

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. Каразіна

Кафедра органічної хімії

УДК: 675.043.44

До захисту допускаю

_____ Завідувач кафедри

«___» _____ 2024 р. д.х.н., проф. А. О. Дорошенко

ПОШУК НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ТКВ-ДОМЕНУ УБКВІТИН-ЛІГАЗИ СBL-B

Кваліфікаційна робота магістра
II курсу хімічного факультету
Ольги СЕМЕНЕНКО

Науковий керівник
д.х.н., с.н.с.

Олександр КИРИЧЕНКО

Харків – 2024

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається з 36 сторінок, 20 рисунків, 5 таблиць і 42 літературних джерел.

Об'єкт дослідження: убіквітин-лігаза E3 типу Cbl-b.

Мета роботи: ознайомитись зі структурою та функціями лігази Cbl-b і її доступними інгібіторами, а також за допомогою розрахункових методів передбачити сполуки, які будуть зв'язуватись з доменом Cbl-b.

Методи дослідження: молекулярний докінг методом пошуку сполук V-SYNTHES у надвеликих бібліотеках.

Актуальність роботи: зараз існує підвищена потреба в розробці нових лікарських препаратів, особливо для хвороб, які не піддаються ефективному лікуванню за допомогою існуючих методів. Виявлення нових інгібіторів для убіквітин-лігази Cbl-b може відкрити нові можливості у терапії різних захворювань, включаючи аутоімунні порушення та рак.

У роботі за допомогою методу V-SYNTHES на основі синтонів зроблено скринінг віртуальної бібліотеки сполук Enamine xREAL Space. За результатами докінгу проаналізовано взаємодію лігандів з рецептором і обрано 69 сполук для експериментального підтвердження зв'язування. Для сполуки кандидата, яка проявила активність до обраної цілі, досліджено взаємодію з амінокислотними залишками лігази Cbl-b.

Ключові слова: CBLB, ICM-PRO, МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ, ІНГІБІТОРИ CBLB, КРИСТАЛ 8GCU, ВЗАЄМОДІЯ БЛОК-ЛІГАНД, САЙТ ЗВ'ЯЗУВАННЯ, V-SYNTHES, СКРИНІНГ

ABSTRACT

The qualification work consists of 36 pages, 20 figures, 5 tables and 42 literary sources.

Research object: ubiquitin-ligase E3 type Cbl-b.

The aim of the work: To overview, the structure and functions of Cbl-b ligase and its available inhibitors, as well as to predict compounds that will bind to the Cbl-b domain using computational methods.

Research methods: molecular docking by the V-SYNTHES compound search method in ultra-large libraries.

Relevance of the work: there now is an increased need for the development of new drugs, especially for diseases that cannot be effectively treated with existing methods. The discovery of new inhibitors for the ubiquitin-ligase Cbl-b may open up new opportunities in the treatment of various diseases, including autoimmune disorders and cancer.

Screening of the Enamine xREAL Space virtual library of compounds was performed using the synthon-based V-SYNTHES method. According to the results of docking, the interaction of ligands with the receptor was analyzed and 69 compounds were selected for experimental confirmation of binding. For the candidate compound, which showed activity against the selected target, the interaction with the amino acid residues of the Cbl-b ligase was investigated.

Key words: CBLB, ICM-PRO, MOLECULAR DOCKING, CBLB INHIBITORS, 8GCY CRYSTAL, PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS, BINDING SITE, V-SYNTHES, SCREENING

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	6
1.1 Структура та функції Cbl-b.....	6
1.1.1 Функції Cbl-b.....	6
1.1.2 Структура Cbl-b.....	7
1.2 Відомі інгібітори Cbl-b.....	10
1.3 Програмне забезпечення.....	13
1.3.1 Molsoft ICM.....	13
1.4 Доступні скринінгові колекції.....	14
1.5 V-SYNTHESIS.....	16
2 ЕКСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	19
2.1 Вибір моделі для віртуального скринінгу.....	19
2.2 V-SYNTHESIS.....	23
2.2.1 Докінг MEL.....	23
2.2.2 Докінг проенумерованої бібліотеки.....	27
2.3 Експериментальне підтвердження зв'язування.....	29
2.3.1 Взаємодія сполуки кандидата з лігазою Cbl-b.....	30
ВИСНОВКИ.....	32
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	33

ВСТУП

В сучасному світі біомедичних досліджень і розробки лікарських препаратів пошук нових потенційних мішеней для терапевтичної стратегії є важливим завданням, спрямованим на вдосконалення методів лікування та пошуку нових способів подолання різних захворювань. В останні роки однією з таких цілей до якої почали проявляти значний інтерес є білок Cbl-b, багатофункціональний регулятор клітинних процесів та імунних реакцій. Кваліфікаційна робота присвячена пошуку нових сполук, які можуть зв'язуватись з ТКВ доменом убіквітин-лігази Cbl-b за допомогою молекулярного докінгу, з метою розробки нових інгібіторів, що можуть бути використані для лікування різних захворювань, включаючи ракові пухлини.

Cbl-b – це найбільш вивчена багатофункціональна убіквітин-лігаза E3 з сімейства Cbl білків. Cbl-b діє як негативний регулятор у сигнальних шляхах, які включають Т-клітинні рецептори, В-клітинні рецептори, лектинові рецептори С-типу, і модулюють вроджені та адаптивні імунні відповіді [1]. Участь лігази в регуляції Т-клітин, активність яких впливає на лікування ракових клітин, підкреслює важливість інгібування обраного нами рецептору.

Мета даного дослідження розкрити потенціал віртуального скринінгу надвеликих бібліотек сполук за допомогою молекулярного докінгу та знайти нові каркаси структур, що будуть проявляти активність до лігази E3 Cbl-b. Ми прагнемо прискорити процес відкриття ліків з використанням розрахункових методів, які в порівнянні з високопродуктивним скринінгом сполук потребують менших фінансових та людських ресурсів.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Структура та функції Cbl-b

Cbl-b (протоонкоген b лімфоми В-лінії Касітаса) – це убіквітин-лігаза E3 типу, є найбільш вивченим членом сімейства білків Cbl в імунній системі. Вона добре зберігається від нематод до людини, що підкреслює її фундаментальну роль в імунній регуляції. Спочатку характеризувалась як протоонкоген, але тепер вважається, що вона відіграє центральну роль у регуляції функцій Т-клітин. Cbl-b було ідентифіковано як ключовий інгібітор активації Т-клітин за відсутності костимуляції CD28 [2]. У Т-клітинах Cbl-b знаходиться в цитоплазмі, але може бути переміщена до плазматичної мембрани при стимуляції TCR [3].

1.1.1 Функції Cbl-b

Уюбіквітинування - це процес приєднання хімічного маркера, відомого як убіквітин, до білків, що призводить до їх розкладання в клітині. Марковані убіквітином білки направляються до структури, відомої як протеасома, яка є клітинним “центром переробки”. Там вони піддаються розщепленню на компоненти.

Убіквітин-протеїнова лігазна система складається з 3 класів ферментів, відомих як убіквітин-активуєчі ферменти (E1), убіквітин-кон'югуючі ферменти (E2) і убіквітин-протеїнові лігази (E3). Реакція убіквітинування ініціюється, коли 76-амінокислота убіквітину активується E1. Тіоефірний зв'язок утворюється між активним залишком цистеїну E1 і С-кінцем убіквітину в АТФ-залежній реакції. Після активації убіквітину, активований убіквітин переноситься на E2 в іншій АТФ-залежній реакції. Як убіквітин-протеїнова лігаза E3, Cbl-b переносить убіквітин від специфічного E2 до ϵ -аміногрупи залишку лізину (K) на білковому субстраті. Доля міченого субстрату залежить від кількості доданих молекул убіквітину (моноубіквітин проти поліубіквітину), а також від залишку лізину, який бере участь у формуванні ланцюгів поліубіквітинування (Рисунок 1.1) [3-5]. На відміну від лігаз E1 та E2, убіквітинлігаза E3 має велику та різноманітну надродину, що забезпечує високий рівень контролю над механізмом убіквітинування [6].

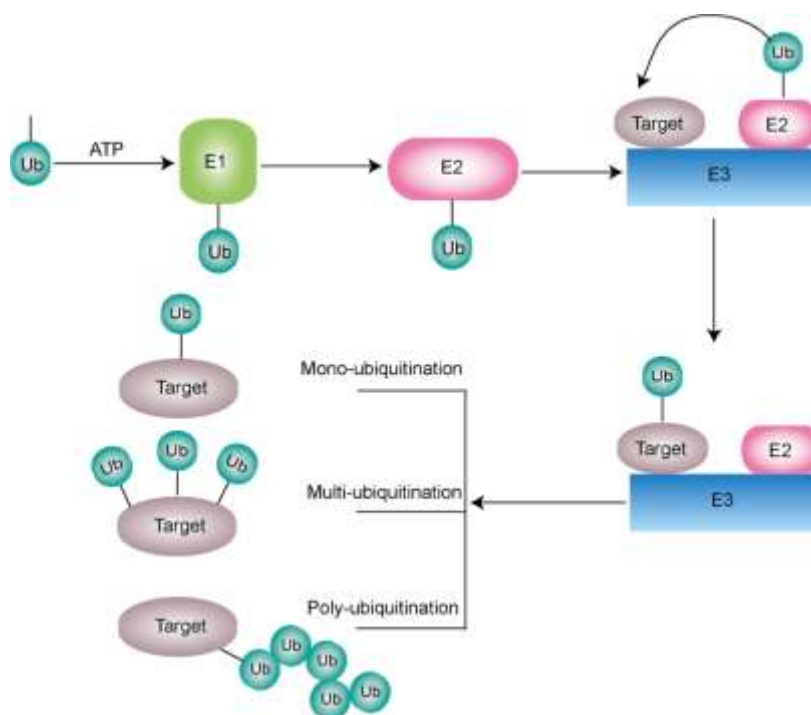


Рисунок 1.1 - Схема процесу убіквітинування [5].

Механізм дії Cbl-b полягає у націлюванні на активовані рецептори або сигнальні молекули для процесу убіквітинування, позначаючи їх для деградації. Цей процес має вирішальне значення для встановлення порогу активації Т-клітин. Активність Cbl-b не обмежується адаптивною імунною системою; лігаза також впливає на вроджений імунітет, регулюючи відповіді клітин, таких як макрофаги, дендритні клітини, клітини-кілери (NK-клітини) на різні подразники. Ця широка регуляторна роль підкреслює його потенціал як мішені в імунотерапії, наприклад при аутоімунитеті та раку [1].

В особливості роль Cbl-b стає цікавою в лікуванні ракових пухлин оскільки цей білок може контролювати поріг для активації Т-клітин. При підвищеній активності рецептора він негативно регулює активацію Т-клітин через залучення специфічних білків до деградації. При інгібуванні Cbl-b, навпаки, відбувається активація Т-клітин, що сприяє імунній відповіді проти пухлин.

1.1.2 Структура Cbl-b

Убіквітинові лігази E3 діляться на дві основні групи: лігази домену HECT отримують убіквітин від ферменту E2 і переносять його на зв'язаний субстрат, тоді як лігази RING-типу розташовують комплекс E2-убіквітин біля субстратного білка, щоб полегшити перенесення убіквітину [7, 8].

Сімейство Cbl лігаз E3 має спільну висококонсервативну N-кінцеву ділянку, яка містить структурні елементи, необхідні для активності убіквітинлігази, включаючи домен розпізнавання тирозинкінази (tyrosine kinase-binding domain – TKBD), ділянку короткої спіралі лінкера (short linker helix region – LHR) і RING домен. Домен ТКВ складається з трьох субдоменів, 4-спірального пучка (4-helix bundle – 4H), кальцій-зв'язуючого домену з EF-рукою (calcium binding domain with an EF-hand fold – EF-hand) та варіантного домену Src гомологічної області 2 (variant Src homology region 2 – SH2).

