

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ПРИКЛАДНОЙ МАТЕМАТИКИ И
ИНФОРМАТИКИ**

Кафедра биомедицинской информатики

ГОНЧАР

Анна Викторовна

**Поиск потенциальных ингибиторов Vcr-Abl
тирозинкиназы методами виртуального скрининга и
молекулярного моделирования для разработки новых
лекарственных препаратов**

Дипломная работа

Научный руководитель:
старший преподаватель
Кафедры БМИ
Николаев Григорий Игоревич

Допущена к защите

“__” _____ 2021 г.

Зав. кафедрой биомедицинской информатики

кандидат физико-математических наук, доцент Ю.Л. Орлович

Минск, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	8
1.1 Vcr-Abl тирозинкиназа. Известные ингибиторы.....	8
1.2 Виртуальный скрининг.....	9
1.3 Фармакофорный поиск.....	11
1.4 Молекулярный докинг.....	13
1.4.1 Алгоритмы поиска.....	13
1.4.2 Оценочные функции.....	15
ГЛАВА 2 МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА.....	17
2.1 Основы молекулярной динамики.....	18
2.2 AMBER.....	20
ГЛАВА 3 ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	23
3.1 Создание фармакофорной модели.....	23
3.2 Виртуальный скрининг.....	27
3.3 Молекулярный докинг. NNScore.....	28
3.4 Молекулярная динамика.....	33
3.5 Анализ сайта связывания.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	43
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	46

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 46 страниц, 7 рисунков, 10 таблиц, 31 источник, 1 приложение

Ключевые слова: ТИРОЗИНКИНАЗА (ТК), BCR-ABL, МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ (ММ), ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ (ВС), МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА, ФАРМАКОФОРНАЯ МОДЕЛЬ, МИШЕНЬ, ИНГИБИТОР.

Объект исследования: нативная и мутантная формы Bcr-Abl тирозинкиназы, а также их ингибиторы.

Цель работы: поиск потенциальных ингибиторов Bcr-Abl тирозинкиназы и его мутантной формы T315I.

Результаты: В ходе работы методами молекулярного моделирования выявлены соединения, потенциально ингибирующие обе формы тирозинкиназы. Выполнено их описание и оценка взаимодействий с белком.

Области применения: медицинская химия, вычислительная биология, биоинформатика.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца, 46 старонак, 7 малюнкаў, 10 табліц, 31 крыніца, 1 прыкладанне

Ключавыя словы: ТІРАЗІНКІАЗА (ТК), BCR-ABL, МАЛЕКУЛЯРНАЕ МАДЭЛЯВАННЕ (ММ), ВІРТУАЛЬНЫ СКРЫЇНІНГ (ВС), МАЛЕКУЛЯРНЫ ДОКІНГ, МАЛЕКУЛЯРНАЯ ДЫНАМІКА, ФАРМАКАФОРНАЯ МАДЭЛЬ, МІШЭНЬ, ІНГІБІТАР.

Аб'ект даследавання: натывыя і мутантнае формы Bcr-Abl тіразінкіазы, а таксама іх інгібітары.

Мэта работы: пошук патэнцыйных інгібітараў Bcr-Abl тіразінкіазы і яго мутантнай формы T315I.

Вынікі: У ходзе работы метадамі малекулярнага мадэлявання выяўлены злучэнні, патэнцыйна інгібіруючыя абедзве формы тіразінкіазы. Выканана іх апісанне і ацэнка узаемадзеянняў з бялком.

Вобласці ўжывання: медыцынская хімія, вылічальная біялогія, біяінфарматыка.

ABSTRACT

Thesis, 46 pages, 7 figures, 10 tables, 31 sources, 1 appendix

Keywords: TYROSINE KINASE (TK), BCR-ABL, MOLECULAR MODELING (MM), VIRTUAL SCREENING (VS), MOLECULAR DOCKING, MOLECULAR DYNAMICS, PHARMACOPHORAL MODEL, TARGET, INHIBITOR.

Object of study: native and mutant forms of Bcr-Abl tyrosine kinase, as well as their inhibitors.

The purpose of the work: search for potential inhibitors of Bcr-Abl tyrosine kinase and its mutant form T315I.

Results: Compounds that potentially inhibit both forms of tyrosine kinase were identified using molecular modeling methods. Their description and assessment of interactions with the protein have been performed.

Scopes of application: medicinal chemistry, computational biology, bioinformatics.

ВВЕДЕНИЕ

Эволюция вычислительной техники и прогресс в ряде научных дисциплин, таких как химия, биология, фармакология сделали научный эксперимент основой изучения действия лекарственных средств. С помощью рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса получение трёхмерных структур комплексов лиганд-белок стало широкодоступным. Благодаря этому появился такой подход, как рациональный дизайн лекарственных средств (ЛС).

Рациональный дизайн ЛС или рациональный драг-дизайн (от англ. drug — лекарство) — разработка лекарств, основанная на изучении структур и функций молекул-мишеней [1]. Мы используем рациональный драг-дизайн, чтобы создать химические соединения с физиологической активностью, которой мы хотим, чтобы оно обладало. Для этого применяется специальная методология, условно она представима тремя этапами. На первом этапе выполняется поиск или «конструирование» соединений-лидеров, соединений, показывающих желаемую активность, но не являющуюся оптимальной, то есть ее можно улучшить. Это осуществляется на втором этапе методологического подхода — оптимизации соединения-лидера. Когда же этап номер два завершен и мы получили соединение, которое удовлетворяет нашим параметрам оптимальности, можно переходить к непосредственной разработке лекарства — последнему этапу.

При разработке лекарства первым решаемым вопросом будет определение болезни, которой мы хотим противостоять. Выявляется макромолекула, которая является причиной или же катализатором болезни. На данную макромолекулу, биомишень, в организме человека, мы хотим попробовать воздействовать нашим лекарственным средством. Чаще всего данное воздействие происходит путем связывания лекарственного соединения с биомишенью. В качестве биомишени могут выступать белки (обычно рецептор или фермент), молекулы ДНК и некоторые другие биомолекулы. Из вышесказанного можно сделать вывод, что основной задачей дизайна лекарственных средств является поиск структурного прототипа будущего лекарства — соединения-лидера. То, как лучше осуществлять поиск данного соединения зависит от доступной нам информации о биомишени и о существующих лигандах, которые с ней связываются [1].

Как известно, создание новых ЛС процесс весьма трудоёмкий и дорогостоящий. Фармацевтической компании, чтобы добраться до начала клинических испытаний и испытаний на животных может потребоваться от 2 до 10 лет. Даже при наличии всех доступных научных ресурсов самым успешным фармацевтическим компаниям из десяти проектов только в одном

удается вывести лекарство на рынок [2 с.1]. Поэтому поиск потенциально активных соединений-лидеров очень важен. И неотъемлемыми инструментами для этого являются такие методы как молекулярная механика и динамика, неэмпирическая и полуэмпирическая квантовая химия, молекулярный докинг, фармакофорный поиск, виртуальный скрининг и другие.

Целью данной работы является осуществление первого этапа рационального драг-дизайна, а именно, идентификация потенциальных ингибиторов одновременно нативной и мутантной (T315I) форм Vcr-Abl тирозинкиназы на основе фармакофорной модели существующего ингибитора нилотиниба с использованием инструментов, упомянутых выше.

Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1) Освоение инструментов молекулярного моделирования: построение фармакофорных моделей, виртуальный скрининг, молекулярный докинг, молекулярная динамика и другие;

2) Построение фармакофорных моделей на основе взаимодействия известного ингибитора нилотиниба с Vcr-Abl ТК с последующим проведением на их основе виртуального скрининга;

3) Оценка взаимодействия идентифицированных лигандов с биомишенью при помощи молекулярного докинга, оценочной функции NNScore 2.0, а также молекулярно-динамического моделирования.

4) Анализ межмолекулярных взаимодействий в структурных комплексах ТК - полученные лиганды.

Дипломная работа представлена тремя главами. В первой главе содержатся краткие теоретические сведения об используемых методах ММ. Каждому методу отведен отдельный раздел. Вторая глава посвящена МД и пакету программ Amber, с помощью которого она осуществляется. В третьей главе описывается выполнение практической части работы, применение изученных методов ММ, их особенности в данной работе, а также полученные результаты.

ГЛАВА 1

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Bcr-Abl тирозинкиназа. Известные ингибиторы

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — это рак клеток крови, характеризующийся нерегулируемым делением зрелых гранулоцитов и сосредоточением их в крови и костном мозге, откуда затем они перемещаются и образуют скопления в других жизненно важных органах, например, печени или селезенке. В большинстве случаев причиной данного явления выступает филадельфийская хромосома, образующаяся из-за хромосомной мутации. Продуктом упомянутой хромосомы является онкоген BCR-ABL, кодирующий химерный белок Bcr-Abl, содержащий участок белка Abl1, который в свою очередь обладает тирозинкиназной (ТК) активностью. Из-за этого и наш ключевой белок Bcr-Abl также обладает ею. Но в отличие от стандартных ТК, белок Bcr-Abl является постоянно активным и тем самым вызывает безудержное деление иммунной клетки, что приводит к ХМЛ [3].

На данный момент существует три группы основных ингибиторов Bcr-Abl ТК: ингибиторы первого (иматиниб), второго (нилотиниб, дасатиниб) и третьего (понатиниб) поколений.

Первым селективным ингибитором Bcr-Abl ТК стал иматиниб. Иматиниб ингибирует Bcr-Abl ТК путём связывания с ним, которое происходит в следствии образования водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых контактов между иматинибом и аминокислотными остатками активного сайта ТК. Но известно, что при возникновении мутации в гене Bcr-Abl (в частности мутации T315I, при которой остаток треонина в положении 315 изменяется на остаток изолейцина) Bcr-Abl ТК становится устойчивым к иматинибу. В связи с этим были разработаны ингибиторы второго поколения, блокирующая активность которых превосходит иматиниб. Однако проблема резистентности мутации T315I сохранилась и для ингибиторов второго поколения. Поэтому был разработан ингибитор третьего поколения понатиниб. На данный момент он является единственным одобренным ингибитором, успешно воздействующим на мутантную форму T315I. Но стоит отметить, что поиск и разработка новых селективных ингибиторов Bcr-Abl ТК на основе уже существующих проводятся и в настоящее время. Так, например, был разработан структурный аналог понатиниба под названием AP24589, который проявляет большую активность против мутантной формы данной ТК, чем сам понатиниб [4].

1.2 Виртуальный скрининг

Информация о структуре мишени и известных для неё лигандах играет важную роль в поиске новых соединений с заданной активностью. С помощью неё можно сузить огромную скрининговую коллекцию до меньшего набора соединений, которые с большей вероятностью могут связаться с мишенью. В этом случае скрининг считается целевым или сфокусированным. Наиболее распространенным вычислительным методом целевого отбора соединений является виртуальный скрининг. Он включает в себя быструю *in silico* (с помощью компьютера) оценку больших библиотек химических структур для выявления наилучших. Неотъемлемыми составляющими виртуального скрининга являются:

- 1) база данных химических структур в форме, которая может быть проанализирована с помощью вычислений на предмет структурных атрибутов;
- 2) гипотеза или модель структурных атрибутов, которые важны для ожидаемой активности;

Гипотезы.

