmsley et al., 2021] и 30 [Liu et al., 2020].

Оценка проницаемости гематоэнцефалического барьера. Каждая последовательная модификация, направленная на повышение аффинности, сопровождалась увеличением полярности молекулярного скаффолда, что требует отдельной количественной оценки фармакокинетических рисков. Способность проникать через гематоэнцефалический барьер является обязательным требованием для лекарственных кандидатов, предназначенных для снижения гиперфосфорилирования тау-белка в центральной нервной системе.

Предсказанные значения индекса проницаемости BBB для соединений **1**, **28** и **31** составили 3,36, 1,44 и 1,36, соответственно. Все три показателя находятся ниже условного порога приемлемой BBB-проницаемости (≥ 4), однако исходное соединение **1** находится существенно ближе к целевой границе, чем его оптимизированные производные. Ключевой структурной причиной выявленного снижения проницаемости является значительный рост PSA: 188,67 Å² для соединения **28** и 182,58 Å² для соединения **31** по сравнению с 98,83 Å² для соединения **1**. Для достижения целевого значения BBB ≈ 4 требуется сокращение PSA примерно со 185 Å² до диапазона 90-100 Å² (при том что даже исходная молекула **1** при PSA = 98,83 Å² достигает лишь значения 3,36). Таким образом, оптимизация аффинности в отношении трёх мишеней и обеспечение пассивной BBB-проницаемости представляют собой четкий структурно-фармакологический компромисс (trade-off), а не непреодолимое ограничение.

Сопутствующие инфекции и риск иммуно-опосредованных нежелательных побочных эффектов при иммунотерапии

Частота irAE в когортах монотерапии ICI. Пределы эффективной структурной оптимизации определяются не только физико-химическими свойствами самой молекулы, но и системным ответом целостного организма. Анализ семи когорт, сформированных на основе базы данных FAERS и включавших пациентов, получавших монотерапию ICI, выявил существенные различия по числу документов.

На уровне фармакологических классов совокупная частота нежелательных побочных эффектов при иммунотерапии, irAEs составила 20,6% для ингибиторов PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб) и практически эквивалентные 20,4% для ингибиторов PD-L1 (авелумаб, дурвалумаб, атезолизумаб); для ингибитора CTLA-4 ипилимумаба данный показатель оказался наиболее высоким (24,5%). Доля пациентов с сопутствующими инфекционными осложнениями оставалась стабильной в крупных когортах, от 3,00% для дурвалумаба до 3,97% для атезолизумаба, тогда как в малообъёмной когорте цемиплимаба она составила 6,76%.

Сравнительный анализ частоты irAEs между инфицированными и неинфицированными подкогортами по всем семи исследованным препаратам выявил устойчивую закономерность: наличие сопутствующей инфекции ассоциировалось со значительным возрастанием частоты irAEs (рисунок 8).