LHR складається з трьох частин: N-кінцевої петлі, спіралі і С-кінцевої петлі. Ця ділянка містить залишок тирозину (Tyr363 у Cbl-b), що відіграє важливу роль у регуляції активності лігази. Фосфорилювання цього критичного тирозину активує білки сімейства Cbl, оскільки його мутація на фенілаланін скасовує активність лігази E3.

С-кінець складається з ділянки, багатой на пролін (PRR), яка взаємодіє з білками, що містять домен SH3. Також є ділянка, багата на тирозин, яка після фосфорилювання може залучати білки з доменом SH2, та домен, пов'язаний з убіквітином (Рисунок 1.2, Рисунок 1.3) [9].

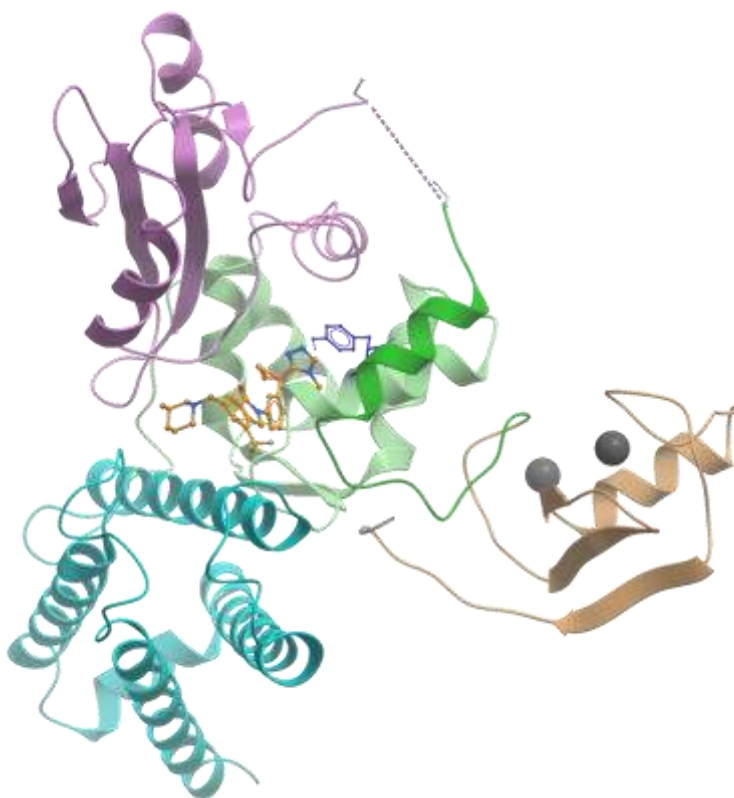


Рисунок 1.2 - Структура Cbl-b: бірюзовим кольором позначено 4H субдомен, світло зеленим – EF-hand субдомен, фіолетовим – SH2 субдомен, зеленим – лінкерна спіраль LHR, помаранчевим – RING домен.

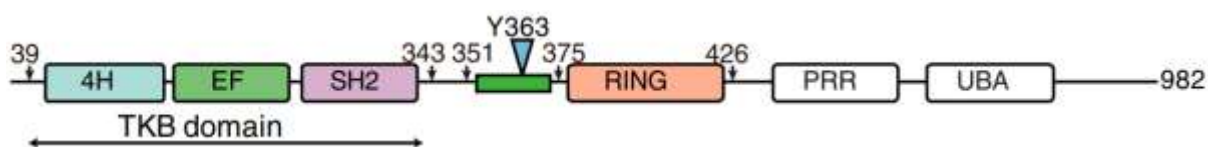


Рисунок 1.3 - Схематичне зображення структури Cbl-b [10].

У нефосфорильованому стані білки Cbl автоінгібуються через взаємодію TKBD із тирозином і декількома іншими залишками всередині лінкерної спіралі, що призводить до того, що домен RING обмежений стороною TKBD, протилежною до сайту зв'язування субстрату. RING-домен може бути або в закритій конформації, нездатній зв'язувати E2, або у відкритій активній конформації, спричиненій зв'язуванням субстрату, що дозволяє взаємодію з білками E2 (Рисунок 1.4). Коли відбувається процес фосфорилування, зв'язок між TKBD і LHR послаблюється, що дозволяє лігазі зазнавати конформаційних змін в результаті яких білок переходить в активний стан (Рисунок 1.5). Процес активації включає:

- відокремлення домену RING від TKBD;
- поворот домену RING на 180 градусів, щоб він розташувався поруч із місцем зв'язування субстрату на TKBD;
- взаємодію фосфорильованого тирозину в LHR із доменом RING, що стабілізує комплекс E2-Ub під час перенесення убіквітину [10-13].

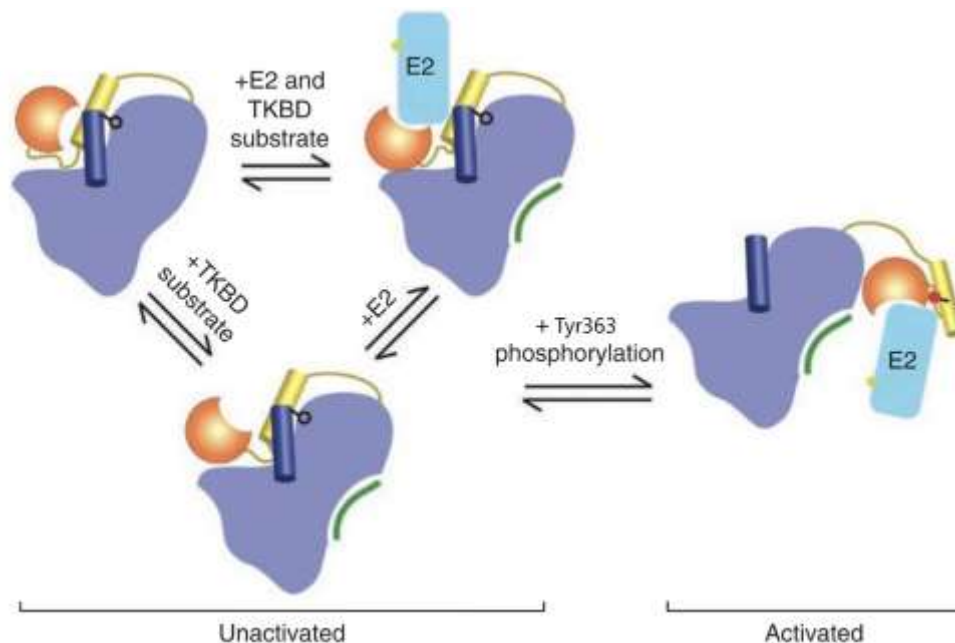


Рисунок 1.4 - Схематичне зображення неактивної та активної конформації Cbl-b [11].



Рисунок 1.5 - Накладання відкритої конформації Cbl-b (бірюзовий колір) та закритої (синій колір), помаранчевим кольором виділено Y363, жовтим кольором позначено інгібітор.

Через N-кінцевий ТКВ і RING домен Cbl-b регулює передачу сигналів і деградацію білків. Домен ТКВ розпізнає білки-мішені для кон'югації з убіквітином, тоді як домен RING залучає фермент, що кон'югує убіквітин (E2) [14,15].

1.2 Відомі інгібітори Cbl-b

За допомогою високопродуктивного скринінгу в компанії Nurix Therapeutics Inc було виявлено та розроблено серію сполук на основі триазолу зі значеннями IC₅₀ від наномолярних до низьких мікромольних діапазонів. Ці сполуки спрямовані на активність лігази E3 Cbl-b, зокрема молекула Nx-1607 [16], яка зараз проходить клінічні випробування як імунотерапевтичний препарат для лікування твердих злоякісних пухлин.

Дослідження показали, що ці сполуки інгібують взаємодію між N-кінцевим фрагментом Cbl-b (комплексу ТКБД-LHR-RING) та комплексом UbcH5B-Ub (E2-Ub), за присутності субстрату кінази Src. Це призводить до стимуляції імунних клітин *in vitro* та значного інгібування росту пухлин *in vivo*. Одну із представлених сполук C7683 було закристалізовано з білком та досліджено їх взаємодію.

C7683 взаємодіє з трьома субдоменами ТКБД та LHR (Рисунок 1.6), що відповідає біофізичним дослідженням, які показали, що зв'язування сполуки не включає домен RING. C7683 взаємодіє із залишками всіх трьох субдоменів ТКБД, LHR і координує сусідню

молекулу води. Метилзаміщене піперидинове кільце розташовується в просторі між субдоменами 4H і SH2, встановлюючи гідрофобні та ван-дер-ваальсові контакти з Cys289, Thr265, Pro71 і Pro72, а також утворюючи водневий зв'язок між атомом азоту та киснем бічного ланцюга Glu268 в домені SH2.

Кільце ізоіндолін-1-он також розташоване між субдоменами 4H і SH2, створюючи гідрофобні взаємодії з Thr144, Lys145, Leu148 в 4H-домені та Leu264 в SH2-домені. Водневий зв'язок утворюються між киснем ізоіндолін-1-ону і залишком Phe263 в SH2-домені.

Фенільне кільце розташоване між бічними ланцюгами Leu222 у SH2 домені і Met366 у LHR. Триазольне кільце переважно взаємодіє з SH2 і LHR; воно утворює два водневі зв'язки з киснем бічного ланцюга Tyr260 і сусідньою молекулою води. Кільце також бере участь у взаємодії π - π стекингу з кільцем бічного ланцюга Tyr363 у LHR, який відіграє вирішальну роль у регуляції активності лігази [9].

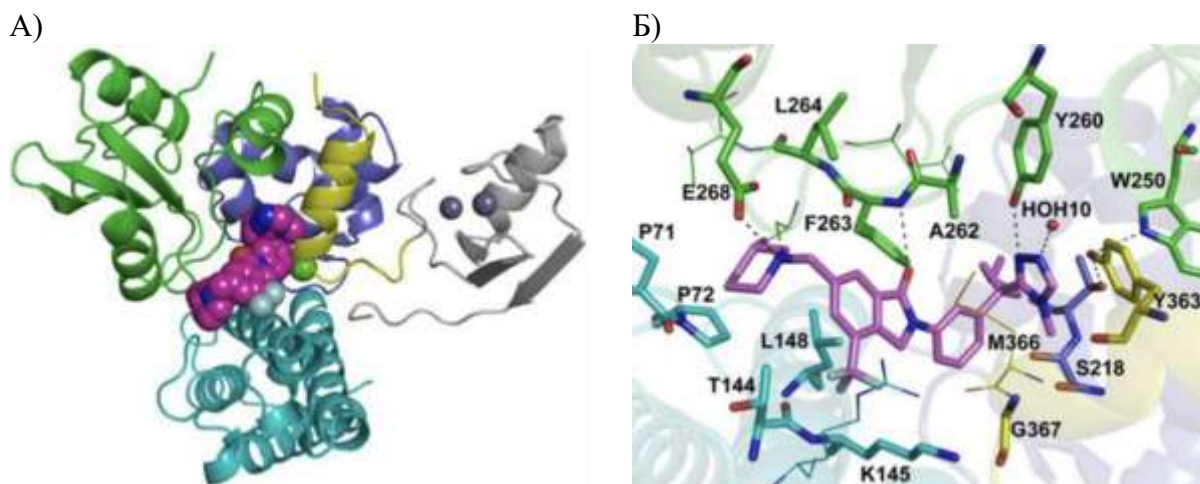


Рисунок 1.6 - Рентгенівська кристалічна структура N-кінцевого фрагмента Cbl-b, зв'язаного з C7683. (А) Розташування сполуки в Cbl-b, сполуку зображено пурпуровими сферами. (Б) Вид зблизька сайту зв'язування C7683. C7683 утворює взаємодії з молекулою води (червона сфера), трьома субдоменами ТКБД і LHR. Водневі зв'язки показані чорними штрихами. Сполука показана пурпуровими паличками, а ключові амінокислотні залишки відображені зеленими, жовтими та синіми паличками [9].