Существует множество методов, описывающих свойства, для оценки вероятности связывания соединения с заданной мишенью. Например, если для мишени уже существует известный лиганд, то разумным подходом является поиск в базах данных (БД) химических соединений, подобных по структуре известному лиганду. Один простой и понятный метод — это поиск по подструктурам, однако у данного метода есть большой недостаток, он бесполезен при поиске похожих соединений – например, аналогов, в структуру которых входят пятичленные кольца вместо шестичленных. Поэтому были разработаны более сложные вычислительные методы, чем метод подструктур. Эти методы, в целом, можно разделить на следующие категории:

1. 2D-модели подобия
2. Модели 3D-QSAR
3. Структурные модели фармакофоров и молекулярный докинг

Двумерные модели подобия для оценки сходства между двумя молекулами обычно основываются на определении набора так называемых 2D-дескрипторов и последующей оценке того, как данная молекула соответствует каждому дескриптору. Часто дескрипторы формулируются таким образом, что для данной молекулы результаты оценки представляют собой ответ либо «да», либо «нет», либо, на компьютерном языке, «1» или «0». Затем для набора дескрипторов, перечисленных в заданном порядке, может быть сгенерирована соответствующая последовательность из единиц и нулей, которая определяет отпечаток молекулы [5 с.36 — 43].

3D-QSAR (three-dimensional quantitative structure–activity relationships с англ. — количественные соотношения «структура-свойство») — это метод, используемый для количественного прогнозирования взаимодействия между молекулой и активным центром конкретной мишени.

Общий подход 3D-QSAR заключается в выборе группы молекул, каждая из которых была протестирована на определенную активность, выравнивании их трехмерных конформаций в соответствии с некоторыми заранее заданными правилами ориентации, вычислении набора пространственно-зависимых параметров для каждой молекулы, а затем получении функции, которая связывает пространственные параметры каждой молекулы с ее соответствующим биологическим свойством и проверки данной функции на непротиворечивость и предсказуемость. Большим преимуществом 3D-QSAR является то, что нет необходимости знать, как выглядит активный сайт мишени.

Построение фармакофорных моделей и молекулярный докинг будут рассмотрены более подробно в последующих разделах.

1.3 Фармакофорный поиск

Как упоминалось ранее, существует множество различных вычислительных методов, с помощью которых можно выполнять виртуальный скрининг, например, поиск по подструктурам, поиск по коэффициенту сходства и фармакофорный поиск. Из этих трех методов фармакофорный поиск лучше всего определяет химические структуры с заданной физиологической активностью и, тем самым, является приоритетным в первом этапе отбора соединений.

Фармакофор — это трехмерная геометрия расположения функциональных групп, которые молекула должна иметь для связывания в активном сайте белка. К ним относятся такие группы, как доноры и акцепторы водородных связей, ароматические кольца, гидрофобные центры, положительные и отрицательные ионы и др. [2 с. 50 — 51].

Сила фармакофорного поиска заключается в выявлении соединений, активность которых следует проверить, а не в количественном прогнозе ее величины. Для количественного прогнозирования активности соединения используется молекулярный докинг. Также среди преимуществ фармакофорного поиска стоит выделить, во-первых, то, что он не привязывается к конкретной молекулярной структуре соединения, как, например, поиск по подструктуре или поиск по коэффициенту сходства, и, во-вторых, кодирует математическое описание геометрии активного сайта, что значительно ускоряет поиск в больших БД химических структур.

Создание фармакофорной модели

Модель фармакофоров может быть создана либо на основе лиганда или набора лигандов, путём наложения активных молекул и извлечения общих химических свойств, необходимых для их биоактивности, либо на основе структуры, исследуя возможные точки взаимодействия между макромолекулярной мишенью и лигандами [6].

Моделирование фармакофоров на основе лигандов является одной из ключевых вычислительных стратегий для облегчения открытия лекарств в отсутствие макромолекулярной структуры мишени. Обычно данное моделирование выполняется путем извлечения общих химических характеристик из трехмерных структур набора известных лигандов (соединений обучающей выборки), представителей взаимодействия с конкретной мишенью. Ключевыми методами, также вызывающими основные трудности при моделировании фармакофора на основе лигандов, являются управление конформационной гибкостью лигандов и проведение их молекулярного выравнивания. Ввиду конформационной гибкости, некоторые лиганды могут проявлять активность только в определённых конформациях, что

может привести к затруднениям, если для создания модели взята не та конформация. Также есть вероятность того, что активный сайт содержит функциональную группу, взаимодействие с которой необходимо для эффективного связывания, но среди соединений обучающей выборки нет таких, которые могли бы с ней взаимодействовать. В таком случае найденные по модели, построенной без нужных для связывания фармакофоров, лиганды также не будут обладать необходимыми функциональными группами.

Моделирование фармакофоров на основе структуры работает непосредственно с трехмерной структурой макромолекулярной мишени или комплекса макромолекула - лиганд. Протокол моделирования фармакофоров на основе структуры включает анализ дополнительных химических свойств активного центра и его геометрии, а также последующую сборку модели фармакофоров с выбранными характеристиками. Плюсом данного подхода является возможность визуального оценивания взаимодействия полученной модели с сайтом связывания. Часто встречающейся проблемой, при структурном моделировании является идентификация слишком большого количества химических свойств (обычно не приоритетных) для конкретного сайта связывания биомишени. Однако модель фармакофоров, включающая слишком большое число химических характеристик (например, более 7), не подходит для практических приложений скрининга БД соединений. Таким образом, необходимо выбрать ограниченное количество химических свойств (обычно от трех до семи характеристик) для построения практической гипотезы фармакофоров, однако во многих случаях это является непростой задачей.

1.4 Молекулярный докинг

Молекулярный докинг — это автоматизированный компьютерный алгоритм, для определения того, как лиганд будет связываться с активным сайтом белка. Он предоставляет пользователю конформацию соединения и расположение в активном сайте белка, а также значение оценочной функции для данного соединения [2 с.133]. Алгоритм докинга работает следующим образом, сначала находятся различные возможные конформации лиганда в активном сайте белка, затем рассчитывается значение скоринговой функции для каждой. Чаще всего оценочные функции имеют смысл энергии связывания, свободной энергии Гиббса или качественной численной оценки величины связывания.

Докинг, вероятно, является наиболее часто используемым инструментом в компьютерном дизайне лекарств. Он является приоритетным подходом, когда нужно предсказать соединения, которые будут хорошо связываться с белком-мишенью, и увидеть трехмерную геометрию соединения в активном сайте белка. Однако молекулярный докинг не принимает во внимание биодоступность, токсичность и другие факторы, присутствующие в организме. Также ограничениями докинга являются необходимость в знании трехмерной структуры целевого белка и компьютерное время, необходимое для выполнения расчетов. Применение докинга для анализа очень больших наборов соединений может оказаться непрактичным. Поэтому его рационально применять после сужения исходной выборки химических соединений, с помощью менее ресурсоемких методов, например фармакофорного поиска.

1.4.1 Алгоритмы поиска

Любое программное обеспечение для молекулярного докинга включает два основных компонента: алгоритм поиска и функцию оценки. Алгоритм поиска помещает молекулу лиганда в различных конформациях в активный сайт белка-мишени. Наиболее распространенным является докинг в полужестком варианте, это значит, что белок зафиксирован, а свое положение изменяет только лиганд. Также набирает популярность гибкий докинг, когда свои конформации изменяют и лиганд и белок. Но данный метод всё еще является очень затратным с точки зрения вычислений, но зато он наиболее близок к реальному поведению молекулярной системы. Следовательно, алгоритм поиска отвечает за широту конформационного пространства, которое будет рассмотрено. Однако точность результатов в большей степени зависит от функции оценки, ведь именно она определяет, какая из предложенных

алгоритмом поиска конформаций имеет наименьшую энергию связывания. Далее будут рассмотрены некоторые существующие алгоритмы поиска.

а) *Метод Монте-Карло* или же метод случайных чисел. Идея данного алгоритма заключается в следующем: генерируются случайные положения лиганда, а затем для каждого положения генерируются различные конформации. В большинстве алгоритмов конформационные изменения происходят только за счёт вращения вокруг одинарных связей.

б) *Табу-поиск*, модификация метода Монте-Карло. Принцип данного алгоритма идентичен методу Монте-Карло, но главной особенностью является отсеивание повторяющихся положений лиганда. Именно поэтому табу-поиск превосходит по скорости метод случайных чисел.

в) *Алгоритм симуляции нагрева* отличается от табу-поиска тем, что после сохранения случайных конформаций с соответствующими значениями скоринговой функции глубоко анализируются конформации с низкими значениями энергии, а конформациям с более высокими энергиями уделяется гораздо меньше внимания. Стоит отметить, что алгоритмы табу-поиска и симуляции нагрева дают такую же точность, как и метод Монте-Карло, но при этом требуют меньше итераций, а, следовательно, и занимают меньше времени. Однако при реализации таких алгоритмов поиска потребляется больше оперативной памяти, чем при использовании алгоритма Монте-Карло.

г) *Генетические алгоритмы* образуют идейно другую группу алгоритмов поиска, нежели упомянутые выше. При грамотно подобранных параметрах данный алгоритм позволяет проводить поиск быстро и тщательно. На первых этапах создаётся «популяция», которая содержит случайным образом сгенерированные положения лиганда, далее отбираются только лучшие варианты, они претерпевают некоторые изменения и лучшие получившиеся «дочерние» положения комбинируются с «родительскими». После нескольких «поколений» отбираются положения с лучшими значениями скоринговой функции и оптимизируются. Минусом такого подхода является большее потребление оперативной памяти, чем в иных алгоритмах докинга.

д) *Алгоритмы для учёта конформационной гибкости белка-мишени* выделяются в отдельную группу, так как в некоторых случаях данный вопрос обладает особой важностью, как, например, для мишеней, которые претерпевают конформационные переходы при связывании с лигандом. В рамках таких алгоритмов реализуется либо полная, либо частичная подвижность белка, что значительно улучшает результаты докинга, однако для таких расчётов требуется больше компьютерного времени.

е) *Алгоритмы для моделирования связывания лигандов с образованием ковалентной связи с аминокислотным остатком белка*, представляют еще одну группу. Такой тип связывания является проблематичным для описания с помощью докинга, поскольку большинство программного обеспечения не поддерживает данную функцию. Решением в данной ситуации может быть использование квантово-химического расчёта для установления энергии ковалентной связи и использования её как поправки к результатам докинга. Однако такой подход занимает значительно больше времени и требует больше ресурсов, чем обычный докинг. Также можно использовать комбинированные методы квантовой механики и молекулярной механики, поскольку обычный докинг основан на принципах молекулярной механики, а образование ковалентных связей на квантовой [30].

1.4.2 Оценочные функции

Точные, основанные на физических расчетах, вычислительные методы для предсказания энергии связывания, такие как термодинамическое интегрирование или возмущение свободной энергии, слишком затратны по времени и вычислениям для использования в виртуальном скрининге. Но зато разработаны более простые скоринговые функции, жертвующие некоторой точностью в пользу большей скорости. Многие из данных функций применяются при молекулярном докинге для оценки энергии связывания и отбора соединений с наилучшими оценками.