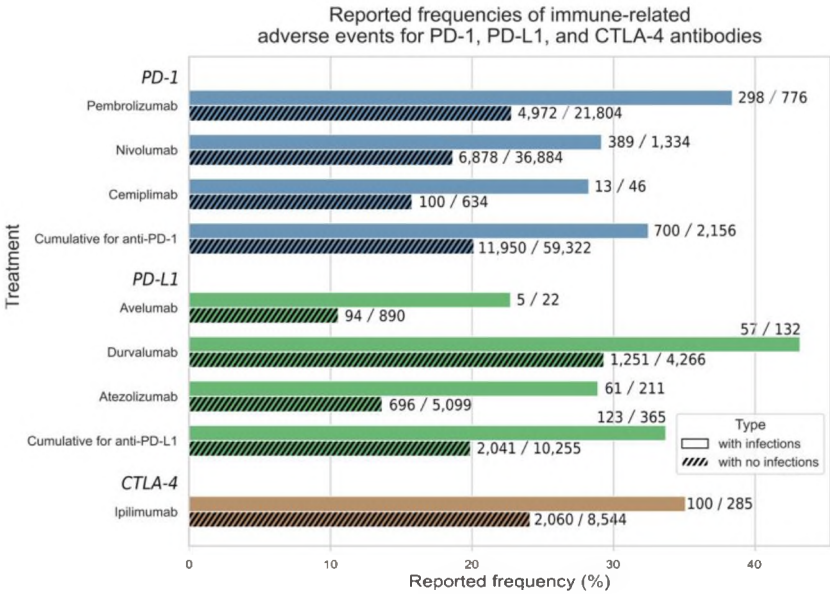


Рисунок 8. Частота документов об irAEs у пациентов, получавших иммунотерапию, при наличии и отсутствии сопутствующей инфекции. Для каждой подкогорты указано число документов, содержащих irAEs, а также общее число сообщений в этой подкогорте. Доля пациентов с сопутствующей инфекцией составила: пембролизумаб -3,44%, ниволумаб-3,49%, цемиплимаб-6,76%, авелумаб-2,41%, дурвалумаб-3,00%, атезолизумаб-3,97%, ипилимумаб - 3,23%.

В частности, для пембролизумаба подкогорта пациентов с инфекциями включала 776 документов, из которых в 298 случаях (38,4%) были зафиксированы irAEs, тогда как в неинфицированной подкогорте irAEs отмечались лишь в 4972 из 21804 документов (22,8%). В целом по выборке частота irAEs в неинфицированных подкогортах варьировала в диапазоне от 11% до 29%, в то время как при наличии сопутствующей инфекции этот показатель возрастал до 22-43%.

Оценка отношения шансов сообщений (ROR). Разность частот указывает на наличие эффекта, однако не позволяет в полной мере оценить его величину и статистическую значимость. ROR составило 2,11 (95% CI: 1,82–2,45) для пембролизумаба, 1,80 (95% CI: 1,59–2,03) для ниволумаба, 2,10 (95% CI: 1,07–4,14) для цемиплимаба, 2,49 (95% CI: 0,90–6,91) для авелумаба, 1,83 (95% CI: 1,29–2,60) для дурвалумаба, 2,57 (95% CI: 1,89–3,50) для атезолизумаба и 1,70 (95% CI: 1,33–2,18) для ипилимумаба (рисунок 9).

На уровне фармакологических классов совокупные оценки ROR составили 1,91 (95% CI: 1,74–2,09) для ингибиторов PD-1, 2,05 (95% CI: 1,64–2,55) для ингибиторов PD-L1 и 1,70 (95% CI: 1,33–2,18) для CTLA-4-ингибитора (ипилимумаб). Единственным препаратом, для которого нижняя граница 95% доверительного интервала оказалась ниже 1,0, был авелумаб, что обусловлено малым объёмом подкогорты пациентов с сопутствующими инфекциями (n = 22).

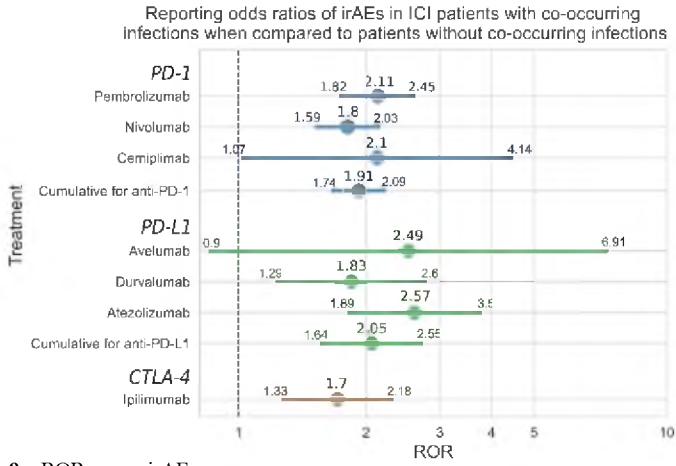


Рисунок 9. ROR для irAE у пациентов, получавших иммунотерапию, при наличии сопутствующей инфекции и без неё. Представленные интервалы соответствуют 95% доверительным интервалам. По оси X - значения отношения шансов (кружки) и их доверительные интервалы (горизонтальные отрезки) в логарифмическом масштабе.