Кокристалічна структура комплексу Cbl-b-C7683 показала, що білок перебуває у неактивній конформації з LHR, яка розташована між субдоменами ТКБД і доменом RING, що обмежує можливість зв'язування рецептора з E2 лігазою. На Рисунку 1.7 порівнюється структура Cbl-b-C7683 з активними та неактивними конформаціями білків сімейства Cbl. У структурах домен RING приймає різне положення та орієнтацію. У порівнянні з неактивною структурою c-Cbl (PDB ID: 2Y1M), домен RING у Cbl-b-C7683 має частково

відкрити орієнтацію, в якій деякі залишки (Ile375, Trp399, Phe418) взаємодіють із ТКБД у закритій конформації Cbl. Однак, враховуючи його орієнтацію і близькість до ТКБД/LHR, домен RING у Cbl-b-C7683 не може зв'язуватися з E2 лігазою, тому вважається, що він перебуває в закритій неактивній конформації.

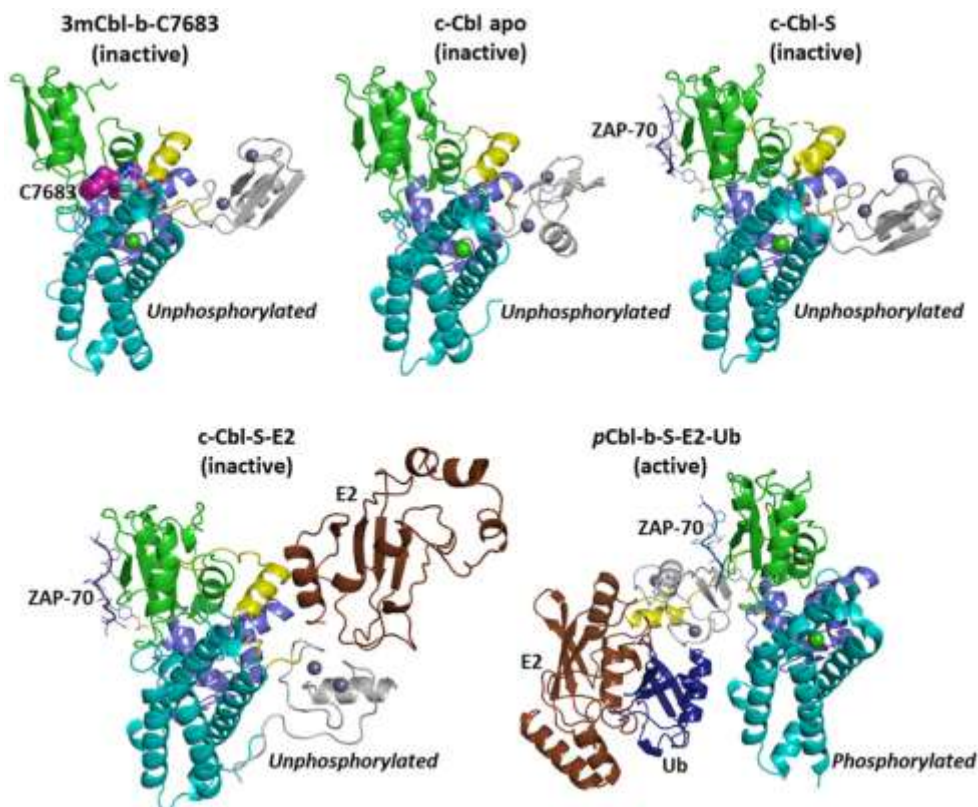


Рисунок 1.7 - Порівняння структури Cbl-b-7683 з (1), структурою c-Cbl apo (PDB ID: 2Y1M), (2), c-Cbl у комплексі з субстратним пептидом ZAP-70 (c- Cbl-S) (PDB ID: 2Y1N), (3) c-Cbl у комплексі з пептидом ZAP-70 та лігазою UbcH7 E2 (c-Cbl-S-E2) (PDB ID: 1FBV) та (4) pTyr363 Cbl-l у комплексі з пептидом ZAP-70, лігазою UbcH5B E2 та убіквітином (pCbl-b-S-E2-Ub) (PDB ID: 3ZNI). Сполука C7683 показана у вигляді пурпурових сфер, пептид ZAP-70 зображено як синя петля та палички, лігази E2 зображені коричневим кольором, а убіквітин відображено синім кольором [9].

Як вже було згадано, C7683 взаємодіє з LHR, через залишки, включаючи Met366 і Tyr363. Активація Cbl-b залежить від фосфорилювання Tyr363, що звільняє LHR від взаємодії з ТКБД, дозволяючи білку зазнавати великих конформаційних змін, які сприяють активності лігази.

Порівняння структури Cbl-b-C7683 з неактивною, незв'язаною структурою Cbl-b (PDB ID: 3VGO) показує, що взаємодія між ТКБД і LHR залишається незмінною під час зв'язування C7683. У зв'язаних із субстратом та активних формах білків Cbl (PDB ID: 2Y1N, PDB ID: 1FBV та PDB ID: 3ZNI), петля SH2-домену, що містить Phe263 зміщується

приблизно на 4 Å після зв'язування субстрату та фосфорилування тирозину. C7683 встановлює кілька контактів із цією петлею і заповнює прогалину в TKBD, яка в іншому випадку була б зайнята петлею SH2 після зв'язування субстрату та фосфорилування Tyr363. Таким чином, C7683 не лише запобігає фосфорилуванню Tyr363, необхідному для активації Cbl-b, але також блокує конформаційні зміни в результаті зв'язування субстрату з доменом TKBD Cbl-b [9].

Також повідомлялось про декілька класів сполук з природних продуктів, але вони показали слабкі інгібіторні властивості і подальших досліджень з ними не проводилось [17-20].

1.3 Програмне забезпечення

Молекулярний докінг – це комп'ютерний метод, який з кожним роком стає все більш популярним для вивчення взаємодії лігандів і білків, з метою передбачення оптимального способу зв'язування сполук з кристалічною (або згенерованою) структурою білка. Цей підхід дозволяє змодельовати можливі зв'язки між молекулами, наприклад, водневі зв'язки, гідрофобні та ван-дер-ваальсові взаємодії та оцінити стабільність утвореного комплексу.

Молекулярний докінг можна використовувати для віртуального скринінгу великих бібліотек речовин. Цей метод дозволяє швидко та ефективно знаходити найперспективніших кандидатів для досліджень серед тисячі сполук або навіть мільйонів, якщо для цього є відповідні комп'ютерні ресурси.

Цей підхід відіграє важливу роль в розробці нових лікарських засобів, оскільки дозволяє визначити та проаналізувати ключові взаємодії, які можуть впливати на ефективність майбутніх препаратів.

1.3.1 Molsoft ICM

Метод внутрішньої механіки координат (ICM) є добре визнаним та ретельно перевіреним підходом у галузі біоінформатики та пошуку нових лікарських засобів. Як показали численні дослідження, ICM не лише ефективно відтворює важливі взаємодії між білками та лігандами, але й успішно виявляє ліганди з високою аффіністю до ключових класів мішеней при розробці нових інгібіторів [21-26].

Докінг лігандів із програмним забезпеченням ICM використовує моделювання Монте-Карло для глобальної оптимізації набору внутрішніх координат лігандів у просторі карт потенційних сіток, розрахованих для білкової кишені.

Адаптивний алгоритм використовується для визначення максимальної кількості кроків відповідно до кількості поворотних зв'язків у ліганді, помноженої на визначене

користувачем значення ретельності. Значення ретельності представляє визначений користувачем множник, за допомогою якого автоматично визначена довжина циклу Монте-Карло розширюється. Відбір зразків лігандів у наборі попередньо розрахованих сіткових карт, що враховують потенціал водневих зв'язків, потенціал ван-дер-ваальса, гідрофобний потенціал і електростатичний потенціал, значно скорочує час, необхідний для розрахунку. Карти генеруються в прямокутній коробці з інтервалом сітки 0,5 Å з центром у місці зв'язування ліганду. Кожна молекула спочатку піддається конформаційному аналізу за межами білкової кишені. Режими зв'язування лігандів оцінюються відповідно до якості комплексу [27,28].

1.4 Доступні скринінгові колекції

У розробці лікарських засобів традиційний підхід до визначення провідних кандидатів передбачає високопродуктивне тестування *in vitro* великих бібліотек сполук. Спочатку дослідження були зосереджені на фізично існуючих бібліотеках, але з часом хіміки-медики перейшли до бібліотек віртуальних сполук. Віртуальний скринінг цих бібліотек зменшує час та підвищує економічну ефективність шляхом звуження потенційних провідних кандидатів для синтезу та експериментального тестування. Протягом останніх двох десятиліть віртуальні колекції комбінаторних сполук, так звані хімічні простори, стали важливим джерелом молекул для фармацевтичних досліджень у всьому світі.

Простори комбінаторних фрагментів пропонують альтернативу, використовуючи реакції та будівельні блоки для опису величезного хімічного простору продуктів. Нещодавнє розширення колекцій комбінаторних сполук дозволило вченим досліджувати хімічні простори, що містять мільярди молекул.

Деякі постачальники, такі як Enamine, опублікували доступні для завантаження бази даних, такі як REAL DB, що містять молекули, які в основному є частиною бази даних ZINC. Віртуальні колекції комбінаторних сполук, відомі як хімічні простори, стали вирішальними для фармацевтичних досліджень у всьому світі. Такі постачальники, як Enamine, WuXi LabNetwork і OTAVA, зробили внесок у простори загальною кількістю понад 50 мільярдів молекул, виготовлених на замовлення, у 2022 році.

Три постачальника – Enamine REAL Space [29], GalaXi Space [30] і CHEMriya Space [31] – охоплюють надвеликі віртуальні комбінаторні хімічні простори, у кожному з яких використовуються різні будівельні блоки та реакції. Enamine REAL Space, що містить понад 39 мільярдів сполук, застосовує 156 протоколів синтезу до понад 104 000 будівельних блоків. Ці віртуальні сполуки, базуються на високо оптимізованій хімії і є READILY AVAILABLE (REAL), за три-чотири тижні їх можна синтезувати з 80% успіхом, що робить

їх майже такими ж доступними як і сполуки, які зберігаються на складі. Хімічний простір CHEMriya використовує 30 000 будівельних блоків і 44 власні реакції, тоді як віртуальний хімічний простір GalaXi від WuXi застосовує 30 різних типів реакцій і понад 155 000 будівельних блоків.

Enamine REAL Space і GalaXi Space, обидва з використанням щонайбільше трьох будівельних блоків у реакціях, мають перекриття понад 38 мільйонів комерційно доступних сполук через WuXi та Enamine [32-37].

Для трьох віртуальних бібліотек були визначені фізико-хімічні параметри. Їх розподіл зазвичай обчислюється для опису та порівняння віртуальних хімічних бібліотек. Були розраховані властивості сполук за правилом п'яти Ліпінського: кількість акцепторів водневих зв'язків, кількість донорів водневих зв'язків, молекулярна маса та коефіцієнт розподілу октанол-вода (Рисунок 1.8).