Выделяют следующие классы скоринговых функций:

- *Основанные на молекулярных силовых полях*, используют явную оценку электростатических сил взаимодействия и сил Ван-дер-Ваальса для предсказания энергии связывания. Программы для докинга, использующие данный вид функций, включают AutoDock, Dock, Glide, ICM и Gold (GoldScore).

- *«Эмпирические»* функции, в отличие от основанных на молекулярных силовых полях вычисляют взвешенную сумму гидрофобных взаимодействий и водородных связей, реализуемых в комплексе.

- *«Основанные на знаниях»* или же статистические функции, определяются анализом БД кристаллической структуры и извлечением из них необходимой информации. Наиболее энергетически выгодными считаются пары типов атомов, которые часто встречаются на близком расстоянии друг от друга.

Результатом виртуального скрининга являются предсказанные лиганды, которые впоследствии подтверждаются экспериментально. Однако современные функции оценки дают много ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Удивительно, но человек с надлежащей подготовкой часто может анализировать закрепленную структуру визуально и правильно оценивать ингибирование с большей точностью. Именно поэтому были разработаны быстрые и точные функции оценки на основе нейронных сетей. Рассмотрим данный класс более подробно на примере функции NNScore 2.0 [8].

Нейросетевая оценочная функция NNScore 2.0 оценивает такой параметр связывания, как константа диссоциации (K_d). Данный параметр характеризует афинность связывания рецептора и лиганда, чем меньше его значение, тем прочнее связь. Данная функция в некотором смысле «основана на знаниях», поскольку опирается на базы данных структуры белков, чтобы выявить структурные характеристики, благоприятно влияющие на связывание. Но всё же основополагающими являются 20 различных нейронных сетей. В результате работы NNScore 2.0 получается три независимых варианта оценки. Первый, доступны 20 оценок, по одной от каждой сети соответственно. Второй, результатом является наилучшая оценка среди всех 20 сетей. И третий, наилучший и рекомендуемый подход, это средняя оценка, полученная с учётом всех 20 оценок.

Стоит отметить, что несмотря на то, что нейросетевой подход к предсказанию сродства полезен сам по себе, он более эффективен в сочетании с другими видами оценочных функций. Например, хорошей практикой является использование NNScore 2.0 для повторной оценки поз лигандов, выявленных докинггом, с использованием скоринговой функции, основанной на силовом поле.

ГЛАВА 2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА

Молекулярная динамика (МД) или молекулярно-динамическое моделирование — это подход для предсказания, как каждый атом белка или другой молекулярной системы будет перемещаться с течением времени на основе общей модели физики, регулирующей межатомные взаимодействия. Данный метод моделирования охватывает широкий спектр важных биомолекулярных процессов, включая конформационные изменения, связывание лиганда и фолдинг белков. Важно, что такое моделирование может также предсказать, как биомолекулы будут реагировать на атомном уровне на возмущения, такие как мутация, фосфорилирование, протонирование, присоединение или удаление лиганда. МД моделирование часто используется в сочетании с широким спектром экспериментальных методов структурной биологии, включая рентгеновскую кристаллографию, криоэлектронную микроскопию (крио-ЭМ), ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и др. Это связано с тем, что данные методы предоставляют структурную информацию о молекулах в статической форме, в то время как чаще всего они подвижны. Таким же недостатком относительно МД обладает и молекулярный докинг.

МД даёт ответы на множество вопросов. Просто изучая моделирование биомолекулярной структуры, можно количественно определить, сколько различных областей молекулы движутся в равновесии и какие типы структурных колебаний они испытывают. Такое моделирование может также выявить динамическое поведение молекул воды и солевых ионов, которые часто являются критическими для функции белка и связывания лиганда. На основе результатов моделирования проводятся необходимые эксперименты для совершенствования и разработки лекарственных средств. Именно поэтому МД является неотъемлемой частью структурного драг-дизайна.

2.1 Основы молекулярной динамики

Основная идея МД проста: учитывая положения всех атомов в биомолекулярной системе можно рассчитать силу, действующую на каждый атом всеми остальными атомами. Таким образом, можно использовать законы движения Ньютона, чтобы предсказать положение каждого атома в пространстве как значение функции, зависящей от времени. А именно, на каждом временном шаге, вычислять силы для каждого атома, а затем использовать эти силы для обновления положения и скорости каждого атома. Результирующая траектория, по сути, является 3D фильмом, который описывает конфигурацию системы на атомном уровне в каждой точке в течение временного интервала симуляции.

Это моделирование является мощным по нескольким причинам. Во-первых, фиксируется положение и движение каждого атома в любой момент времени, что очень сложно сделать во время эксперимента. Во-вторых, условия моделирования точно известны и могут тщательно контролироваться: начальная конформация белка, какие лиганды связаны с ним, есть ли у него какие-либо мутации или посттрансляционные модификации, какие другие молекулы присутствуют в его окружении, его состояние протонирования, температура, напряжение на мембране и так далее.

Силы в МД моделировании рассчитываются с использованием модели, известной как **силовое поле** молекулярной механики. Силовое поле это набор формул, связывающих компоненты потенциальной энергии молекулы с ее геометрическими параметрами, а также числовые значения параметров, входящих в эти формулы.

Чтобы обеспечить числовую стабильность, временные шаги в МД моделировании должны быть короткими, обычно всего несколько фемтосекунд (10^{-15} с) каждый. Большинство событий, представляющих биохимический интерес, например, функционально важные структурные изменения в белках, происходят во временных масштабах наносекунд, микросекунд или дольше. Таким образом, типичное моделирование включает миллионы или миллиарды временных шагов. Этот факт в сочетании с миллионами межатомных взаимодействий, обычно оцениваемых в течение одного временного шага, приводит к тому, что имитации становятся очень затратными в вычислительном отношении. Но усовершенствования в вычислительном оборудовании, а также в алгоритмах и программном обеспечении, используемых для МД моделирования, позволили проводить более длительные и более дешевые симуляции.

Глубоких экспертных знаний требуют выяснение того, какие вопросы могут быть решены с помощью моделирования, разработка моделей для решения этих вопросов, анализ и интерпретация результатов моделирования. Интерпретация результатов моделирования — получение биологической информации из большого количества траекторных данных, описывающих массу колеблющихся атомов — может быть особенно сложной [16].

Для выполнения МД моделирования необходимо определиться со следующими аспектами.

1) Какое вычислительное оборудование использовать. Хорошим вариантом являются графические процессоры, потому что они выполняют быстрое моделирование при скромных затратах. Моделирование также выполняется и на суперкомпьютерах, которые выигрывают во времени, и на более доступных традиционных центральных процессорах.

2) Какое силовое поле использовать. Наиболее распространенными вариантами являются различные версии AMBER, CHARMM и OPLS. Все эти силовые поля базируются на схожих функциональных формах, но у каждого есть свои плюсы и минусы. И в зависимости от поставленной задачи мы выбираем наиболее подходящее.

3) Какое программное обеспечение для моделирования использовать. Наиболее популярные варианты включают GROMACS, NAMD, AMBER, CHARMM, Desmond и OpenMM. Большинство современных программных пакетов для моделирования поддерживают несколько силовых полей. Все вышеперечисленные программные пакеты выполняют схожие вычисления, но отличаются тем, насколько оптимально они работают на различных устройствах и какие функции они поддерживают (например, схемы контроля температуры и давления, поддержка крупномасштабных симуляций).

4) Какую модель растворителя выбрать для проведения вычислительного эксперимента. Если растворитель не задан, то по умолчанию расчёты будут проводиться в вакууме. Наиболее часто растворителем, как правило, выступает вода. Так как в живых организмах белки и лиганды чаще всего находятся в растворе.

2.2 AMBER

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) — это собирательное название набора программ, которые позволяют пользователям проводить молекулярно-динамическое моделирование, особенно на биомолекулах. Пакет ПО Amber представлен двумя частями: AmberTools, набор свободно доступных программ, и Amber, который сосредоточен вокруг программы моделирования `rmsd` и доступен по ограниченной лицензии [17].

Чтобы понять, как происходит работа в Amber рассмотрим его поток информации, изображённый на рисунке 2.1, какая информация необходима программам моделирования (`sander`, `rmsd`, `mdgxornab`), откуда она берется и как преобразуется в форму, которую требуют эти программы.

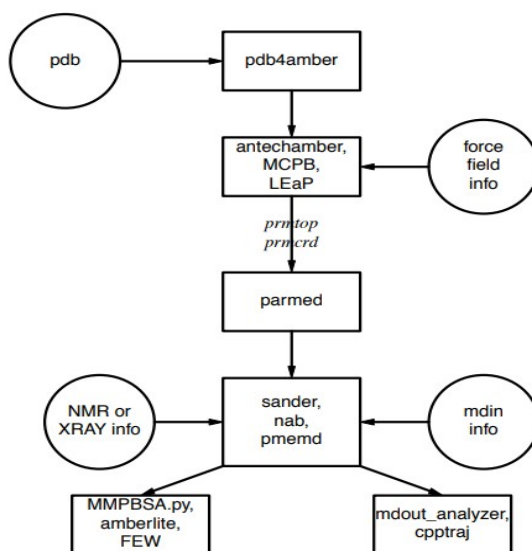


Рисунок 2.1 — Стандартный информационный поток Amber

Для того, чтобы приступить к этапу моделирования, необходимо пройти подготовительные этапы, для этого требуются знание следующей информации:

- 1) Декартовы координаты для каждого атома в исходной молекулярной системе. Стандартно они представлены в файле формата Protein Data Bank (PDB). И извлекаются из соответствующей названию формата базы данных. Как уже упоминалось ранее, трёхмерную структуру комплекса или отдельной молекулы можно получить такими методами как рентгеновская кристаллография, ЯМР-спектроскопия или специальное построение модели. Откуда структура попадает в PDB. Программа *LEaP* предоставляет платформу для выполнения многих подготовительных задач моделирования. Чаще всего,

необходимо редактирование файлов, для их совместимости с LEaP, этим занимается утилита *pdb4amber*.

2) Параметры топологии. Данные параметры содержат информацию о типах атомов, названиях атомов и остатков аминокислот, частичных зарядах атомов, связности. Основным источником этих параметров выступает специальная база данных AMBER, если же информация о топологии в ней не найдена, то пользователем с помощью программы *antechamber* генерируется специальный «файл остатков», с указанной информацией.

3) Параметры для силового поля. Стандартно они включают в себя параметры для всех связей, углов, двугранных углов и типов атомов в системе. Поддерживаются стандартные параметры для некоторых силовых полей или же пользователь может подготовить собственные файлы параметров.

После того, как файлы топологии и координат созданы. Используется программа *parmed* для проверки входных файлов, внесения необходимых изменений и пометок потенциальных проблем. После выполнения программ симуляции и проверки исходных данных, к работе приступают непосредственно программы моделирования: *sander*, *pmemd*.

Силовые поля в Amber. Модель растворителя.

Как отмечалось ранее важными аспектами моделирования являются силовое поле и модель растворителя. Наиболее применимыми при моделировании взаимодействий белок-лиганд с помощью программ Amber являются следующие силовые поля: силовое поле белка (a protein force field) и общее силовое поле.