Оценка относительного риска (RR). Расчет показателя RR (рисунок 10) подтвердил выявленную закономерность, имеющих непосредственную клиническую интерпретацию: 1,68 (95% CI: 1,47–1,93) для пембролизумаба, 1,56 (95% CI: 1,39–1,76) для ниволумаба, 1,79 (95% CI: 0,93–3,43) для цемиплимаба, 2,15 (95% CI: 0,80–5,81) для авелумаба, 1,47 (95% CI: 1,07–2,02) для дурвалумаба, 2,12 (95% CI: 1,58–2,85) для атезолизумаба и 1,46 (95% CI: 1,15–1,84) для ипилимумаба.

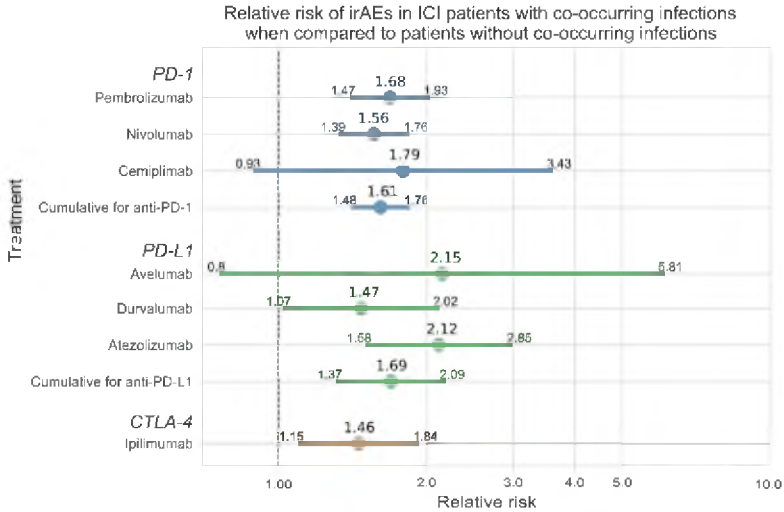


Рисунок 10. RR развития irAE у пациентов, получавших иммунотерапию, при наличии сопутствующей инфекции и без неё. Представленные интервалы соответствуют 95 % доверительным интервалам. По оси X - значения относительного риска (кружки) и их доверительные интервалы (горизонтальные отрезки) в логарифмическом масштабе.

Повышение риска не достигло порога статистической значимости лишь для цемиплимаба и авелумаба, что связано с малым объёмом подкогорт пациентов с сопутствующими инфекционными осложнениями, а не с изменением направленности выявленного эффекта.

Воспроизводимость и согласованность выявленного эффекта по классам ингибиторов. Однонаправленность выявленных изменений для всех семи исследованных препаратов и трех молекулярных мишеней свидетельствует о системном характере наблюдаемого феномена и исключает артефакт единичной когорты. Точечные оценки ROR превышали 1,0 в 6 из 7 случаев, а в отношении RR статистическая значимость была достигнута для пяти из семи препаратов. В группе статистически значимых результатов значения ROR варьировали от 1,70 (ипилимумаб) до 2,57 (атезолизумаб), а значения относительного риска (RR) от 1,46 (ипилимумаб) до 2,15 (авелумаб). Воспроизводимость данного эффекта для препаратов, направленных на три различные мишени, включая механистически обособленный ингибитор CTLA-4 ипилимумаб, указывает на то, что в основе выявленного взаимодействия лежат системные процессы на уровне организма, а не класс-специфические свойства отдельных молекул. Полученные данные существенно расширяют существующие представления об эпидемиологическом профиле токсичности иммунотерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа объединяет три направления структурной фармацевтической биоинформатики, которые, решая различные задачи, опираются на общий методологический принцип: воздействия лекарств или их кандидатов на больного не сводится к изолированному объекту ни на одном из уровней организации, и при формулировании молекулярных задач эти взаимосвязи следует принимать во внимание. Надежность вычислительно-структурного подхода на атомном и молекулярном уровнях при разработке лекарств определялась в данной работе тремя аспектами: выбором конформации рецептора и сайта связывания для лекарственного соединения; несколько молекулярных мишеней вовлеченных в патологию могут быть подавлены одной лекарственной молекулой при сохранении селективности и фармакологических свойств; клинические критерии должны выбираться с учетом сопутствующих заболеваний.