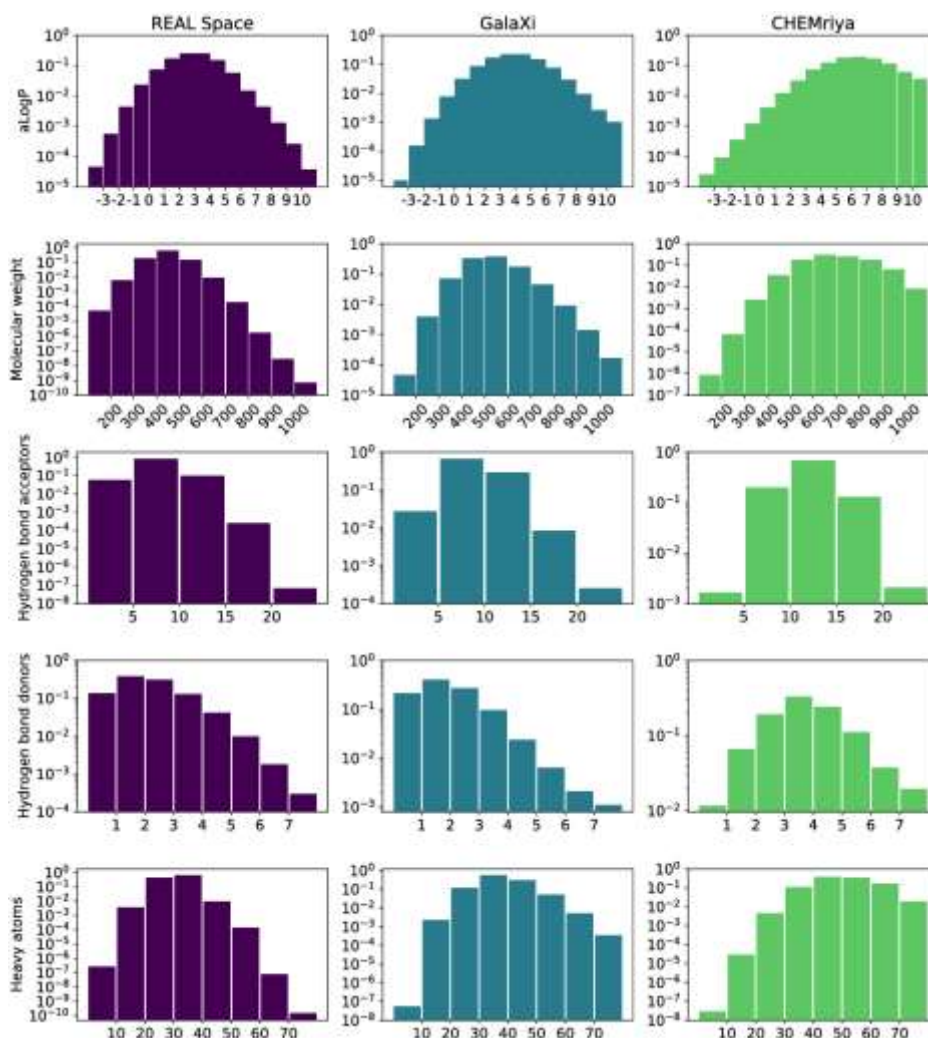


Рисунок 1.8 – Розподіл фізико-хімічних властивостей для молекул з REAL Space, GalaXi Space та CHEMriya [38].

Розподіли охоплюють широкий діапазон для всіх п'яти властивостей і всіх трьох хімічних просторів. Серед критеріїв «правила п'яти» ($\log P$, молекулярна маса, кількість акцепторів і донорів водневих зв'язків) найбільша різниця в розподілі спостерігалася для молекулярної маси між фрагментоподібними сполуками з 200 г/моль і дуже великими з 1000 г/моль. Найбільший відсоток сполук із молекулярною масою нижче 500 г/моль було виявлено в REAL Space (85%).

Узагальнюючи всі дані крім кількості важких атомів, можна зробити висновок, що принаймні 74% сполук Enamine REAL Space відповідають усім обмеженням «правила п'яти» Ліпінського. Це лише нижня межа, і фактичний відсоток сполук, які відповідають правилу, може бути навіть вищим.

На відміну від REAL Space, CHEMriya демонструє високий відсоток молекул, які виходять за рамки «правила п'яти». Це можуть бути, наприклад, PROTACи, пептидоміметики або ліпідоміметики [38].

У REAL Space високий відсоток молекул, які відповідають «правилу п'яти» Ліпінського. На додаток до повідомлених синтетичних показників успішності, це робить хімічний простір з 39 мільярдів сполук, що виготовляються на замовлення (“Make-on-Demand”), ідеальним кандидатом для відкриття ліків [39].

1.5 V-SYNTHES

Віртуальний скринінг лігандів на основі структури останнім часом став ключовим етапом у ранньому відкритті ліків завдяки величезній кількості кристалічних структур білків високої роздільної здатності та доступності віртуальних бібліотек сполук. Однак із швидким розширенням віртуальних бібліотек, таких як комбінаторна бібліотека REAdily AvailAble for synthesis (REAL), існує потреба в інноваційних підходах до скринінгу сполук. Тому у 2022 році було представлено новий метод для пошуку сполук у надвеликих бібліотеках під назвою V-SYNTHES, який використовує підхід на основі синтонів. V-SYNTHES (Virtual SYNThon Hierarchical Enumeration Screening) спочатку визначає оптимальні комбінації синтон-скаффолд як зародки для подальшого росту, а потім систематично вдосконалює ці фрагменти, щоб вибрати повні молекули з чудовими показниками зв'язування. Ця комбінаторна стратегія дозволяє швидко ідентифікувати сполуки з найкращим результатом у надвеликому хімічному просторі, виконуючи докінг лише для невеликої фракції сполук бібліотеки (менше 0,1%).

Метод V-SYNTHES складається із серії ітераційних процедур, включаючи підготовку бібліотеки, перерахування («enumeration»), докінг та відбір кандидатів для експериментального підтвердження зв'язування (Рисунок 1.9).

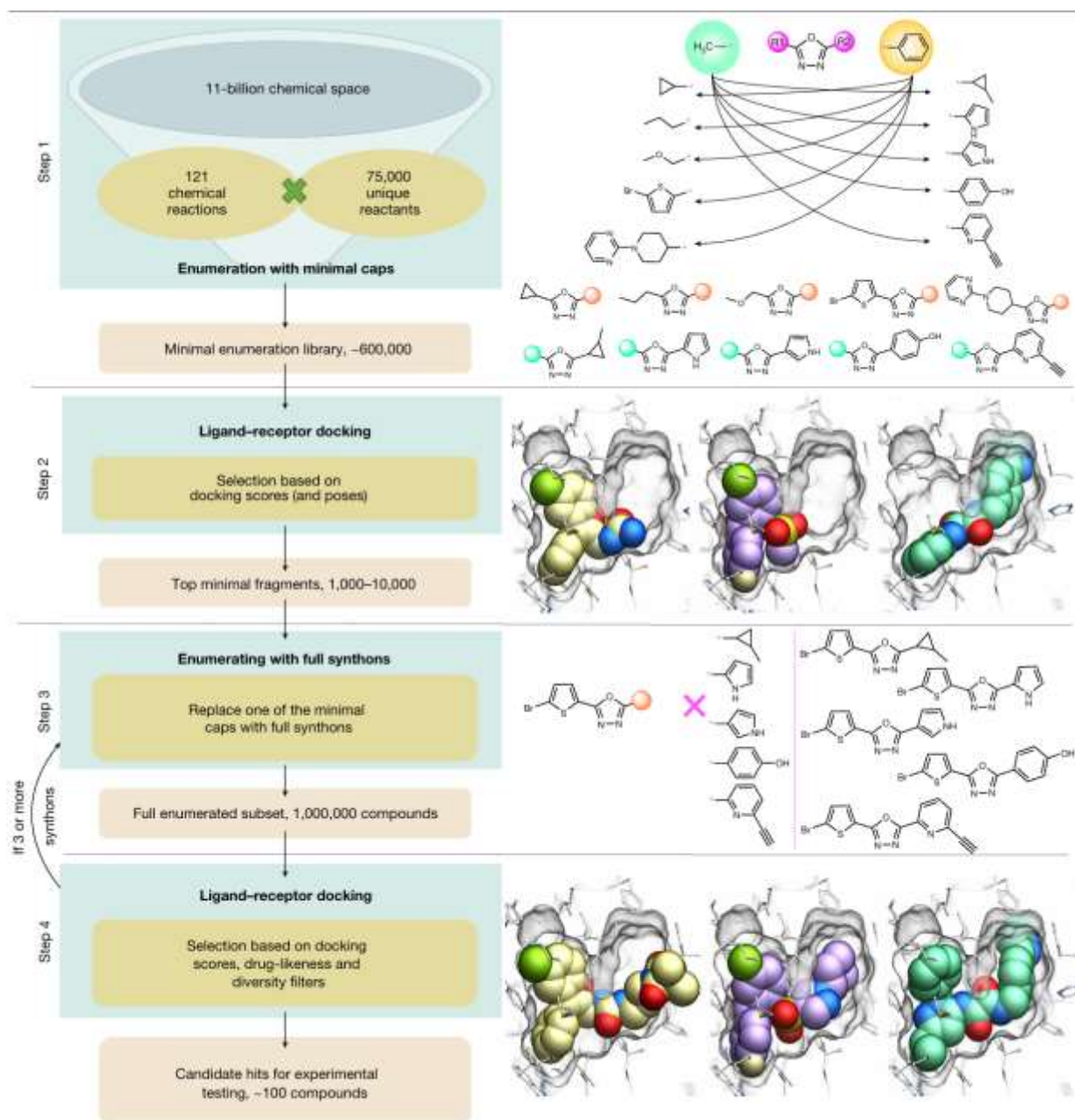


Рисунок 1.9 - Схематичне зображення алгоритму V-SYNTHES [40].

Спочатку (Етап 1) створюється бібліотека фрагментоподібних сполук, яка представляє усі потенційні комбінації скаффолд-синтон для реакцій у всьому Enamine REAL. Ця бібліотека називається «бібліотекою мінімального перерахування» (MEL, “Minimal Enumeration Library”) і створюється шляхом побудови сполук із каркасів реакцій енумерованих з відповідними синтонами. Після енумерації кожен фрагмент «обмежується» за допомогою спеціального мінімального синтону. Сполуки MEL не залежать від обраного білка і тому бібліотека генерується один раз, і підходить для будь-якої цілі.

Переходячи до етапу 2 проводиться докінг сполук із MEL у вибраний рецептор. Прогнозовані значення зв'язування та інформація про взаємодію ліганд-білок

використовуються для визначення найбільш перспективних фрагментів для наступних розрахунків.

Наступним етапом відбувається процес енумерації та стикування найкращих фрагментів MEL з етапу 2. На кожній стадії сполуки перераховуються шляхом заміни однієї з обмежених R груп на синтони з бібліотеки. Наприклад, у двокомпонентних реакціях лише з двома групами R достатньо однієї ітерації етапу 3 щоб завершити молекулу з REAL Space. У трьох і більше компонентних реакціях проводяться дві або більше ітерацій, систематично замінюючи обмеження. Отже, найкращі сполуки MEL з попередньої ітерації вирощуються комбінаторно, в результаті чого утворюються повністю перераховані сполуки з REAL Space.

Нарешті, на етапі 4 виконується докінг для кінцевої пронумерованої підмножини бібліотеки. Кілька тисяч найкращих сполук кандидатів із віртуального скринінгу лігандів проходять фільтрацію на PAINS, фізико-хімічні властивості, схожості з ліками, новизни та хімічної різноманітності. Цей етап використовується для вибору остаточних сполук лідерів, зазвичай 50-100 сполук, для подальшого синтезу та експериментального тестування [40].

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Вибір моделі для віртуального скринінгу

Для віртуального скринінгу сполук в хімічному просторі Enamine REAL (176 мільярдів сполук) методом V-SYNTHES потрібно підібрати модель, яка б змогла надати найбільш точні результати. На момент написання кваліфікаційної роботи в базі даних Brookhaven Protein Data Bank була доступна тільки одна просторова структура Cbl-b (PDB ID: 8GCY) з лігандом C7683, яку ми взяли за основу.