1) *Общее силовое поле Amber GAFF (General AMBER Force Field) [18].* Данное силовое поле имеет более общие типы атомов и по структуре представляет собой полное силовое поле, что позволяет использовать его для огромного разнообразия химических соединений. В основу вычислений данного силового поля заложена простая по форме гармоническая функция для связей и углов. GAFF полностью совместим с макромолекулярными силовыми полями AMBER, такими как силовое поле белка/нуклеиновых кислот, что является неоспоримым плюсом при расчете свободной энергии связывания.

2) *Силовое поле белка, рекомендованное к использованию в AMBER – FF14SB [19].* Данное силовое поле чаще всего используется с водой, выступающей в роли явного растворителя.

Растворитель.

На сегодняшний день наиболее часто встречающимися являются 3-центровые модели воды, например одна из них TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 Points). Данная модель является довольно старой (разработанной еще на ранних этапах создания программ Amber), ее свойства значительно отличаются от свойств реальной воды. Но все же она очень популярна и главной причиной этому является ее хорошая совместимость со старыми силовыми полями. Но это не означает, что с силовыми полями, разработанными не так давно, она не будет совместима. Разработчики старались сделать функции расчета потенциальной энергии самодостаточными. Именно поэтому, например, с силовым полем FF14SB, появившемся в недалеком прошлом, модель воды TIP3P отлично согласовывается.

Также для моделирования процессов, происходящих в клетках живого организма, необходимо учитывать, что растворителем выступает солевой раствор. Ионная сила растворителя в клетках человеческого организма примерно равна 0.15 М. Для солевых растворов ионная сила соответствует концентрации одновалентных ионов, поэтому важно грамотно рассчитать необходимое количество ионов Na^+ , Cl^- для достижения требуемой концентрации соли и для нейтрализации растворенного вещества. Данную задачу неплохо решает метод SLTCAP (screening layer tally by container average potential) [21], но для практических целей чаще используется его упрощенная версия SPLIT [22]. Согласно данному методу, необходимое количество положительных N_+ и отрицательных ионов N_- вычисляется по следующей формуле:

$$N_{+/-} \approx \frac{N_w * M_w * c_0}{\rho_w} \mp \frac{Q}{2} \approx \frac{N_w * c_0}{56} \mp \frac{Q}{2} \quad (1)$$

где N_w — количество молекул воды, M_w — молярная масса воды, c_0 — желаемая концентрация соли, ρ_w — плотность воды, Q — заряд комплекса.

ГЛАВА 3

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

3.1 Создание фармакофорной модели

При создании фармакофорной модели на основе уже известного ингибитора необходимо определить участки его молекулы, за счёт которых происходит эффективное связывание с биологической мишенью в организме.

В качестве известного ингибитора рассматривался нилотиниб, а в качестве биомишени нативная форма Bcr-Abl ТК.

Анализ результатов рентгенографического исследования комплекса Bcr-Abl / нилотиниб показал, что нилотиниб находится глубоко внутри сайта связывания и взаимодействует с белком через водородную связь с аминокислотными остатками Thr315, Asp381, Met318 и Glu286, и через пи-пи взаимодействие с Tyr253, и пи-катион с Lys271 [3]. Если рассматривать более детально (рисунок 3.1): нилотиниб связывается с киназным доменом, создавая четыре водородные связи, а именно пиридин- N и NH основной цепи Met-318, анилино- NH и OH боковой цепи Thr-315, амидо-NH и карбоксилата боковой цепи Glu-286 и амидокарбонил с NH основной цепи Asp-381 [9].

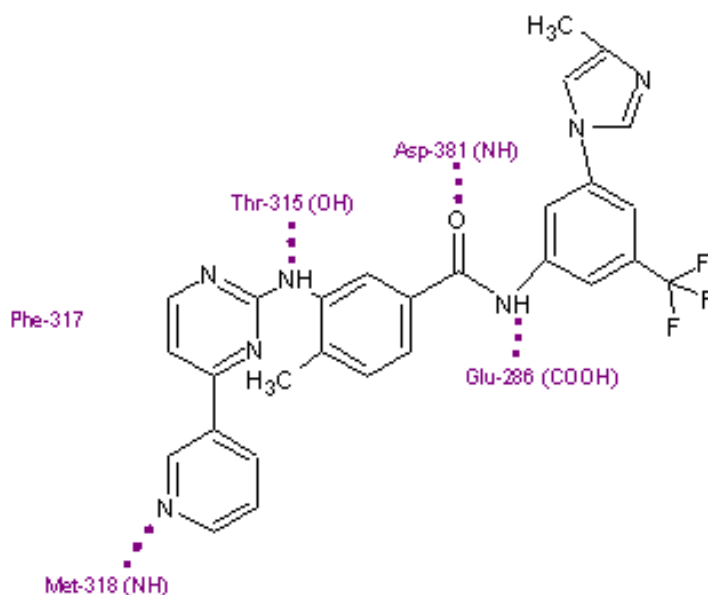


Рисунок 3.1 — Нилотиниб в активном сайте Bcr-Abl ТК

Также была рассмотрена фармакофорная модель нилотиниба для BCR-ABL ТК, полученная с помощью подхода 3D-QSAR [10]. На основе данной модели, а также фармакофоров, автоматически генерируемых веб-сервисом Pharmit, были созданы три фармакофорные модели.

Модель 1 (основная модель) (рисунок 3.2, таблица 3.1)

В основе ее построения заложен факт, что нилотиниб неактивен против мутантной формы T315I, частично по причине прочной связи с остатком Thr315. Поэтому было принято решение не включать в модель донора водородной связи, отвечающего за взаимодействие с вышеупомянутым аминокислотным остатком, с целью увеличения шанса идентифицировать ингибитор мутантной формы ТК.

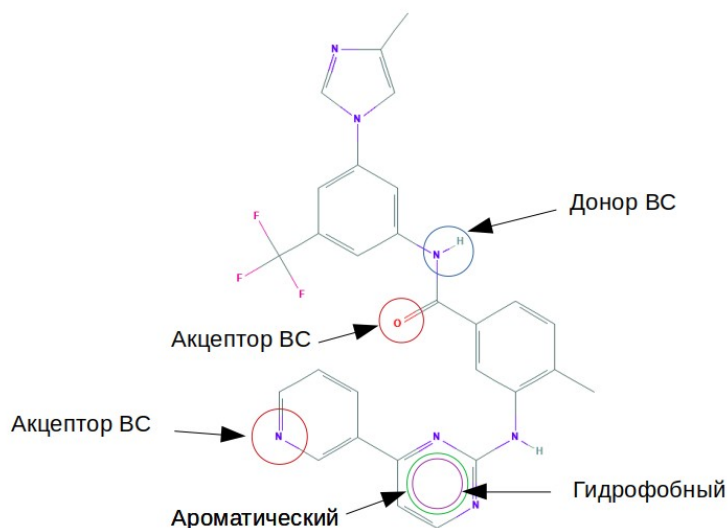


Рисунок 3.2 — Модель 1

Таблица 3.1 — Модель 1

Тип фармакофора	X	Y	Z	Радиус (Å)
Ароматический	33.09	0.45	52.07	1.1
Донор ВС	25.94	3.23	53.06	0.5
Акцептор ВС	35.2	-2.63	48.66	0.5
Акцептор ВС	27.37	3.05	51.31	0.5
Гидрофобный	33.09	0.45	52.07	1.0

Модель 2 (рисунок 3.3, таблица 3.2)

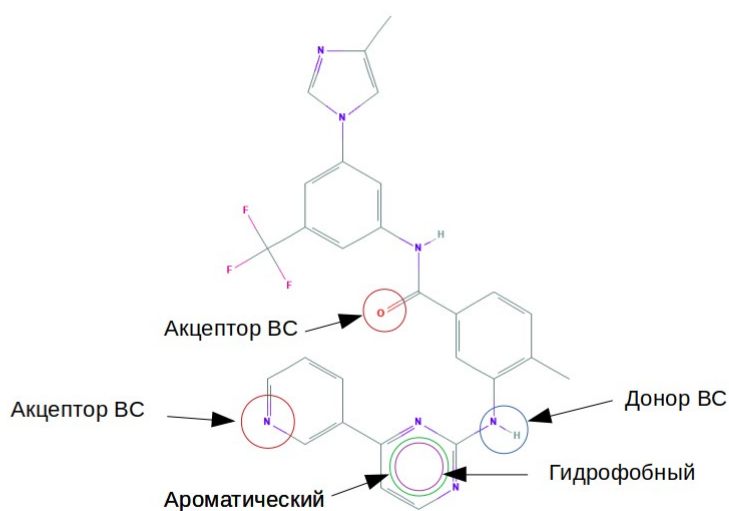


Рисунок 3.3 — Модель 2

Таблица 3.2 — Модель 2

Тип фармакофора	X	Y	Z	Радиус (Å)
Ароматический	33.09	0.45	52.07	1.1
Донор ВС	30.68	-0.59	52.25	0.5
Акцептор ВС	35.2	-2.63	48.66	0.5
Акцептор ВС	27.37	3.05	51.31	0.5
Гидрофобный	33.09	0.45	52.07	1.0

Модель 3 (рисунок 3.4, таблица 3.3)

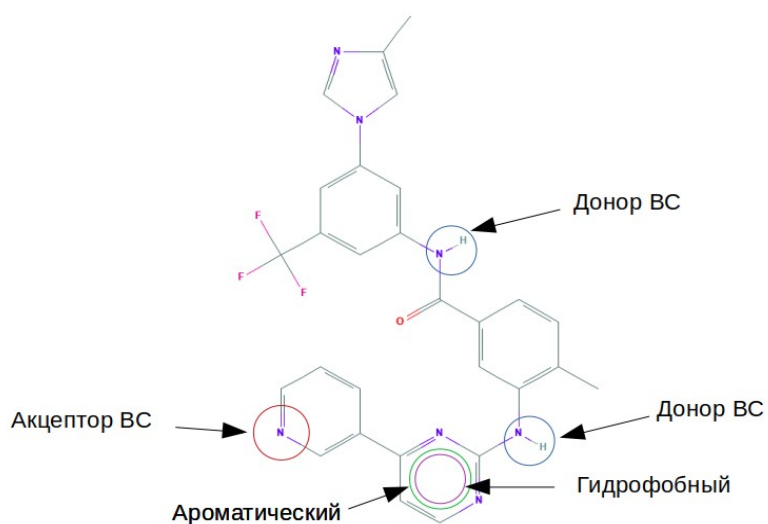


Рисунок 3.4 — Модель 3

Таблица 3.3 — Модель 3

Тип фармакофора	X	Y	Z	Радиус (Å)
Ароматический	33.09	0.45	52.07	1.1
Донор ВС	30.68	-0.59	52.25	0.5
Донор ВС	25.94	3.23	53.06	0.5
Акцептор ВС	35.2	-2.63	48.66	0.5
Гидрофобный	33.09	0.45	52.07	1.0

3.2 Виртуальный скрининг

Из БД PDB были импортированы файлы с комплексами 3cs9 (Vcr-Abl / нилотиниб), 3oy3 (Vcr-Abl (T315I) / AP24589). С помощью USCF Chimera [11] и веб-сервера SWISS-MODEL [12] были выполнены первичные этапы подготовки файлов структур: удаление кристаллизованных молекул воды, заполнение пробелов в аминокислотной последовательности белка, добавление недостающих атомов водорода, минимизация комплекса по энергии.