Выбор модели рецептора продемонстрирован на примере EGFR, мишени осложненной частым возникновением мутаций резистентности и наличием многочисленных PDB-структур. Для этого был проведен систематический перекрестный докинг афатиниба, необратимо (ковалентно) связывающегося с Cys797, в пять основных конформаций киназного домена EGFR для природной и мутантной формы. Было продемонстрировано, что выбор кристаллографической модели определяет точность предсказания геометрии связывания, причем структура мутантной формы (PDB ID: 4I22) воспроизводит конформацию афатиниба с высокой точностью и более благоприятным значением оценки связывания, чем исходная структура с афатинибом. Из этого следует практический критерий: пригодность кристаллографической модели для виртуального ковалентного скрининга определяется предложенной процедурой до тестирования множественных моделей.

Далее решалась задача подавления одним агентом нескольких киназ, ответственных за избыточное фосфорилирование белка тау, агрегирующего в болезни Альцгеймера. Наше моделирование показало, что аминопиразольный скаффолд способен к

многоцелевому связыванию киназ GSK-3β, DYRK1A и FYN-α, что было подтверждено экспериментально. Ряд соединений достиг сбалансированной наномолярной активности к GSK-3β и FYN-α при заметном улучшении активности к DYRK1A. В то же время работа четко очерчивает границы применения данного подхода при улучшении ADMET-профиля, модификация которого не должна нарушать достигнутый баланс тройной аффинности.

При оценке безопасности фармакотерапии на популяционном уровне была продемонстрирована схожесть опасных побочных эффектов при терапии онкологических больных с сопутствующими инфекционными заболеваниями при иммунотерапии семью антителами.

Таким образом, работа дает три переносимых инструмента: процедуру и критерии отбора рецепторных моделей для ковалентного докинга; структурный прототип сбалансированных многоцелевых лекарственных соединений; стратегию стратификации рисков для онкологических пациентов с сопутствующими инфекциями при иммунотерапии.

ВЫВОДЫ

1. Систематическое перекрестное предсказание связывания лекарства к ансамблю кристаллографических структур киназного домена EGFR показало, на что следует заменить простые одноструктурные протоколы, для учета конформационной динамики сайта связывания и сопутствующих мутаций, возникающих у пациентов в результате лечения похожими препаратами.
2. Вычислительно-структурное трехмерное молекулярное моделирование показало, что филогенетически удалённые друг от друга мишени семейства CMGC (GSK-3β, DYRK1A) и Src-подобных тирозиновых киназ (FYN-α) могут ингибироваться соединениями с единым аминопиразольным скаффолдом, при этом активность ко всем трем киназам сохранялась на наномолярном уровне.
3. Популяционный анализ десятков тысяч документов о побочных эффектах PD-1, PD-L1 или CTLA-4 иммунотерапии выявил статистически значимую связь между развитием иммуно-опосредованных нежелательных явлений у онкологических больных и сопутствующими вирусными, бактериальными и грибковыми инфекциями. Подобного рода анализ помогает сформулировать более безопасный критерии для лекарств нового поколения.
4. Совокупность полученных результатов формирует единый вычислительный подход, в котором выбор конформации мишени, дизайн многоцелевых ингибиторов и учет клинических рисков взаимно дополняют друг друга и повышают эффективность и безопасность разработки новых лекарственных средств.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Demuro, S., Russo, D., Penna, I., **Grabska, S.**, Grabski, H., Dalle Vedove, A., ... & Abagyan, R., Cavalli, A., 2026. A polypharmacology-driven approach to Alzheimer's disease and tauopathies: Rational design, synthesis and characterization of amino-pyrazole-based multikinase (GSK-3β/FYN-α/DYRK1A) inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry, 69(9), 9991-10018, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5c01810
2. **Grabska, S.**, Grabski, H., Makunts, T., & Abagyan, R., 2024. Co-Occurring Infections in Cancer Patients Treated with Checkpoint Inhibitors Significantly Increase the Risk of