Спершу потрібно було відтворити позу ліганду із кристалу. Розрахунок проводили без води, додавали полярні атоми гідрогену до структури рецептора та заряди на ліганд за допомогою програмного забезпечення ICM-PRO. Докінг проводили методом напівгнучкого стикування, тобто сполуки могли рухатися (конформаційно гнучкі), а білок залишався жорстким. Використовували стандартну комірку запропоновану ICM-PRO створену навколо положення ліганду у кристалі ($30 \times 24 \times 25$ Å). Розрахунки для моделі проводили тричі. В результаті ми отримали непогані значення прогнозованої взаємодії ліганд-рецептор та rmsd (Рисунок 2.1, Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1 - Результати редокінгу C7683 без води у кристал 8GCY.

Effort = 3	Без води		
Score	-43.66	-42.10	-45.72
RMSD	1.0552	1.2047	0.2169

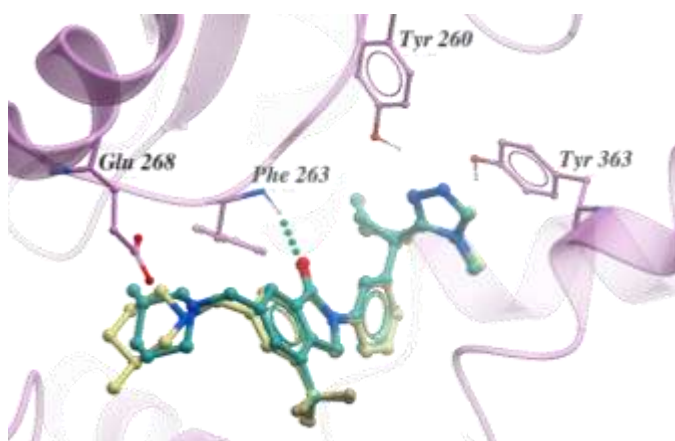


Рисунок 2.1 - Результати редокінгу C7683 без води у кристал 8GCY, RMSD = 1.2047, зеленим кольором позначено позу ліганду в кристалі, жовтим позначено позу отриману при стикуванні.

Для покращення результатів вирішили додати до моделі молекули води. Проаналізувавши сайт зв'язування ми обрали 11 молекул води: вода 69 взаємодіє з лігандом, 79 і 110 утворюють по два водневі зв'язки кожна з білком, 64 і 97 взаємодіють з залишками Cbl-b через один водневий зв'язок, всі інші утворюють сітку з водневих зв'язків (Рисунок 2.2).

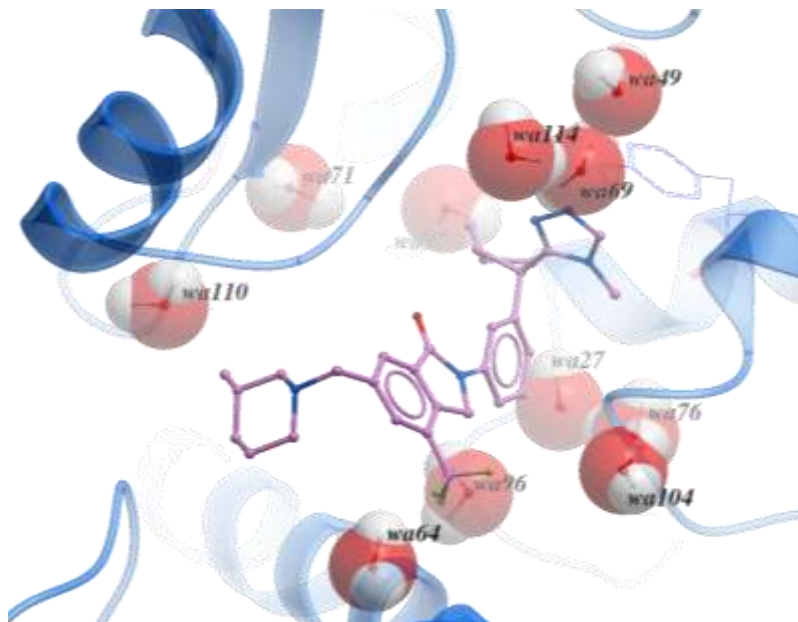


Рисунок 2.2 - Молекули води обрані для створення моделі.

Результати докінгу з водою показані в Таблиці 2.2, представлений тільки один варіант моделі з однією молекулою води wa69 (Рисунок 2.3), тому що всі інші обрані води в деяких випадках показали набагато гірші результати в порівнянні із моделлю без води. Опираючись на отримані дані з однією молекулою води, та з комбінацією декількох ми обрали три найкращі моделі: 1 – wa69, 2 – wa69wa76, 3 – wa69wa110.

Таблиця 2.2 - Результати докінгу C7683 з водою у кристал 8GSY.

Effort = 3												
	wo wa	wa69	wa69 wa27	wa69 wa49	wa69 wa64	wa69 wa71	wa69 wa76	wa69 wa96	wa69 wa97	wa69 wa104	wa69 wa110	wa69 wa114
Score	-43.66	-52.83	-54.03	-50.50	-53.00	-50.55	-53.01	-52.62	-47.95	-52.11	-51.49	-52.90
RMSD	1.0552	0.2305	0.2319	1.2044	0.2301	1.0581	0.2332	0.2287	1.2065	0.2306	1.0588	0.2298
Score	-42.10	-53.00	-48.68	-53.48	-50.90	-43.19	-49.43	-52.32	-49.18	-51.94	-54.07	-52.84
RMSD	1.2047	0.2300	1.1357	0.2204	1.0580	1.0994	1.2071	1.2306	1.0582	0.2304	0.2258	0.2331
Score	-45.72	-52.82	-49.97	-50.27	-36.98	-52.59	-52.88	-52.44	-50.88	-52.17	-54.20	-49.21
RMSD	0.2169	0.2308	1.2072	1.2052	1.1635	0.2310	0.2336	0.2299	0.2482	3.2641	0.2267	1.2069

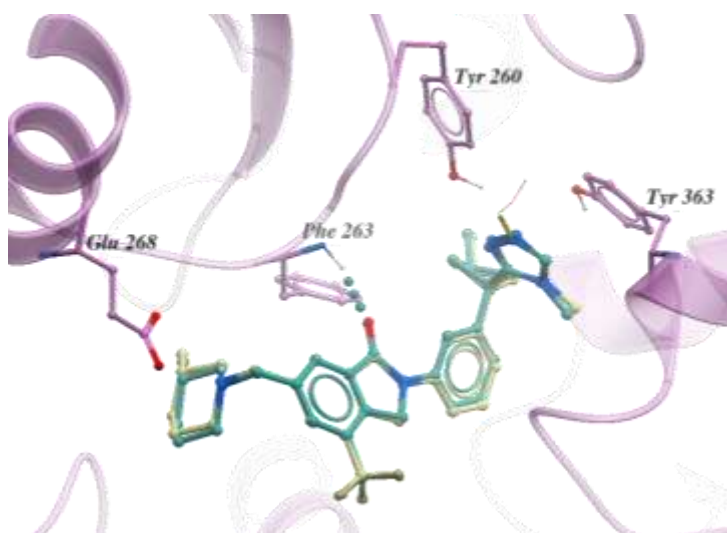


Рисунок 2.3 - Результати редокінгу C7683 з 69 водою у кристал 8GCY, RMSD = 0.2308, зеленим кольором позначено позу ліганду в кристалі, жовтим позначено позу отриману при стикуванні.

Ефективність обраних моделей, а також моделі з комбінацією 69, 76 та 110 вод, перевіряли за допомогою ROC кривих порівнюючи результати з моделями без води, з 76 водою та 110 водою. Для цього на кожну з 29 найбільш активних сполук компанії Nurix Therapeutics Inc згенерували по 50 дікоїв, всього 1450 сполук, які ми використовували для докінгу та побудови ROC кривих. Результати представлені у Таблиці 2.3 та на Рисунку 2.4.

Таблиця 2.3 - Результати докінгу 29 найбільш активних сполук компанії Nurix Therapeutics Inc з дікоями.

	wo water	wa69	wa76	wa110	wa69 wa76	wa69 wa110	wa76 wa110	wa69 wa76 wa110
AUC	95.43	99.18	97.20	97.33	95.18	97.93	96.37	99.27
	96.30	96.56	97.05	95.35	96.10	99.01	97.82	98.94
	96.52	99.17	97.40	96.24	98.22	96.37	97.07	98.01
MEAN	96.08	98.30	97.22	96.31	96.50	97.77	97.09	98.74
STDV	0.5764	1.5098	0.1756	0.9917	1.5590	1.3273	0.7251	0.6534
STERR	0.3328	0.8717	0.1014	0.5725	0.9001	0.7663	0.4187	0.3772

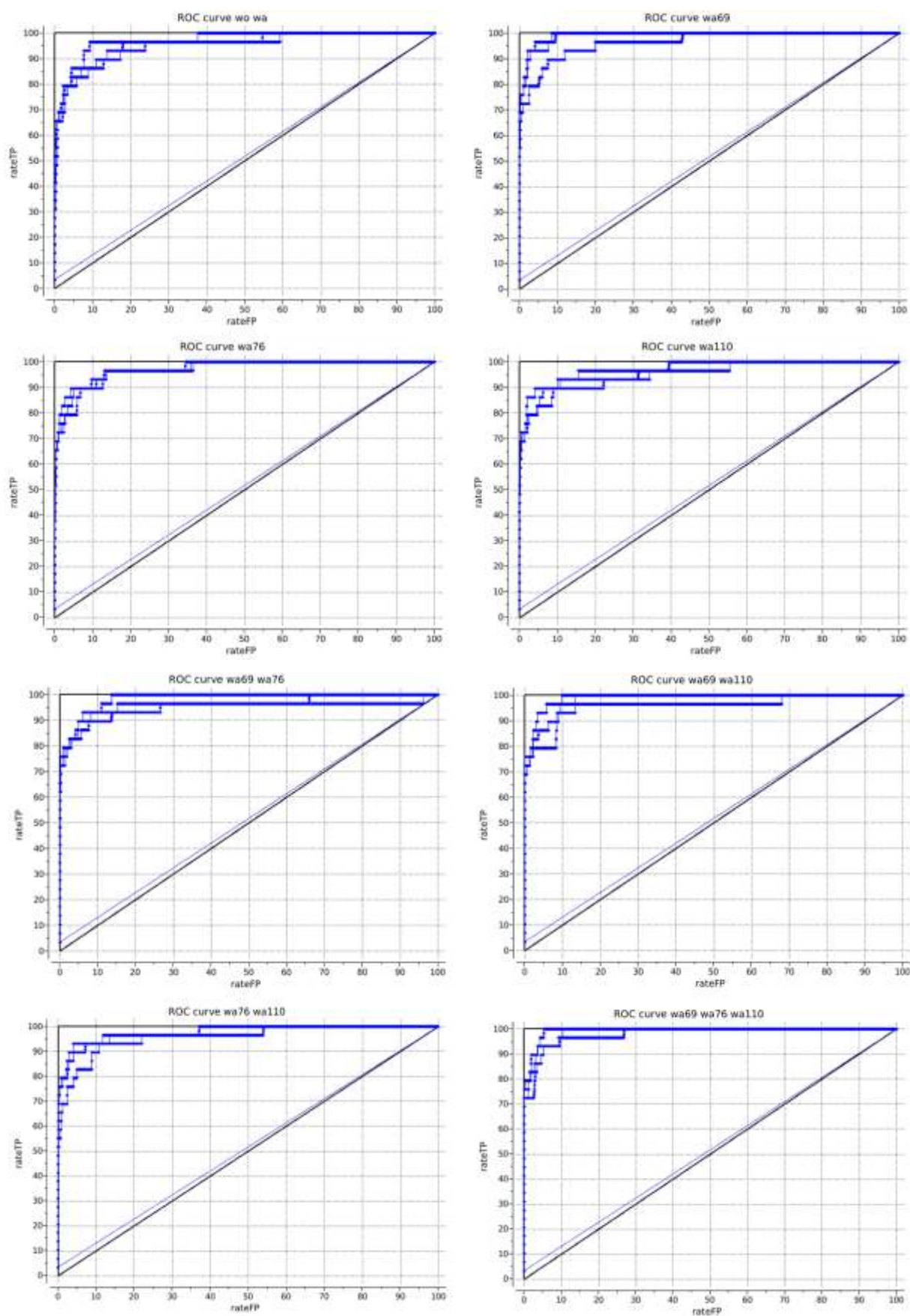


Рисунок 2.4 - ROC криві. Для кожної моделі докінг і відповідно розрахунок кривої проводили тричі.