Непосредственно виртуальный скрининг осуществлялся с помощью онлайн-ресурса Pharmit [13]. В него была загружена нативная форма Vcr-Abl тирозинкиназы и нилотиниб в качестве рецептора и лиганда, соответственно. С помощью инструментов данного сервиса поочерёдно были настроены нужные фармакофорные модели. Поиск осуществлялся по следующим базам данных химических соединений: ChEMBL, ChemDiv, ChemSpace, MCULE, MolPort, NCI, PubChem, ZINC, с учётом фильтров, приведенных в таблице 3.4.

Таблица 3.4 — Фильтры для поиска на основе построенных моделей

m	LogP	HBD	HBA	E	RMSD
<500 Da	<5	<5	<10	<0	<2.0

Результаты поиска дополнительно ранжировались и отфильтровывались с использованием минимизации энергии (MaxScore = 0, Max mRMSD = 2), затем импортировались на локальный компьютер. Итоговые результаты виртуального скрининга на основе фармакофорных моделей приведены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 — Результаты фармакофорного поиска

№ модели	ChEMBL	ChemDiv	Chem Space	MCULE	Mol Port	NCI	PubChem	ZINC	Найдено соединений
1	1403	1333	7820	7393	5057	6	5142	4653	32807
2	497	209	8527	6491	3523	3	5280	2763	27293
3	132	36	4297	1501	601	0	2080	447	9094

3.3 Молекулярный докинг. NNScore

Для подготовки соединений к молекулярному докингу были выполнены следующие шаги:

1) Сжатый файл формата SDF, скачанных из Pharmit химических структур, был преобразован в множество pdbqt файлов, для каждой химической структуры отдельный, с помощью программного обеспечения OpenBabel [14];

2) Так как поиск производился по трём фармакофорным моделям, то могли встретиться одинаковые соединения в нескольких моделях. Во избежание лишних вычислений при докинге, был написан скрипт на языке программирования python, гарантирующий уникальность химических соединений. После данного этапа количество соединений для докинга уменьшилось с 69194 до 55618. После этого было решено в данной работе выполнить полное исследование 32807 соединений, найденных по первой фармакофорной модели в связи с длительными расчётами. Соединения, найденные по второй и третьей моделям также будут исследованы в дальнейшем, но результаты будут зафиксированы уже в другой работе.

3) Файлы рецепторов Vcr-Abl TK и его мутантной (T315I) формы также были переведены в формат pdbqt.

4) Написаны файлы конфигураций для докинга, с учётом геометрии сайтов связывания мишеней. Значение параметра «exhaustiveness», представляющего собой параметр глубины конформационного поиска лиганда было принято равным 150.

После этапа подготовки был запущен молекулярный докинг с помощью программы QuickVina 2 [15], был использован вариант докинга с зафиксированным рецептором и подвижным лигандом. При отборе лучших по результатам докинга соединений учитывались значения энергии связывания лиганда как с нативной формой тирозинкиназы, так и с мутантной. Были отобраны 100 соединений, присутствующие в топе по обоим показателям.

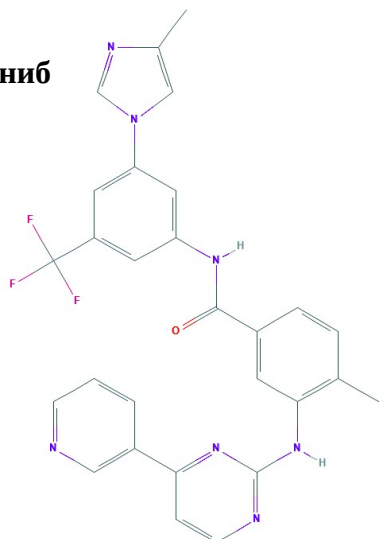
Для комплексов белок-лиганд, образованных 100 лучшими по результатам докинга соединениями, была рассчитана константа диссоциации с помощью нейросетевой оценочной функции NNScore 2.0 [8]. После этого выборка соединений была уменьшена до 10 с наилучшими показателями по четырем параметрам, а именно, значениям энергии связывания с нативной и мутантной формами по результатам докинга и значениям константы диссоциации комплексов лиганд-нативная форма и лиганд-мутантная форма. Результаты представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 — Результаты молекулярного докинга и оценка NNScore2.0 для эталонных соединений и десяти найденных лигандов

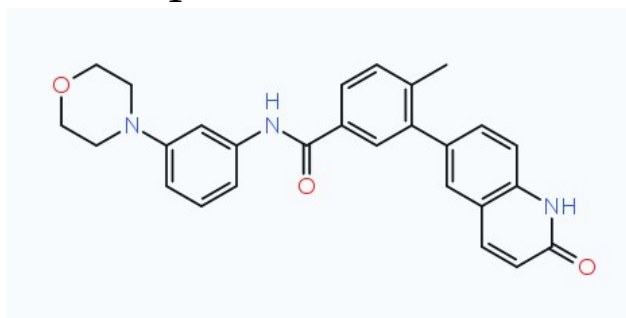
Лиганд	Энергия связывания с нативной формой (ккал/моль)	Энергия связывания с T315I (ккал/моль)	K _d (нативная форма) нМ	K _d (T315I) нМ
Нилотиниб	-15.1	-10.8	0.238	1720
AP24589	-11.4	-12.6	128.4	31.04
1	-13.8	-12.3	2.73	62.03
2	-12.3	-11.1	0.691	11.09
3	-11.8	-10.9	3.78	2.11
4	-12.3	-11.1	0.623	2
5	-12.0	-11.3	0.624	34.2
6	-11.9	-11.2	0.256	195.76
7	-11.9	-10.9	0.734	4.4
8	-11.8	-10.8	0.653	8.44
9	-11.9	-11.1	0.364	26.87
10	-12.0	-10.9	0.614	53.55

Химические структуры эталонных ингибиторов и идентифицированных отображены на рисунке 3.5. В таблице 3.7 представлены их физико-химические параметры. Анализ данных этой таблицы показывает, что все найденные лиганды полностью удовлетворяют правилу Липинского [26].

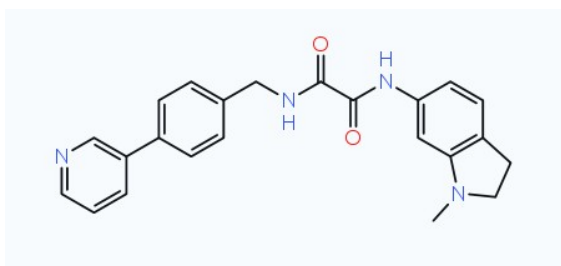
Нилотиниб



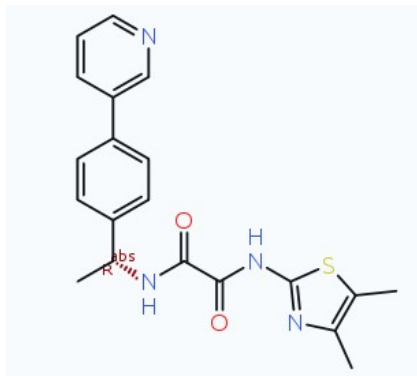
1



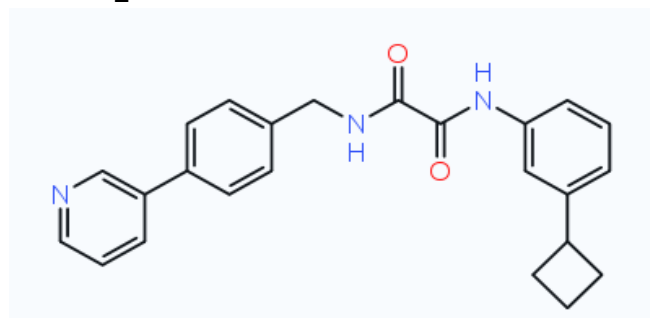
3



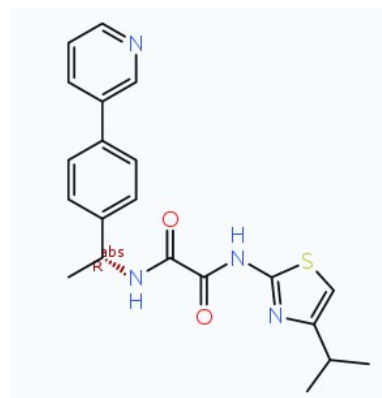
5



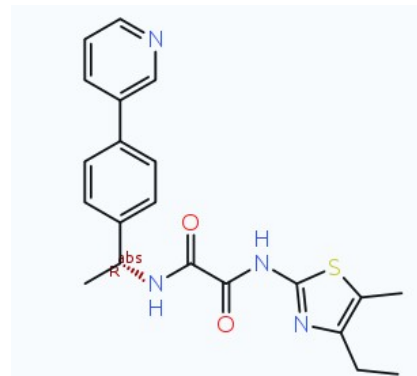
2



4



6



AP24589

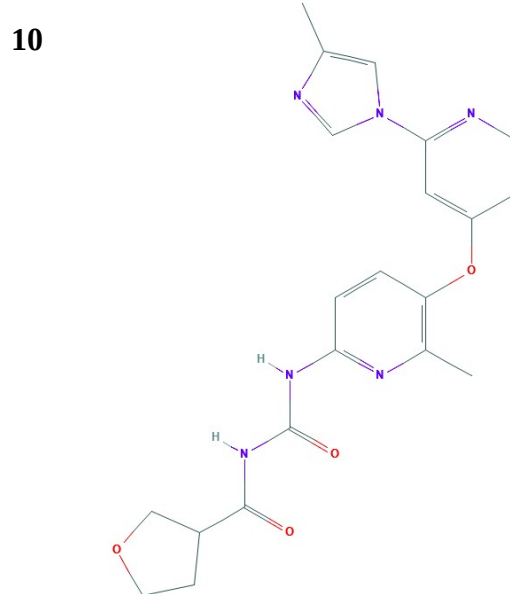
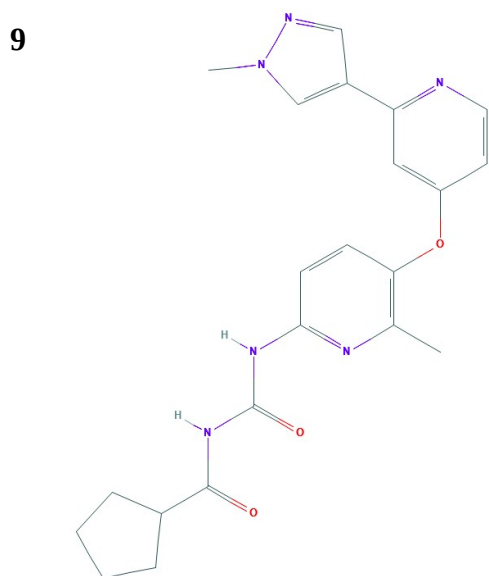
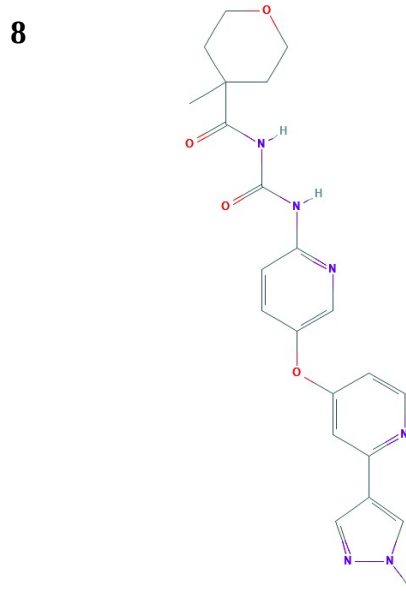
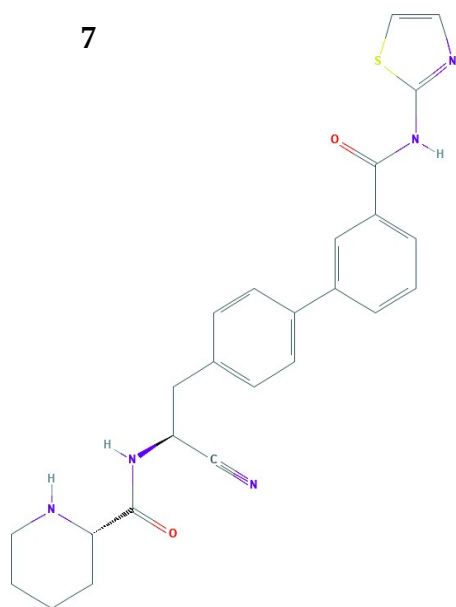