Immune-Related Adverse Events. Cancers, 16(16), 2820, doi: 10.3390/cancers16162820
3. **Grabska S.**, 2025. Effect of EGFR conformational plasticity on the accuracy of covalent EGFR inhibitor docking: an improved approach, Вестник РАУ № 2, 2025, 82-92, doi: 10.24412/1829-0450-fm-2025-2-82-92
4. **Grabska, S.**, Grabski, H., & Abagyan, R., 2025. Small-Molecule PD-L1 Modulators as Alternatives to Checkpoint Antibodies: Implications for Infection-Associated Immune Toxicities. Journal of Innovative Solutions for Eco-Environmental Sustainability, pp. 088-088, doi: 10.46991/JISEES.2025.SI1.088

ԳՐԱԲՍԿԱ ՍԻՐԱՆՈՒՅՇ

Դեղամիջոցների ազդեցության կովալենտ կամ բազմաթիրախ կապման նոր մոտեցումների կիրառումը՝ արդյունավետության բարձրացման և կողմնակի ազդեցությունների նվազեցման նպատակով

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Բանալի բառեր՝ EGFR, EGFR-ի՝ քաղցկեղի հետ կապված մուտանտներ, կրծքագեղձի քաղցկեղ, կովալենտային դոկինգ, աֆատինիբ, խաչաձև դոկինգ, GSK-3β, FYN-α, DYRK1A, բազմաթիրախ ուղղորդված լիգանդ, տատուոպաթիա, իմունային անցակետերի ինհիբիտորներ, irAE, FAERS, դեղազգոնություն:

Կառուցվածքով ուղղորդված դեղամիջոցների հայտնաբերման հոսքագծի հուսալիությունը պայմանավորված է երեք առանձին հատկանիշներով՝ ա) դոկինգի համար ընկալիչի վիճակի, կոնֆորմացիայի և կապման գրպանիկի տեղակայման ընտրությամբ, բ) բազմաթիրախ դեղաբանական պրոֆիլի ընտրությամբ, երբ, օրինակ, ազդեցությունը միաժամանակ ուղղվում է մի քանի թիրախի՝ խուսափելով մյուսներից, և գ) կլինիկական խստապահանջության ընտրությամբ, երբ դեղամիջոցի անվտանգությունը կարող է ձևափոխվել զուգակցվող հիվանդությունների ազդեցությամբ: Հաշվողական աշխատանքային հոսքի միջոցով ներկայացվում է փոխկախված շրջանակ, որը համակարգված կերպով մեղմում է կառուցվածքային, դեղաբանական և կլինիկական խոչընդոտները: Ատենախոսությունը սկսվում է քաղցկեղի կարևորագույն թիրախի՝ բջիջների աճն ու զոյատևումը կարգավորող էպիդերմալ աճի գործոնի ընկալիչի (EGFR) քննարկումից: Այս թիրախավորումը դժվար է երեք հիմնական պատճառով՝ խուսափման մուտացիաներ, ընտրողականության խստագույն պահանջներ և PDB կառուցվածքների բազմազանություն, որոնք նոր ինհիբիտորների հայտնաբերման համար ունեն խիստ տարբեր օգտակարություն:

Հաշվողական եղանակով կատարվել է ընկալիչի մոդելային կառուցվածքի ընտրություն: Դա իրականացվել է Cys797-ին կովալենտորեն կապված անդարձելի ինհիբիտոր՝ afatinib-ի համակարգված խաչաձև դոկինգի (cross-docking) միջոցով՝ EGFR-ի կինազային տիրույթի հինգ բյուրեղագրական կոնֆորմացիաների նկատմամբ, որից հետո ընտրվել է լավագույն մոդելը:

4G5J համաբյուրեղային կառուցվածքի նկատմամբ կատարված ինքնադոկինգը (self-docking) վերարտադրել է afatinib-ի բյուրեղագրական դիրքը՝ 0.95 Å RMSD-ով: Ավելի բարձր լուծաչափ ունեցող 4I22 (1.71 Å) գրառման նկատմամբ խաչաձև դոկինգը, որն առավել բարդ խնդիր էր, հաջողությամբ կանխագուշակել է լիգանդի կապման դիրքն ու երկրաչափությունը (1.02 Å RMSD): Այն ունեցել է կապման բարելավված՝ −37.62 գնահատական, ինչը զարմանալիորեն գերազանցել է 4G5J-ի ինքնադոկինգի

ցուցանիշը (−29.86): Միևչդեռ մյուս փորձարարական կառուցվածքներից (3W33, 3POZ և 5U8L) ստացված մոդելները ձախողվել են՝ համապատասխանաբար ցուցաբերելով 4.29, 4.37 և 4.21 Å RMSD:

Փոխազդեցությունների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ ձախողման պատճառ են դարձել Met766-ի տեղաշարժը, ինչպես նաև Met793-ի հետ ծխնիի շրջանի (hinge) ջրածնային կապի ու Gln791-ի հետ շփումի կորուստը: Ամենակարևորն այն է, որ սա ապացուցում է՝ կովալենտային դոկինգի ճշգրտությունը պայմանավորված է ընկալիչի մոդելի ընտրությամբ, այլ ոչ թե պրոտոկոլի պարամետրացմամբ: Նկարագրված ընթացակարգը կարող է կիրառվել կովալենտային վիրտուալ սքրինինգի արշավների համար ընկալիչների տարբեր մոդելներ ընտրելիս:

Հաջորդ մարտահրավերը մեկ դեղամիջոցով ճնշելն էր tau-ի ախտաբանական հիպերֆոսֆորիլացման համար պատասխանատու մի քանի կինազներին: Մշակվել և կիրառվել է կառուցվածքով ուղղորդված գործընթաց՝ ֆիլոգենետիկորեն տարամիտված թիրախների նկատմամբ ակտիվ միասնական կմախք (scaffold) ստանալու համար: Ավելին, իրականացվել է ամինոպիրազոլային շարքի բազմակինազային կառուցվածքներով ուղղորդված օպտիմալացում երկու ընտանիքի պատկանող երեք կինազների համար. դրանք են CMGC կինազները (GSK-3β, DYRK1A) և Src ընտանիքի թիրոզինկինազները (FYN-α): Կապման եղանակի ընդլայնված կանխագուշակումները ցույց են տվել, որ thieno[3,2-d]pyrimidine միջուկին meta-կարբամոիլ խմբի ներմուծումն ստեղծում է պահպանված եռամաս (tripartite) ջրածնային կապերի ցանց՝ երեք թիրախների համապատասխան ծխնիի շրջանների հետ (GSK-3β-ում՝ Asp133/Val135, FYN-α-ում՝ Glu83/Met85, DYRK1A-ում՝ Leu241/Glu239): Սա արդյունավետորեն ամրագրում է ցանկալի բազմակինազային ինհիբիտորային պրոֆիլը, ինչը և հաստատվել է փորձարարական ճանապարհով: Այս շարքի մի քանի միացություններ ցուցաբերել են լավ հավասարակշռված, ցածր նանոմոլային ինհիբիտորային ակտիվություն GSK-3β-ի և FYN-α-ի նկատմամբ, ինչպես նաև ակտիվության նկատելի աճ DYRK1A-ի նկատմամբ: Հենց սա էլ հանդիսացել է հավասարակշռված եռակի ինհիբիցիայի կառուցվածքային հիմքը:

Ատենախոսությունում վերլուծվում են նաև մեկ դեղամիջոցով մի քանի կինազի թիրախավորման՝ ADMET հատկություններին առնչվող ներհատուկ մարտահրավերները: Դեղամիջոցների հատկություններն ու անբարենպաստ ազդեցությունները ևս զգալիորեն փոփոխվում են, երբ դրանք կիրառվում են հիվանդների լայն շրջանակի նկատմամբ: Այսպիսի մակարդակով դրսևորվող ազդեցությունները հաճախ դուրս են մոլեկուլային հասկացողության սահմաններից, ուստի դրանք բացահայտելու համար իրականացվել է պոպուլյացիոն մասշտաբով դեղազգոնության (pharmacovigilance) տվյալների վերլուծություն:

Հետազոտվել է FAERS բազայից ստացված՝ իմունային անցակետերի ինհիբիտորներով մոնոթերապիայի 80,927 հաղորդում: Արդյունքում վարակված ենթակոհորտաներում արձանագրվել է irAE-ների 22–43% հաճախականություն՝ ոչ վարակվածների 11–29%-ի դիմաց: Դասի մակարդակով հաղորդումների շանսերի հարաբերակցությունները (reporting odds ratio, ROR) կազմել են 1.91 (95% CI 1.74–2.09)՝ PD-1 ինհիբիտորների, 2.05 (1.64–2.55)՝ PD-L1 ինհիբիտորների և 1.70 (1.33–2.18)՝ CTLA-4 ինհիբիտոր իպիլիմումաբի (ipilimumab) համար, իսկ համապատասխան հարաբերական ռիսկերը (relative risk, RR) հաստատել են նույն կապի առկայությունը:

Դիսարկված կապը վիճակագրորեն նշանակալի է եղել յոթ դեղամիջոցից հինգի համար. մյուս երկու դեղամիջոցները չափորոշիչներից առնվազն մեկով չեն հասել նշանակալիության շեմին՝ հաղորդումների անբավարար քանակի պատճառով: Իմունային անբարենպաստ երևույթների վերարտադրելիությունը երեք տարբեր թիրախային դասի պարագայում ընդգծում է այս վերլուծությունների կիրառելիությունը

գործողության նույնանման մեխանիզմ ունեցող հաջորդ սերնդի դեղամիջոցների նախագծման համար:

Ամփոփելով՝ այս երեք ուսումնասիրությունները առաջարկում են նոր հաշվողական մեթոդներ՝ ավելի արդյունավետ դեղամիջոցների նախագծման խնդիրները լուծելու համար: Այս աշխատանքն ստեղծում է երեք կիրառելի գործիք. առաջինը՝ կովալենտային դոկինգի համար ընկալիչի ընտրության ընթացակարգն ու չափանիշներն են, երկրորդը՝ բազմաթիրախային և հավասարակշռված ակտիվությամբ առաջատար միացությունների կառուցվածքային նախագիծը, և երրորդը՝ անցակետերի ինհիբիտորներով բուժվող ուղեկցող վարակներով քաղցկեղով հիվանդների ռիսկերի գնահատման ռազմավարությունները:

SIRANUYSH GRABSKA

Exploiting novel covalent or multi-target binding modes of drug action to increase efficacy and reduce side effects

ABSTRACT

Keywords: EGFR, EGFR cancer-related mutants, breast cancer, covalent docking, afatinib, cross-docking, GSK-3β, FYN-α, DYRK1A, multi-target-directed ligand, tauopathy, immune checkpoint inhibitors, irAE, FAERS, pharmacovigilance.