Для подальшого віртуального скринінгу сполук методом V-SYNTHES ми обрали модель з трьома молекулами води (Рисунок 2.5), яка за розрахунками давала найбільш стабільні результати. Wa76 та wa110 зв'язуються з залишками білка через два водневі зв'язки кожна (wa76 – Ser218, Ser368; wa110 – Cys289), мають непогане розташування в сайті зв'язування частково закриваючи завеликий об'єм кишені і при цьому вони не будуть заважати при пошуку нових сполук.

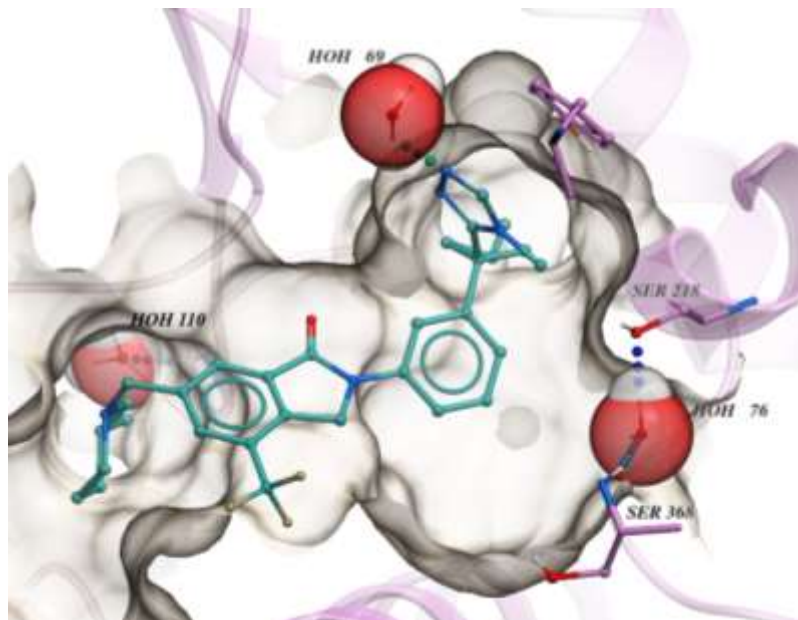


Рисунок 2.5 - Вибрана модель для віртуального скринінгу.

2.2 V-SYNTHES

2.2.1 Докінг MEL

Використовуючи модель білка з трьома молекулами води зробили докінг бібліотеки MEL, яка на момент написання кваліфікаційної роботи складалася з декількох мільйонів фрагментів. Сполуки у REAL Space генеруються за допомогою дво- та трикомпонентних реакцій тому докінг MEL відбувався у два етапи: спочатку розрахунок проводили для фрагментів, які використовуються у двокомпонентних реакціях і окремо проводили докінг для фрагментів, які використовуються у трикомпонентних реакціях.

За результатами докінгу були відібрані найкращі фрагменти для участі у двокомпонентних реакціях після “нарощування” яких ми отримали півтора мільйони повноцінних сполук. Аналогічно, ми нарощували фрагменти для трикомпонентних реакцій, головна відмінність полягає у тому що нарощування відбувається не за один цикл, а за два і в результаті для цих реакцій ми також отримали півтора мільйони сполук.

Розподіл фізико-хімічних властивостей фрагментів за правилом п'яти Ліпінського для двокомпонентних реакцій представлено на Рисунку 2.6, для трикомпонентних реакцій – на Рисунку 2.7, також у Таблиці 2.4 показані декілька фрагментів з вибірки, які ми використовували для енумерації.

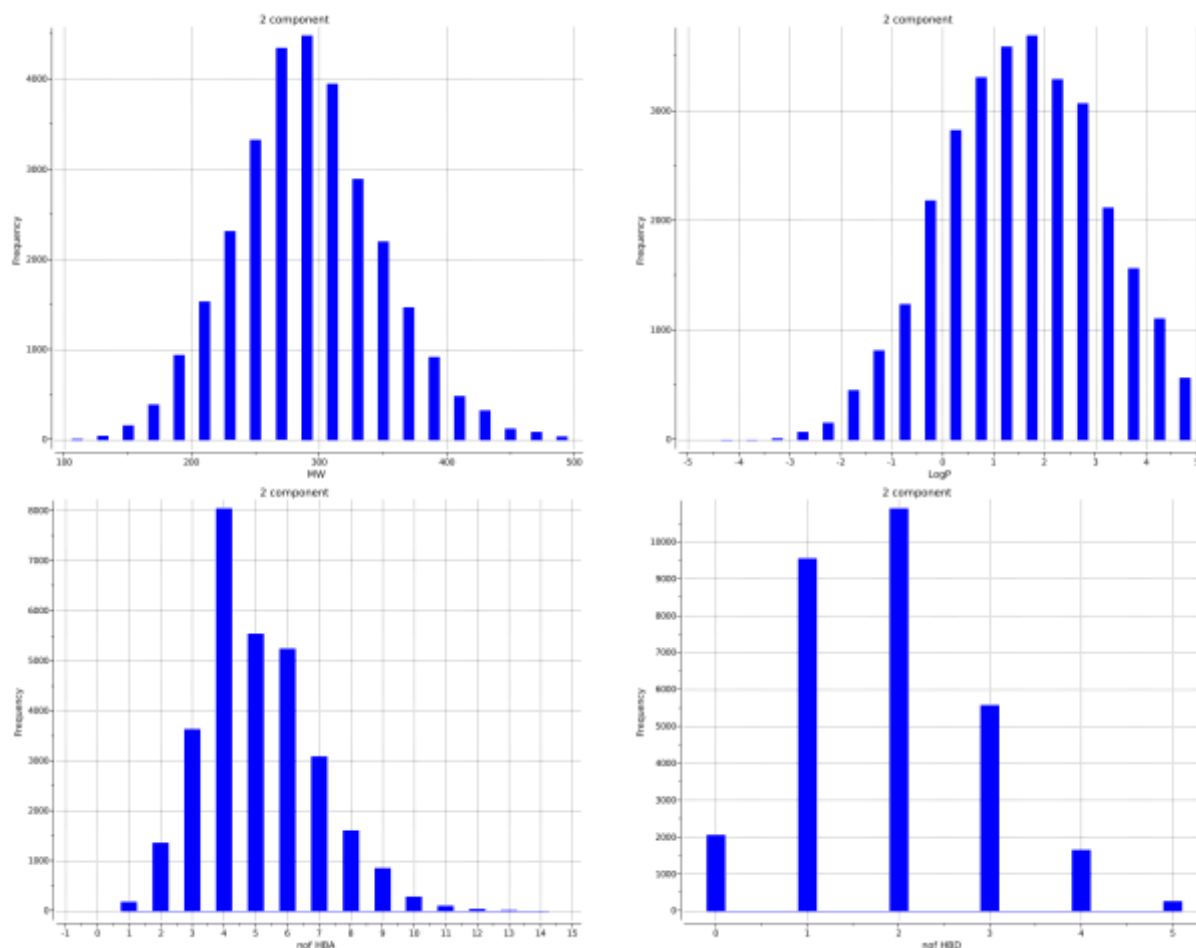


Рисунок 2.6 - Розподіл фізико-хімічних властивостей, таких як молекулярна маса (MW), коефіцієнт розподілу октанол-вода (LogP), кількість акцепторів водневого зв'язку (НВА), кількість донорів водневого зв'язку (НВД) для фрагментів, що були використані у двокомпонентних реакціях.

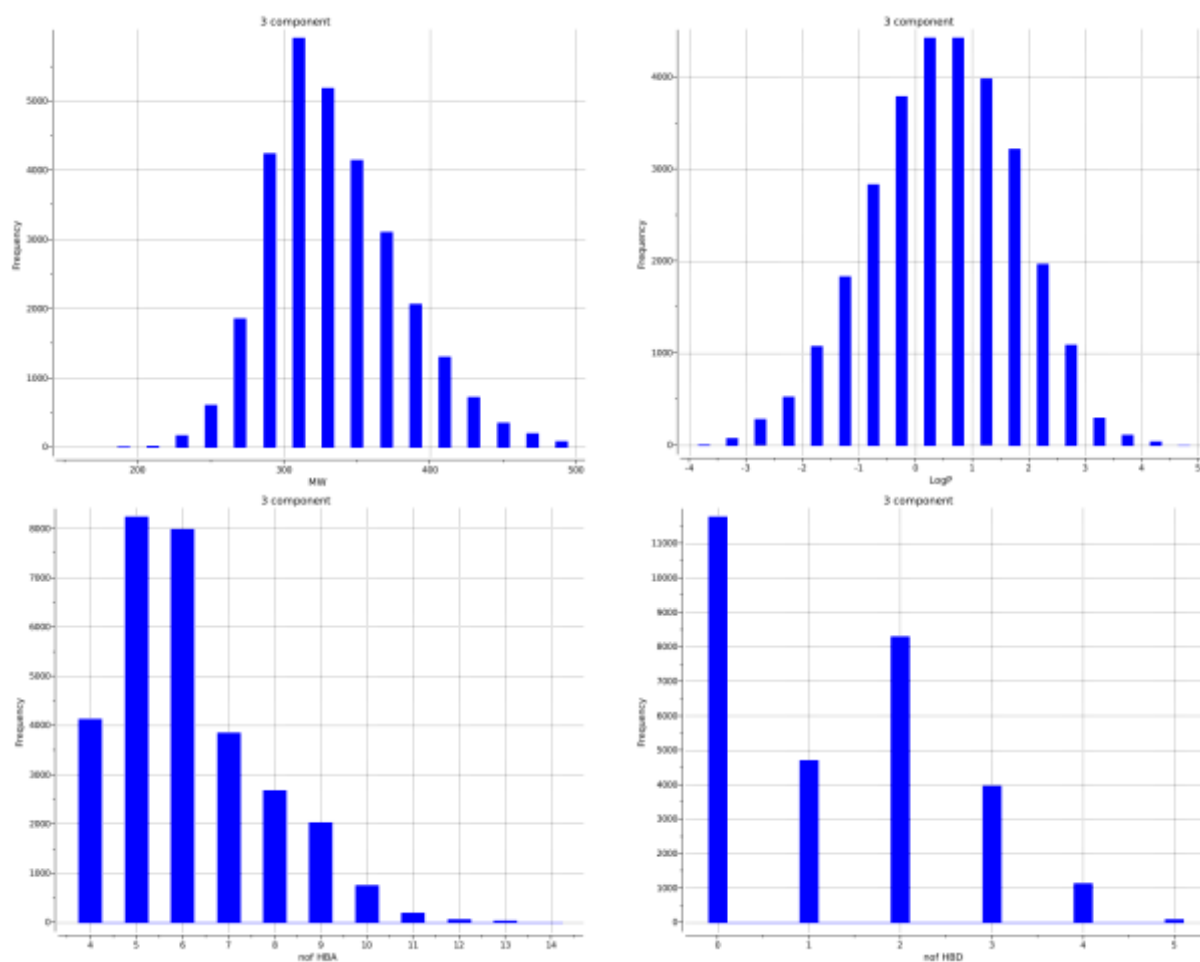
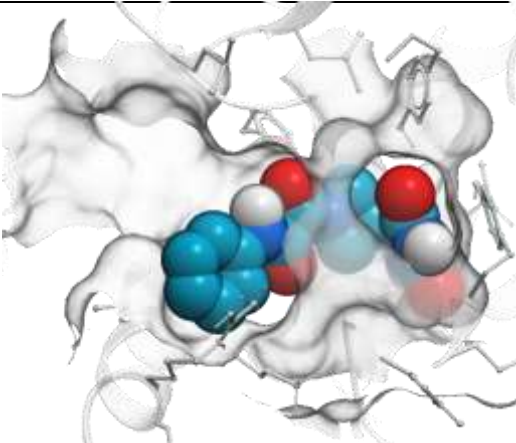
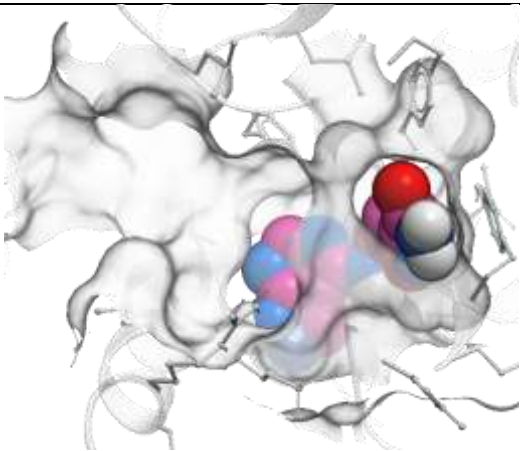
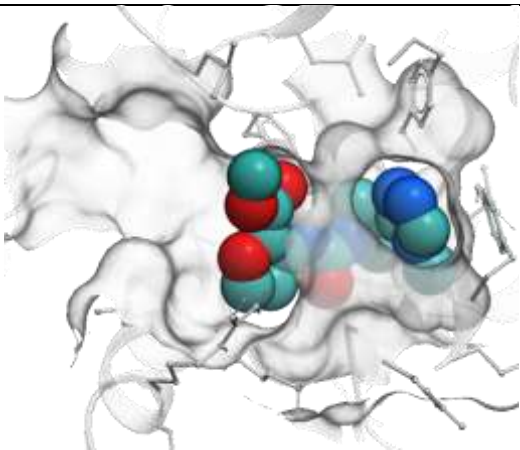
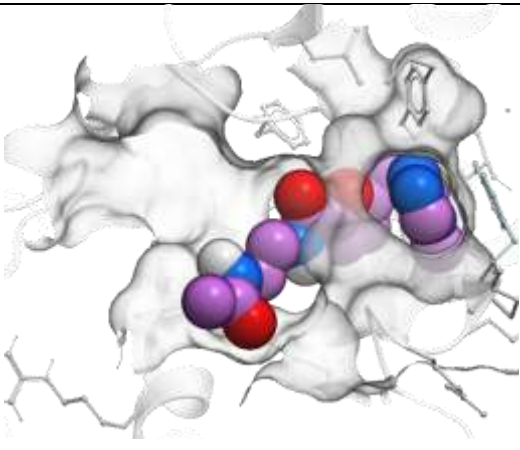