Рисунок 3.5. — Химические структуры потенциальных ингибиторов Vcr-Abl ТК

Таблица 3.7 — Химические соединения, потенциальные ингибиторы нативной и мутантной (Т315I) форм Bcr-Abl ТК

Лиганд	Химическая формула	Молекулярная масса (Да)	Число доноров водородной связи	Число акцепторов водородной связи	LogP
1	$C_{27}H_{25}N_3O_3$	439.5	2	6	3.8
2	$C_{24}H_{23}N_3O_2$	385.5	2	5	3.57
3	$C_{23}H_{22}N_4O_2$	386.5	2	6	2.15
4	$C_{21}H_{22}N_4O_2S$	394.2	2	6	3.27
5	$C_{20}H_{20}N_4O_2S$	380.2	2	6	2.9
6	$C_{21}H_{22}N_4O_2S$	394.2	2	6	3.3
7	$C_{25}H_{25}N_5O_2S$	459.6	3	6	3.6
8	$C_{22}H_{24}N_6O_4$	436.5	2	7	1.6
9	$C_{22}H_{24}N_6O_3$	420.5	2	6	2.9
10	$C_{21}H_{22}N_6O_4$	422.4	2	7	1.8

3.4 Молекулярная динамика

Молекулярно-динамическое моделирование комплексов лиганд-белок проводилось с помощью пакета программ Amber. Этап подготовки проводился с помощью AmberTools18, а МД и расчёт свободной энергии связывания с помощью Amber16. Это связано с тем, что подготовка комплексов проводилась на локальном компьютере, а ресурсозатратные вычисления осуществлялись на удаленном сервере с использованием программно-аппаратной архитектуры параллельных вычислений CUDA на графических процессорах фирмы Nvidia.

Подготовка комплекса.

1) Для первичной подготовки лиганда использовалась программа UCSF Chimera [11], с помощью нее были добавлены недостающие атомы водорода и рассчитаны заряды на атомах по схеме Gasteiger [22], затем файл сохранен в формате mol2 с типами атомов Amber. Дальнейшая подготовка осуществлялась с помощью таких программ Amber как parmchk2 и LEaP. Для лиганда было использовано силовое поле GAFF [18].

2) Подготовка белка (обеих форм) полностью осуществлялась с помощью программы rdb4amber. Особое внимание было уделено проверке наличия в ТК дисульфидных мостиков. Для этого белок анализировался в UCSF Chimera и всевозможные комбинации дисульфидных связей были прописаны вручную при загрузке белка в LEaP, чтобы убедиться, что расстояние достаточно большое и связей нет. Для белка было использовано силовое поле FF14SB [20].

3) На последнем этапе лиганд и белок были объединены в один комплекс при помощи программы LEaP. Затем были сохранены файлы координат и топологии для лиганда, белка и комплекса, для расчёта свободной энергии связывания в будущем. После этого комплексы были помещены в октаэдрическую коробку с параметром отступа 10 Å. Для задания явного растворителя использовалась модель воды TIP3P. Далее с помощью метода SPLIT [21] было посчитано необходимое количество противоионов Na⁺ / Cl⁻ для нейтрализации комплекса и достижения ионной силы равной 0.15. После сохранения файлов топологии и координат сольватированного комплекса этап подготовки был завершён.

Непосредственная динамика.

Система (сольватированный комплекс) минимизировалась с помощью алгоритма наискорейшего спуска, затем методом сопряжённых градиентов, 500 и 1500 шагов, соответственно. Все атомы белка, за исключением атомов водорода были зафиксированы с применением гармонического потенциала с силовой константой равной 1.0 ккал/моль. Далее были зафиксированы только

атомы основной цепи с таким же значением силовой константы. После этапа минимизации были выполнены следующие этапы уравнивания системы:

1) нагрев от 0 К до 310 К в течение 1.4 нс в рамках ансамбля NVT с использованием термостата Ланжевена с частотой соударений 2.0 ps^{-1} .

2) уравнивание давления с ограничениями на протяжении 1.0 нс в рамках ансамбля NPT при давлении равном 1.0 бар. Для поддержания постоянного давления использовался баростат Берендсена с характеристическим временем равным 2.0 пс.

3) уравнивание давления без ограничений при 310 К в течение 1.0 нс в рамках ансамбля NPT.

После уравнивания системы была проведена молекулярная динамика на протяжении 30 нс в рамках ансамбля NPT при температуре 310 К и давлении 1.0 бар. Для кулоновских и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий было использовано ограничение в 8 Å. Дальнедействующие взаимодействия были рассчитаны с помощью алгоритма PME (Particle Mesh Ewald) [23].

С полным перечнем параметров, использовавшихся на этапах подготовки к динамике и для запуска самой динамики, можно ознакомиться в приложении А.

После динамики были получены файлы траекторий поведения комплекса, состоящие из 2500 фреймов. Данные файлы были проанализированы с помощью функции MD Movie в UCSF Chimera на предмет целостности комплекса. Также с этой же целью были построены графики среднеквадратического отклонения атомов основной цепи белка от первоначального положения (RMSD).

Расчёт свободной энергии связывания.

Свободная энергия связывания рассчитывалась с помощью программы Amber MMPBSA.py [24] с использованием метода MM/GBSA [25]. Для расчетов применялись фреймы соответствующие последним 25 нс динамики и шагу 0.125 нс, а именно каждый десятый начиная с 416 по 2500 включительно, всего 209 фреймов. В таблице 3.8 представлены абсолютные значения свободной энергии связывания без учёта энтропийного вклада и результаты, полученные на предыдущих этапах исследования, для возможности сравнения и оценки ранжирования различными методами.

Таблица 3.8 — Оценка свободной энергии связывания с использованием метода MM/GBSA, результаты молекулярного докинга и NNScore2.0

Лиганд	$\langle \Delta H \pm (\Delta H)_{STD} \rangle$ (ккал/моль)	Энергия связывания (докинг) (ккал/моль)	K_d (нМ)
Bcr-Abl			
Нилотиниб	<i>-47.88 ± 4.06</i>	<i>-15.1</i>	<i>0.238</i>
AP24589	-56.1 ± 4.17	-11.4	128.4
1	-42.20 ± 3.88	-13.8	2.73
2	-47.8 ± 3.03	-12.3	0.691
3	-42.7 ± 3.07	-11.8	3.78
4	-43.0 ± 3.04	-12.3	0.623
5	-39.54 ± 3.00	-12.0	0.624
6	-42.16 ± 2.66	-11.9	0.256
7	-49.69 ± 3.68	-11.9	0.734
8	-43.74 ± 3.08	-11.8	0.653
9	-47.51 ± 3.14	-11.9	0.364
10	-44.5 ± 3.29	-12.0	0.614
Bcr-Abl (T315I)			
Нилотиниб	-41.19 ± 3.21	-10.8	1720
AP24589	<i>-56.15 ± 4.61</i>	<i>-12.6</i>	<i>31.04</i>
1	-50.88 ± 3.69	-12.3	62.03
2	-44.23 ± 3.52	-11.1	11.09
3	-40.26 ± 3.46	-10.9	2.11
4	-38.08 ± 2.51	-11.1	2
5	-43.72 ± 3.36	-11.3	34.2
6	-50.65 ± 3.13	-11.2	195.76
7	-37.09 ± 3.83	-10.9	4.4
8	-38.98 ± 3.40	-10.8	8.44
9	-35.22 ± 3.95	-11.1	26.87
10	-39.03 ± 4.0	-10.9	53.55

Анализ полученных результатов

Для нативной формы был найден ингибитор под номером 7, оценка энергии связывания с помощью молекулярного моделирования которого меньше, чем у нилотиниба. Он также показывает неплохие результаты по докингу и NNScore2.0 в комплексе с нативной ТК. Но вот для мутантной формы он не подходит, т.к. его результаты по МД даже ниже, чем у нилотиниба, а по докингу он лучше, только одного лиганда. Также для нативной формы выделяются еще два лиганда 2 и 9, для 9, также как и в случае с 7 лигандом, показатели для мутантной формы по МД очень низки. А вот второй лиганд показал оценку энергии связывания с нативной формой сравнимую с нилотинибом, а с мутантной даже лучше.

Для мутантной формы показатели по МД ни у одного лиганда не были меньше, чем у эталонного AP24589. На фоне остальных выделились лиганды номер 1 и 6, но, к сожалению, их показатели в комплексе с нативной формой ниже среднего. Поэтому лиганд под номером 2 выглядит как наилучший для ингибирования обеих форм ТК из отобранных 10 соединений.

3.5 Анализ сайта связывания

Анализ межмолекулярных контактов для всех идентифицированных лигандов был осуществлён с помощью программы BINANA [28] реализации binana-1.3.0. Данный алгоритм предоставляет выходной log-файл, содержащий информацию о шести видах взаимодействий. Была написана программа на языке программирования Python, извлекающая необходимую информацию из данного log-файла и отображающая ее в нужном виде. С кодом программы можно ознакомиться по ссылке https://github.com/AnnaPotter/Binana_Log_File_Parser. Результаты представлены в таблицах 3.9 и 3.10 для нативной и мутантной форм, соответственно. При анализе результатов, представленных в данных таблицах, *стоит учесть следующие аспекты вывода*. В первом столбце описываются водородные связи, сначала идут атомы лиганда, затем атомы белка. Если атом белка принадлежит основной цепи, он обозначается знаком *, иначе **. При описании Ван-дер-Ваальсовых контактов указаны аминокислотные остатки Vcr-Abl ТК или его мутантной формы T315I, формирующие данные взаимодействия, в скобках указано количество реализуемых контактов. Для солевых мостиков (salt bridges), π - или T-стэкинга (π - π / T-stacking) указан аминокислотный остаток ТК, участвующий в этих взаимодействиях.