The reliability of a structure-guided drug discovery pipeline is dependent on three distinct aspects: the choice of receptor state, conformation, and pocket location for docking; the choice of multi-target pharmacological profile, for example, targeting several targets at once while avoiding others; and the choice of clinical rigor, where drug safety can be modulated co-occurring diseases. An interdependent framework is presented to systematically alleviate structural, pharmacological, and clinical bottlenecks with a computational workflow. This dissertation starts with the critical cancer target, Epidermal growth factor receptor (EGFR) regulating cell growth and survival which is difficult to target because of escape mutations, requirements for selectivity, and multiple PDB structures with dramatically different utility for new inhibitor discovery.

Receptor model structure choice was performed computationally by systematic cross-docking of an irreversible inhibitor, afatinib, covalently bound to Cys797, to five crystallographic conformations of the EGFR kinase domain and selecting the best model. Self-docking into the cocrystal structure 4G5J reproduced the crystallographic pose of afatinib at 0.95 Å RMSD. A more difficult task of cross-docking to a higher-resolution entry 4I22 (1.71 Å) successfully predicted the ligand binding pose and geometry at 1.02 Å RMSD with an improved binding score of −37.62, surprisingly outperforming the 4G5J self-docking score (−29.86), whereas the models from other experimental structures, 3W33, 3POZ and 5U8L, failed at 4.29, 4.37 and 4.21 Å RMSDs, respectively. Interaction analysis attributed the failures to displacement of Met766 and to loss of the Met793 hinge hydrogen bond together with the Gln791 contact. Crucially, this demonstrates that receptor model selection, rather than protocol parameterization, governs covalent docking fidelity. The outline procedure can be applied to model selection for a range of receptor models for covalent virtual screening campaigns.

The next challenge was to address a need to suppress several kinases responsible for pathological tau hyperphosphorylation with a single therapeutic agent. A structure-guided process was developed and applied to derive a single scaffold active against phylogenetically

divergent targets. Furthermore, multi-kinase-structure guided optimization of an amino-pyrazole series was performed for three kinases of two families, the CMGC kinases (GSK-3β, DYRK1A), and Src-family tyrosine kinases (FYN-α). Advanced binding mode predictions established that insertion of a meta-carbamoyl modification onto a thieno[3,2-d]pyrimidine core mediated a conserved tripartite hydrogen-bonding network with the respective hinge regions of all three targets, Asp133/Val135 in GSK-3β, Glu83/Met85 in FYN-α, and Leu241/Glu239 in DYRK1A, effectively anchoring the desired multikinase inhibitory profile. This prediction was confirmed experimentally. Across the series, several compounds achieved well-balanced, low nanomolar inhibitory potency against GSK-3β and FYN-α, with a notable increase in potency toward DYRK1A, which proved to be the structural basis of balanced triple inhibition. The thesis also analyzes the inherent challenges of targeting multiple kinases with a single agent in terms of ADMET properties.

The drug properties and adverse effects also vary significantly once the drug is applied to a wide range of patients. To capture these patient-level effects, frequently beyond the molecular level of understanding, population-scale pharmacovigilance data analysis was considered. We analyzed 80,927 immune checkpoint inhibitor monotherapy reports extracted from FAERS, which revealed irAE frequencies of 22–43% in infected sub-cohorts against 11–29% in non-infected ones. Class-level reporting odds ratios (ROR) were 1.91 (95% CI 1.74–2.09) for PD-1 inhibitors, 2.05 (1.64–2.55) for PD-L1 inhibitors, and 1.70 (1.33–2.18) for the CTLA-4 inhibitor ipilimumab, with corresponding relative risks (RR) confirming the same association. The observed correlation was statistically significant for five out of seven drugs; the two therapeutics not reaching the significance level by at least one of the metrics, due to insufficient number of reports. Reproducibility of immune adverse events across three distinct target classes highlights an applicability of these analyses for design of next generation of drugs with similar mechanisms of action.

In summary, these three stories propose new computational procedures to address challenges of designing better therapeutic agents. This work delivers three transferable instruments: a receptor-selection procedure and criteria for covalent docking, a structural blueprint for balanced potent multitarget drug leads, and risk-stratification strategies for cancer patients with co-occurring infections while receiving checkpoint inhibitor treatment.