Рисунок 2.7 - Розподіл фізико-хімічних властивостей, таких як молекулярна маса (MW), коефіцієнт розподілу октанол-вода (LogP), кількість акцепторів водневого зв'язку (НВА), кількість донорів водневого зв'язку (НВД) для фрагментів, що були використані у трикомпонентних реакціях.

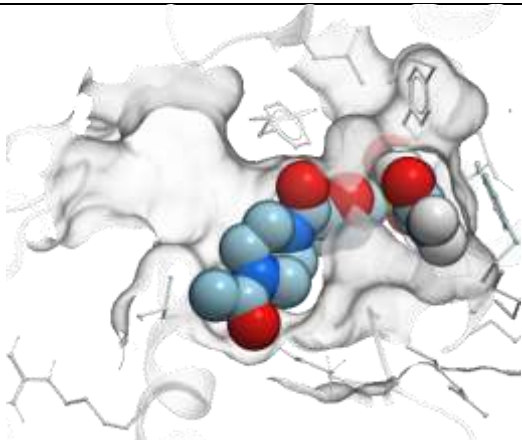
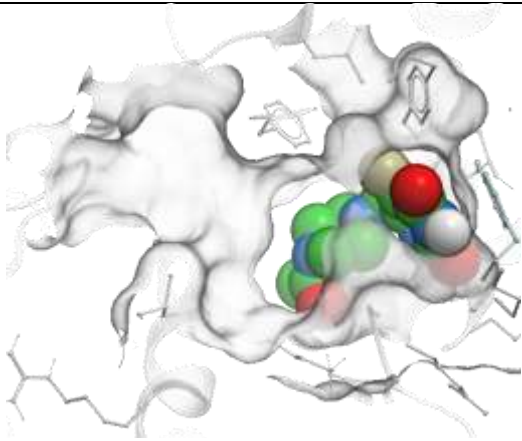
Таблиця 2.4 - Приклади фрагментів відібраних під час докінгу MEL.

Двокомпонентний MEL		
Фрагмент	Score	ММ, г/моль
	-51.84	326

Продовження таблиці 2.4

Двокомпонентний MEL		
Фрагмент	Score	ММ, г/моль
	-42.19	277
	-40.81	325
Трикомпонентний MEL		
	-47.81	334

Продовження таблиці 2.4

Трикомпонентний MEL		
Фрагмент	Score	ММ, г/моль
	-42.00	265
	-39.85	301

2.2.2 Докінг проєнумерованої бібліотеки

Останнім етапом для трьох мільйонів сполук ми передбачили зв'язування у цільовий рецептор за допомогою докінгу.

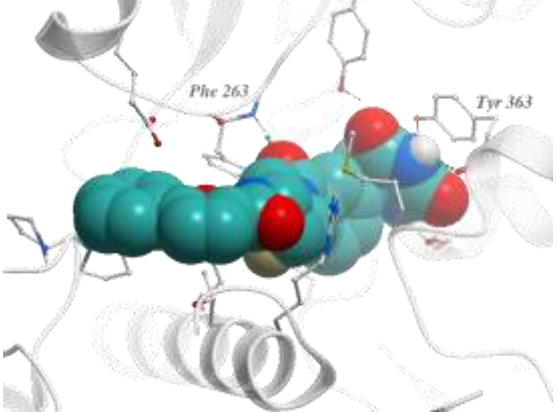
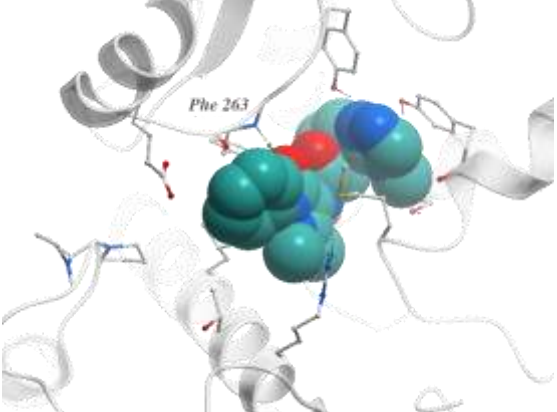
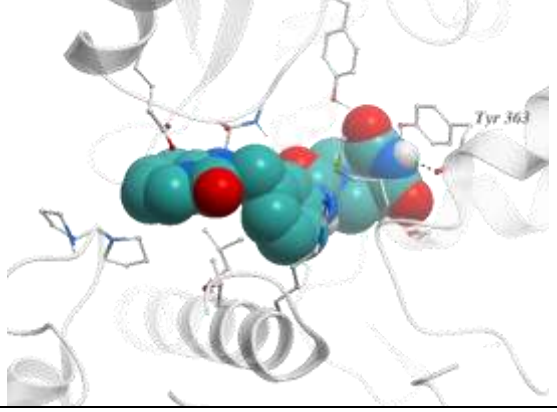
Результати докінгу для сполук із двох типів реакцій об'єднали і відсортували за значенням прогнозованої взаємодії білок-ліганд, додатково використовували фільтри PAINS [41] та REOS [42], а також правило п'яти Ліпінського. Після аналізу сайту зв'язування і взаємодії відомого інгібітора Cbl-b відфільтровані сполуки (приблизно 40 тисяч) розділили на п'ять груп за їх водневими зв'язками з певними залишками рецептора, розташуванням у сайті зв'язування та оцінкою зв'язування (Таблиця 2.5):

- група 1 Phe263, Tyr363;
- група 2 Phe263;
- група 3 Tyr363;
- група 4 Glu268;

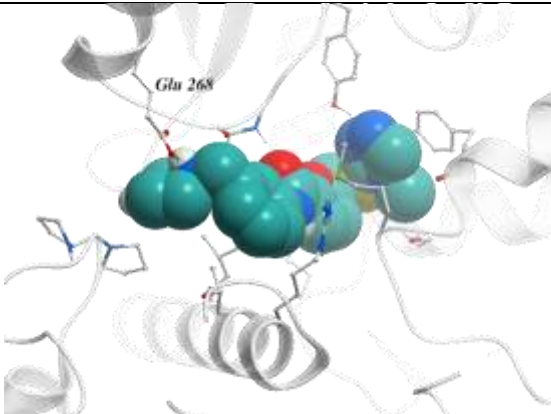
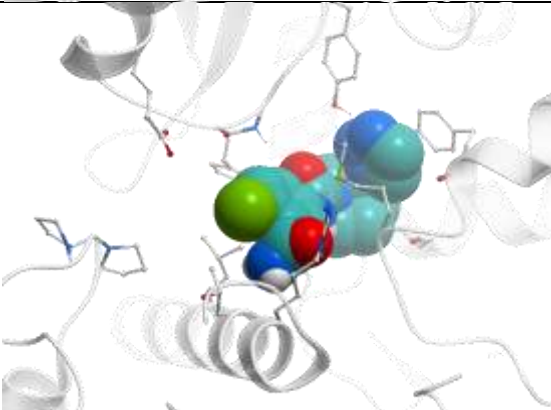
– група 5 Score: сполуки, які не увійшли у попередні чотири групи, але мали високе значення прогнозованої взаємодії білок-ліганд.

Кожну групу кластеризували для отримання різноманітності сполук у кінцевій вибірці. Після візуального огляду для аналізу зв'язування обрали 69 сполук.

Таблиця 2.5 - Приклади сполук з фінальної вибірки, що розподілені на групи.

Назва групи	Сполука	Score	ММ, г/моль	LogP
1 Phe263, Tyr363		-50.36	490	2.01
2 Phe263		-47.16	380	0.14
3 Tyr363		-50.59	406	0.25

Продовження таблиці 2.5

Назва групи	Сполука	Score	ММ, г/моль	LogP
4 Glu268		-61.45	427	1.33
5 Score		-50.34	348	0.73

2.3 Експериментальне підтвердження зв'язування

Вибрані 69 сполук перевіряли у двох незалежних вимірюваннях при 50 мкМ в аналізі флуоресцентної поляризації (FP), який вимірював заміщення флуоресцентно міченої версії відомого ліганду Cbl-b C2787102 (Рисунок 2.8, Рисунок 2.9).

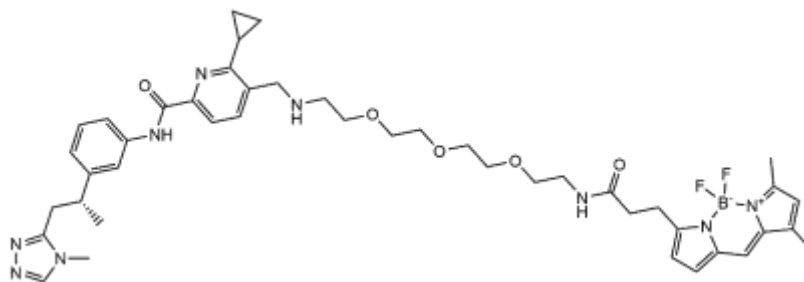


Рисунок 2.8 - Флуоресцентно мічена версія відомого ліганду Cbl-b C2787102.