Из полученных для нативной формы ТК результатов (таблица 3.9) видно, что найденные соединения реализуют значительное количество гидрофобных контактов (Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий) с белком. Наиболее часто участвующие в данных взаимодействиях аминокислотные остатки: F382, L370, V256, A269 и Y253. Стоит отметить, что соединения, показавшие наименьшую оценку энергии, имеют больше гидрофобных взаимодействий нежели другие лиганды. Также все лиганды образуют водородные связи с белком-мишенью, а именно 2 — 7 образуют три водородные связи с остатками D381, E286, M318, лиганды 8, 9, 10 — две с E286, M318, и только лиганд 1 одну с D381. Возможно поэтому оценка его энергии связывания уступает почти всем остальным лигандам. Стоит отметить, что ни один лиганд не имеет водородной связи с T315, которая присутствует в комплексе нилотиниб-ТК, на что и была направлена фармакофорная модель, на основе которой осуществлялся поиск.

Все идентифицированные лиганды участвуют в T-стэкинге с аминокислотным остатком Y253, 1 лиганд имеет целых два взаимодействия такого типа. Также все лиганды за исключением 1, 4, 7 образуют π - π взаимодействия с остатком F315.

На рисунке 3.6 представлено трёхмерное расположение лигандов в активном сайте нативной формы ТК.

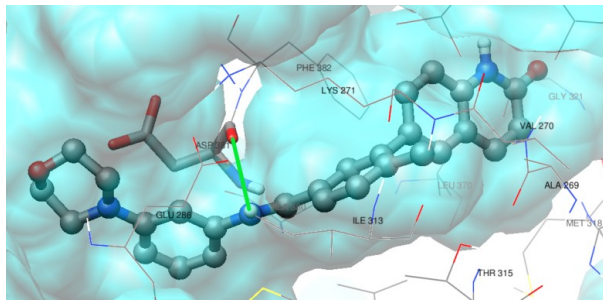
Таблица 3.9 — Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в структурных комплексах идентифицированных соединений с нативной формой ТК

Лиганд	Водородная связь	Ван-дер-Ваальсовы контакты	Солевые мостики и $\pi - \pi$ взаимодействия
1	O...*HN[D381]	V256(4), A269(5), V270(1), K271(3), T315(3), I313(1), M290(3), F382(9), Y253(2), L248(2), L370(5), D381(7), E286(3)	Y253(2) (T-stacking)
2	O...*HN[D381], NH...**O[E286], N...*HN[M318]	M290(1), D381(7), E286(1), I293(1), F359(1), H361(2), L298(1), V379(1), A380(4), F382(10), V256(3), A269(3), L248(2), L370(6), Y253(3), G321(1)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)
3	NH...**O[E286], O...*HN[D381], N...*HN[M318]	M290(3), D381(6), F359(3), E286(2), V256(7), F382(9), A269(2), Y253(4), L248(2), L370(6), G321(2)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)
4	NH...**O[E286], O...*HN[D381], N...*HN[M318]	M290(1), V299(1), D381(3), I293(1), F359(2), H361(1), A380(2), L298(1), F382(8), V256(4), K271(1), A269(3), L370(3), L248(3), G321(2), Y253(2)	Y253 (T-stacking)
5	NH...**O[E286], O...*HN[D381], N...*HN[M318]	M290(1), D381(4), F359(1), I293(1), V256(4), K271(1), F382(10), A269(2), L370(7), L248(2), G321(2), Y253(2)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)
6	NH...**O[E286], O...*HN[D381], N...*HN[M318]	M290(1), D381(4), F359(2), I293(2), L298(1), A380(1), F382(7), V256(4), K271(2), A269(2), L370(4), L248(2), G321(2), Y253(2)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)
7	O...*HN[D381], NH...**O[E286], N...*HN[M318]	L248(4), A269(2), F382(8), V256(4), Y253(8), M290(2), K271(3), T315(1), D381(4), L370(2), G321(3), F317(1), G249(1)	Y253 (T-stacking)
8	NH...**O[E286], N...*HN[M318]	M290(2), V299(2), F382(7), T315(2), D381(3), V289(2), I293(1), F359(3), E286(1), A269(2), L248(3), Y253(5), V256(2), F317(3), G321(1)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)
9	NH...**O[E286], N...*HN[M318]	V299(4), L370(1), A380(1), F382(9), T315(1), M290(2), D381(2), F359(3), V289(1), V256(4), A269(3), L248(3), Y253(4), F317(3), G321(1)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)
10	NH...**O[E286], N...*HN[M318]	T315(1), F382(9), M290(2), K271(1), V299(3), L370(1), A380(1), D381(2), V289(1), L248(2), A269(3), Y253(5), V256(4), F317(4), G321(1)	F317 (π - π stacking) Y253 (T-stacking)

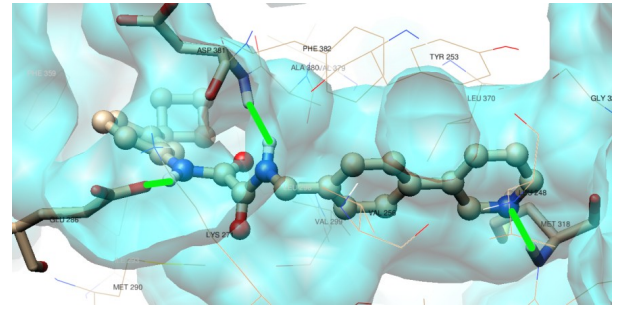
Таблица 3.10 — Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся в структурных комплексах идентифицированных соединений с мутантной формой (Т315I) ТК

Лиганд	Водородная связь	Ван-дер-Ваальсовы контакты	Солевые мостики и $\pi - \pi$ взаимодействия
1	O...*HN[D381]	A269(9), V270(2), K271(2), I315(7), I313(2), M290(1), F382(13), V256(4), L248(2), M318(2), L370(5), V299(2), A380(1), D381(4), E286(6)	F317 (π - π) F382 (T-stacking)
2	O...*HN[D381]	V299(2), E286(2), D381(4), A380(4), I293(2), L298(2), L354(2), H361(1), I315(5), F382(13), A269(6), V256(4), L248(5), L370(3), F317(3), G321(2)	F382 (T-stacking)
3	O...*HN[D381]	V299(2), D381(4), A380(2), E286(2), I315(6), F382(11), A269(6), L370(3), L248(5), V256(4), F317(3), G321(2)	F382 (T-stacking)
4	NH...**O[E286], O...*HN[D381]	M290(2), V299(2), A380(5), D381(4), H361(1), L298(1), V379(1), I315(4), F382(12), V256(5), K271(1), A269(6), L248(5), L370(3), G321(2), F317(3)	F317 (π - π) F382 (T-stacking)
5	O...*HN[D381]	M290(2), V299(2), D381(3), A380(3), V256(5), K271(1), I315(5), F382(12), A269(6), L248(5), L370(3), G321(2), F317(4)	F382 (T-stacking)
6	O...*HN[D381]	M290(2), V299(2), A380(4), D381(5), L298(1), I315(5), F382(13), V256(5), K271(1), A269(6), L370(3), L248(5), G321(2), F317(3)	F317 (π - π) F382 (T-stacking)
7	O...*HN[D381], N...*HN[G249]	L248(9), A269(6), L370(4), F382(12), I315(6), V256(3), M290(1), K271(1), V299(2), A380(1), D381(2), F317(1), G321(1)	F382 (T-stacking)
8	NH...**O[E286], NH...**O[E286], N...**HN[K285]	D381(3), V289(4), K271(3), F382(4), M290(1), I313(3), I315(4), A269(1), F359(4)	
9	NH...**O[E286], O...*HN[D381]	A380(1), D381(3), V289(4), V299(1), F382(3), K271(2), I315(5), A269(2), F359(4), I293(1), K285(1)	
10	NH...**O[E286], O...*HN[D381]	D381(5), A380(3), F382(3), A269(3), I315(1), K271(1), V289(3), F359(4), I293(1), L354(1), K285(1)	

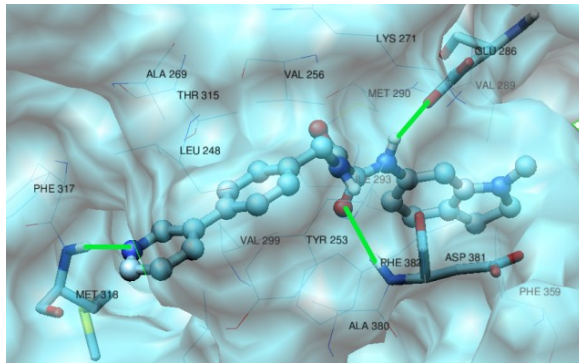
Из полученных для мутантной формы ТК результатов видно, что найденные соединения, также как и для нативной, формы реализуют значительное количество гидрофобных контактов с белком. F382, D381, A269 являются наиболее часто встречающимися в данных взаимодействиях аминокислотными остатками. Все лиганды образуют водородные связи с белком-мишенью, а именно, лиганд под номером 8 единственный образует три водородные связи с остатками две с E286 и одну с K285, лиганды 4, 7, 9, 10 — две, и 1, 2, 3, 5, 6 — одну с D381. Первые семь лигандов участвуют в Т-стэкинге с аминокислотным остатком F382, и 1, 4, 6 помимо этого образуют π - π взаимодействия с остатком F317.



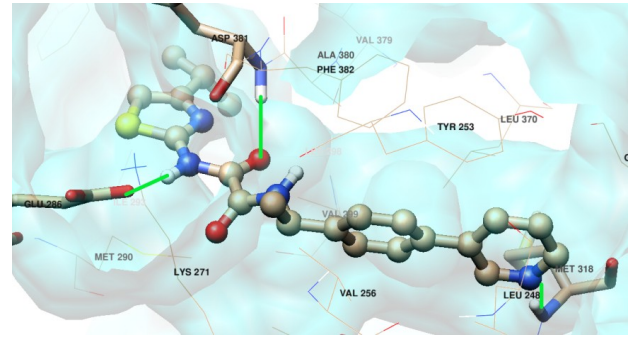
1



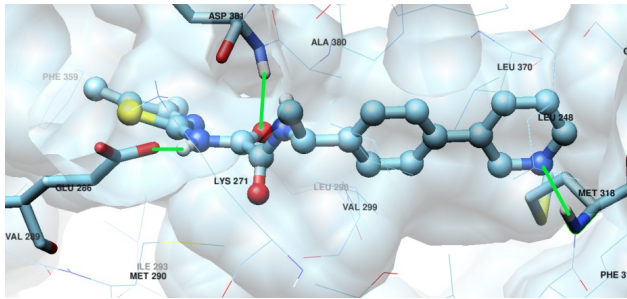
2



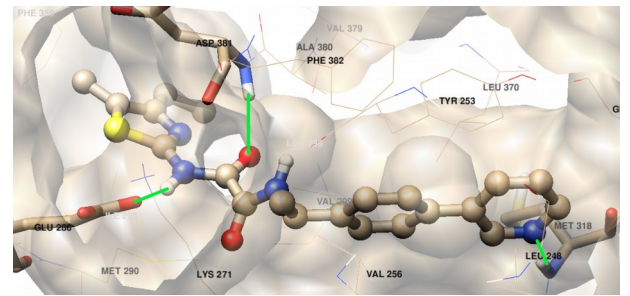
3



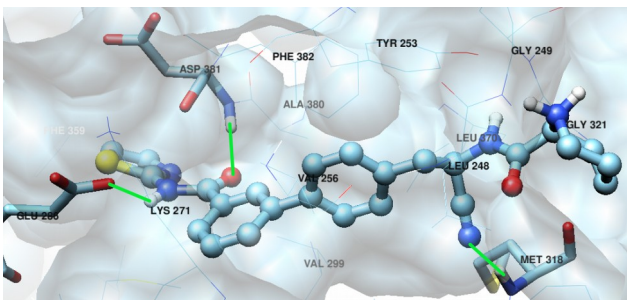
4



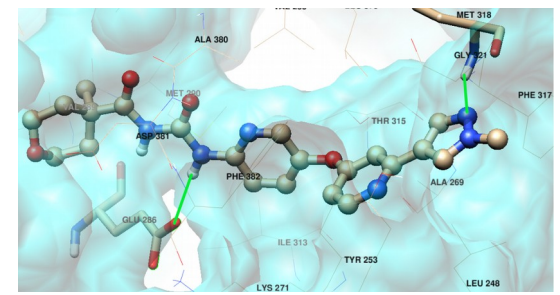
5



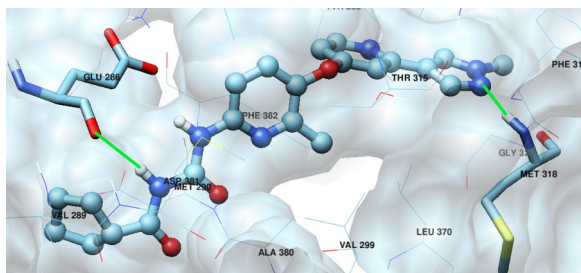
6



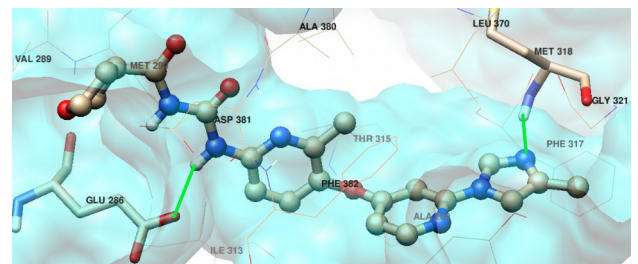
7



8



9



10

Рисунок 3.6 — трёхмерное расположение идентифицированных лигандов в сайте связывания нативной формы ТК

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной дипломной работе было выполнено следующее:

1) Изучены известные данные о структуре комплекса Vcr-Abl ТК / нилотиниб, а также различные инструменты компьютерного моделирования лекарств.

2) Составлены фармакофорные модели на основе взаимодействия известного ингибитора нилотиниба с Vcr-Abl ТК.

3) Проведён виртуальный скрининг на основе полученных фармакофорных моделей по 8 БД химических соединений, в результате которого идентифицировано 55618 соединений.

4) Для 32807 из идентифицированных соединений проведен молекулярный докинг с нативной и мутантной (T315I) формами ТК для оценки аффинности связывания.

5) Выполнена оценка константы диссоциации с помощью нейросетевой скоринговой функции NNScore2.0 для 100 комплексов, образованных наилучшими соединениями по результатам докинга для нативной и мутантной форм ТК. На основании полученных на данном этапе и этапе 4 результатов отобраны 10 потенциальных ингибиторов.

6) Выполнено МД моделирование взаимодействия идентифицированных соединений с обеими формами ТК с помощью пакета программ Amber. На основе данного моделирования посчитана энергия связывания лиганда с белком (без учета энтропийного вклада).

7) Проведен анализ профиля связывания потенциальных ингибиторов с обеими формами ТК.

По итогам данной работы, с учётом оценки энергии связывания, полученной с помощью МД, из 10 наилучших идентифицированных соединений было решено выделить три потенциальных ингибитора для нативной формы, два для мутантной, а также было найдено одно соединение, которое с большой вероятностью будет ингибировать обе формы ТК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) Зефиоров Н.С., О.Н. Зефирова Рациональный дизайн лекарств // Идеи и новации, 2015 №3 с. 80-85
- 2) Young D.C. Computational drug design: a guide for computational and medicinal chemists. Wiley-Interscience; 2009
- 3) Sabitha K. Nilotinib based pharmacophore models for BCRABL. Bioinformation. 2012;8(14):658-663.
- 4) Rossari, F., Minutolo, F., & Orciuolo, E. (2018). Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. Journal of Hematology & Oncology, 11(1).
- 5) Silverman, R. B., & Holladay, M. W. (2015). The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action: Third Edition.
- 6) Yang, S.-Y. (2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. Drug Discovery Today, 15(11-12), 444–450.
- 7) Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2010). NNScore: A Neural-Network-Based Scoring Function for the Characterization of Protein–Ligand Complexes. Journal of Chemical Information and Modeling, 50(10), 1865–1871.
- 8) Jacob D. Durrant and J. Andrew McCammon. Nnscore 2.0: A neural network receptor–ligand scoring function. Journal of Chemical Information and Modeling, 51(11):2897–2903, 2011.
- 9) Weisberg, E., Manley, P., Mestan, J. et al. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. Br J Cancer 94, 1765–1769 (2006).
- 10) Shukla S, Kouanda A, Silverton L, Talele TT, Ambudkar SV. Pharmacophore modeling of nilotinib as an inhibitor of ATP-binding cassette drug transporters and BCR-ABL kinase using a three-dimensional quantitative structure-activity relationship approach. Mol Pharm. 2014;11(7):2313-2322.
- 11) Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera — A visualization system for exploratory research and analysis. Journal of Computational Chemistry, 25(13), 1605–1612.
- 12) Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. Nucleic Acids Research, 37(Database), D387–D392.

- 13) Sunseri, J., & Koes, D. R. (2016). Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W442–W448.
- 14) Open Babel: An Open chemical toolbox / N.M. O’Boyle [et al.] // *J. Cheminform.* – 2011. – Vol. 3, No 10;
- 15) Hassan, N. M., Alhossary, A. A., Mu, Y., & Kwoh, C.-K. (2017). Protein-Ligand Blind Docking Using QuickVina-W With Inter-Process Spatio-Temporal Integration. *Scientific Reports*, 7(1).
- 16) Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143.
- 17) D.A. Case, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York and P.A. Kollman (2020), AMBER 2020, University of California, San Francisco.
- 18) Sprenger, K.G. The general AMBER force field (GAFF) can accurately predict thermodynamic and transport properties of many ionic liquids / K.G. Sprenger, V.W. Jaeger, J. Pfaendtner // *J. Phys. Chem. B.* – 2015. – Vol. 119, No 18. – P. 5882-5895;
- 19) ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB / J.A. Maier [et al.] // *J. Chem. Theory Comput.* – 2015. – Vol. 11, No 8. – P. 3696-3713;
- 20) Schmit, J. D., Kariyawasam, N. L., Needham, V., & Smith, P. E. (2018). SLTCAP: A Simple Method for Calculating the Number of Ions Needed for MD Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(4), 1823–1827.
- 21) Machado, M. R., & Pantano, S. (2020). Split the Charge Difference in Two! a Rule of Thumb for Adding Proper Amounts of Ions in MD Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*.
- 22) Gasteiger, J. Iterative partial equalization of orbital electronegativity — a rapid access to atomic charges / J. Gasteiger, M. Marsili // *Tetrahedron.* – 1980. – Vol. 36, No 22. – P. 3219-3228;

23) Toukmaji, A., Sagui, C., Board, J., & Darden, T. (2000). Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions. *The Journal of Chemical Physics*, 113(24), 10913–10927.

24) Miller, B. R., McGee, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3314–3321

25) Rastelli, G., Rio, A. D., Degliesposti, G., & Sgobba, M. (2009). Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. *Journal of Computational Chemistry*, 2010. – Vol. 31, No 4. – P. 797-810;

26) Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3–26.

27) Идентификация потенциальных ингибиторов коронавируса SARS-CoV-2 методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования / А. М. Андрианов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, No 3. – С. 308–316.

28) Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 29(6), 888–893.

29) Gelpi, J., Hospital, A., Goñi, R., & Orozco, M. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 37.

30) Huang, Z. Drug discovery research : new frontiers in the post-genomic era / Z. Huang. – Wiley-Interscience, 2007. – 521 p.;

31) Chen, J. *Molecular Modeling: Principles and Applications* By Andrew R. Leach. Addison Wesley Longman Limited: Essex, England, 1996. 595 pp. ISBN 0-582-23933-8. / J. Chen, K.N. Houk // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1998. – Vol. 38, No 5. – P. 939-939;

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ФАЙЛЫ С ИСХОДНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ ДЛЯ ЭТАПОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

1) Этап минимизации комплекса

```
&cntrl
imin=1,
maxcyc=2000,
ncyc=500, cut=8.0,
ntb=1, ntc=2, ntf=2,
ntpr=10,
ntwx=100,

ntr=1,
restraintmask=': 1-268',
restraint_wt=1.0
/
```

2) Этап нагрева

```
&cntrl
imin=0,
irest=0, ntx=1,
nstlim=700000, dt=0.002,
ntc=2, ntf=2,
cut=8.0, ntb=1,
ntpr=100,
ntwx=5000,
ntt=3,
gamma_ln=2.0,
ig=-1,
temp0=310.0,
temp1=0.0,
ntr=1,
restraintmask='@CA,C,O,N',
restraint_wt=1.0,
nmropt=1,
/
&wt TYPE='TEMP0', istep1=0,
istep2=700000,
value1=0.1, value2=310.0,
/
```

3) Этап уравнивания с ограничениями

```
&cntrl
imin=0, irest=1, ntx=5,
nstlim=1000000, dt=0.001,
ntc=2, ntf=2,
cut=8.0, ntb=2,
ntp=1, taup=2.0,
ntpr=200, ntwx=5000,
ntt=3, gamma_ln=2.0,
temp0=310.0,
ntr=1,
restraintmask=':@CA,C,O,N',
restraint_wt=1.0,
/
```

4) Этап уравнивания без ограничений

```
&cntrl
imin=0, irest=1, ntx=5,
nstlim=1000000, dt=0.001,
ntc=2, ntf=2,
cut=8.0, ntb=2, ntp=1, taup=2.0,
ntpr=200, ntwx=5000,
ntt=3, gamma_ln=2.0,
temp0=310.0,
/
```

5) Этап динамики

```
&cntrl
imin=0, irest=1, ntx=5,
nstlim=15000000, dt=0.002,
ntc=2, ntf=2,
cut=8.0, ntb=2, ntp=1, taup=2.0,
ntpr=5000, ntwx=6000,
ntt=3, gamma_ln=2.0,
temp0=310.0,
/
```