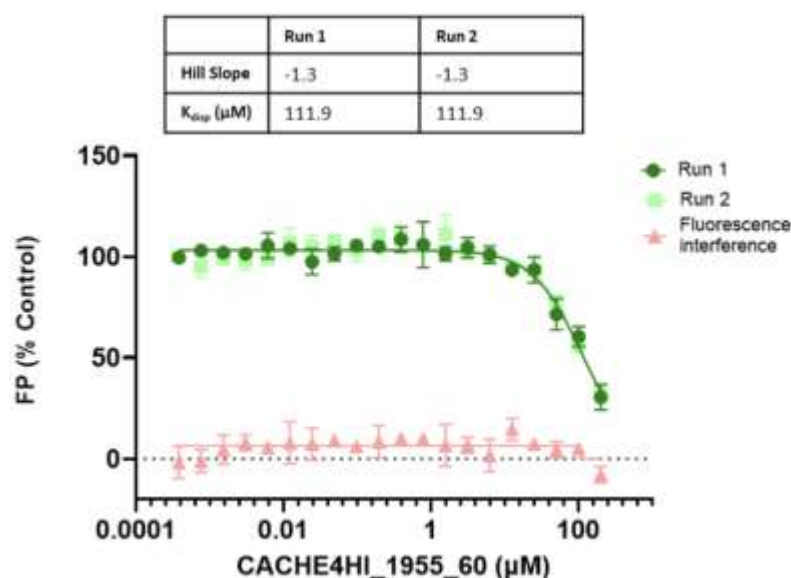


Рисунок 2.9 - Криві отримані при аналізі флуоресцентної поляризації.

Сполуку з найкращим значенням зв'язування серед обраних кандидатів ($K_{\text{disp}} = 111.9 \mu\text{M}$) додатково перевіряли на взаємодію з неспорідненою мішенню, GID4, у попередньо встановленому аналізі флуоресцентної поляризації FP. Отримані результати показали, що ліганд не зв'язується з убіквітиною лігазою GID4 (Рисунок 2.10).

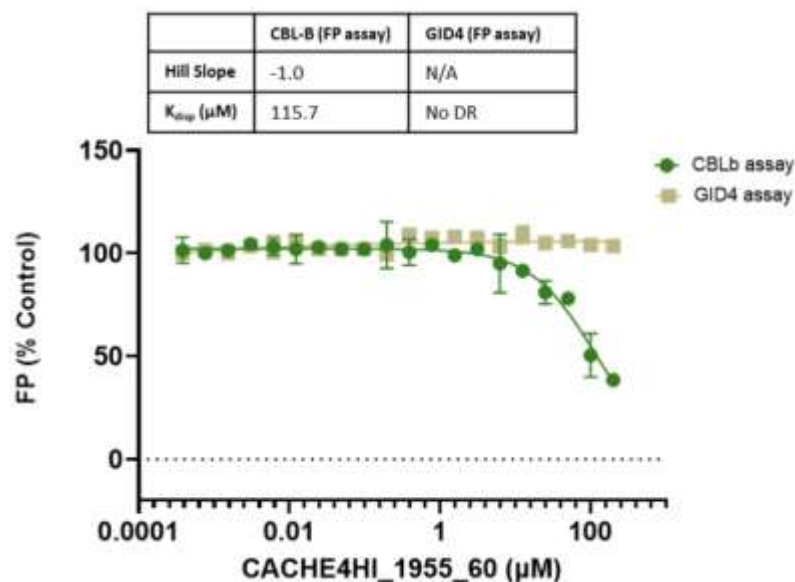


Рисунок 2.10 - Криві, які демонструють специфічне зв'язування кандидату з Cbl-b порівняно з GID4.

2.3.1 Взаємодія сполуки кандидата з лігазою Cbl-b

За результатами докінгу найбільш перспективна сполука взаємодіє із залишками всіх трьох субдоменів TKBD та LHR (Рисунок 2.11), як і згаданий вище інгібітор Cbl-b C7683.

Через водневий зв'язок з Ser218 ліганд зв'язується з субдоменом EF-hand. З субдоменом 4H сполука утворює гідروفобні взаємодії із залишками Lys145, Leu148, Ile149. Ліганд встановлює гідروفобні та ван-дер-ваальсові контакти з бічними ланцюгами Tyr260, Leu222 субдомену SH2, а також утворює водневий зв'язок з азотом залишку Phe263.

З ділянкою спіралі лінкера (LHR) молекула бере участь у взаємодії π - π стекінгу з кільцем бічного ланцюга Tyr363, який відіграє вирішальну роль у регуляції активності лігази Cbl-b, а також утворює водневий зв'язок з його атомом кисню. Додатково присутні гідروفобні взаємодії з залишками Met366 та Gly367. Також через атом азоту сполука утворює водневий зв'язок з Ser368, що може додатково посилити зв'язування LHR і не дати вивільнитись петлі, а рецептору перейти в активну конформацію.

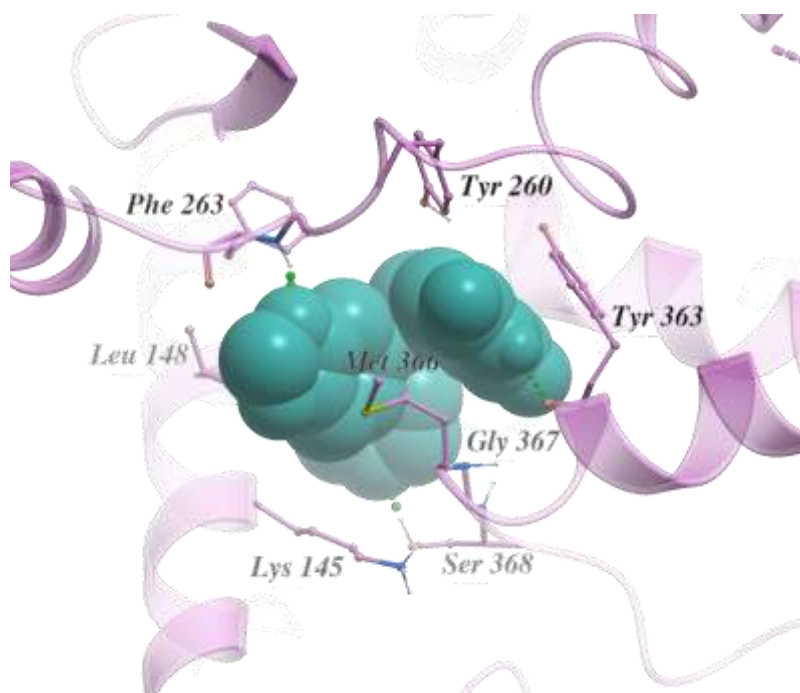


Рисунок 2.11 – Сайт зв'язування сполуки кандидата та ключові амінокислотні залишки з якими взаємодіє ліганд.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі проаналізовано процес убіквітинування, функції та структура лігази Cbl-b, розкриваючи ключові аспекти її ролі в регуляції сигнальних шляхів та імунної системи. Окрему увагу приділено вивченню взаємодії Cbl-b з однією з запатентованих сполук компанії Nurix Therapeutics Inc, що відкриває перед нами потенційні можливості для розробки нових інгібіторів та лікарських засобів:

1) за допомогою методу V-SYNTHES, який використовує синтони, зроблено скринінг сполук у надвеликому просторі Enamine xREAL Space;

2) за результатами докінгу та субструктурних фільтрів з трьох мільйонів сполук було обрано 69 сполук для експериментального підтвердження взаємодії з лігазою у аналізі флуоресцентної поляризації;

3) для сполуки кандидата, що показала найкраще зв'язування з білком $K_{\text{disp}} = 111.9$ μM проаналізовано сайт стикування та ключові амінокислотні залишки з якими взаємодіє молекула.

Результати роботи є перспективними для дизайну нових лігандів на основі встановленої найбільш перспективної сполуки шляхом пошуку подібних структур у комерційних скринінгових колекціях та використанням обчислювальних методів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tang R., Langdon W. Y., Zhang J. Regulation of immune responses by E3 ubiquitin ligase Cbl-b. *Cell Immunol.* **2019**, 340, 103878.
2. Augustin R. C., Bao R., Luke J. J. Targeting Cbl-b in cancer immunotherapy. *J. Immunother Cancer* **2023**, 11 (2), e006007.
3. Liu Q., Zhou H., Langdon W. Y., Zhang J. E3 ubiquitin ligase Cbl-b in innate and adaptive immunity. *Cell Cycle* **2014**, 13 (12), 1875-1884.
4. Abe T., Hirasaka K., Nikawa T. Involvement of Cbl-b-mediated macrophage inactivation in insulin resistance. *World J. Diabetes*, **2017**, 8 (3), 97-103.
5. Yang Q., Zhao J., Chen D. et al. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol. Biomed.* **2021**, 2 (1), 23.
6. Jafari D., Mousavi M. J., Keshavarz Shahbaz S., Jafarzadeh L., et al. E3 ubiquitin ligase Casitas B lineage lymphoma-b and its potential therapeutic implications for immunotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* **2021**, 204 (1), 14-31.
7. Cooper J. A., Kaneko T., Li S. S. Cell regulation by phosphotyrosine-targeted ubiquitin ligases. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, 35 (11), 1886-1897.
8. Paolino M., Thien C. B., Gruber T., Hinterleitner R., et al. Essential role of E3 ubiquitin ligase activity in Cbl-b-regulated T cell functions. *J. Immunol.* **2011**, 186 (4), 2138-2147.
9. Kimani S. W., Perveen S., Szewczyk M. et al. The co-crystal structure of Cbl-b and a small-molecule inhibitor reveals the mechanism of Cbl-b inhibition. *Commun. Biol.* **2023**, 6 (1), 1272.
10. Kobashigawa Y., Tomitaka A., Kumeta H., et al. Autoinhibition and phosphorylation-induced activation mechanisms of human cancer and autoimmune disease-related E3 protein Cbl-b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2011**, 108 (51), 20579-20584.
11. Dou H., Buetow L., Hock A. et al. Structural basis for autoinhibition and phosphorylation-dependent activation of c-Cbl. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 184-192.
12. Cooper J. A., Kaneko T., Li S. S. Cell regulation by phosphotyrosine-targeted ubiquitin ligases. *Mol. Cell. Biol.* **2015**, 35 (11), 1886-1897
13. Dou H., Buetow L., Sibbet G. J., Cameron K., Huang D. T. Essentiality of a non-RING element in priming donor ubiquitin for catalysis by a monomeric E3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, 20 (8), 982-986.

14. Ohno A., Ochi A., Maita N., Ueji T., Bando A., et al. Structural analysis of the TKB domain of ubiquitin ligase Cbl-b complexed with its small inhibitory peptide, Cblin. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *594*, 1-7.
15. Hu L. B., Hu X. Q., Zhang Q., You Q. D., Jiang Z. Y. An affinity prediction approach for the ligand of E3 ligase Cbl-b and an insight into substrate binding pattern. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *38*, 116130.
16. Nurix Therapeutics, Inc. Inhibitors of Cbl-b and methods of use thereof. WO/2019/148005, 2019.
17. Wilson BAP., Voeller D., Smith E. A., Wamiru A., et al. In Vitro Ubiquitination Platform Identifies Methyl Ellipticiniums as Ubiquitin Ligase Inhibitors. *SLAS Discov.* **2021**, *26* (7), 870-884.
18. Kim C. K., Wang D., Wilson BAP., Saurí J., et al. Suberitamides A-C, Aryl Alkaloids from a Pseudosuberites sp. Marine Sponge that Inhibit Cbl-b Ubiquitin Ligase Activity. *Mar. Drugs.* **2020**, *18* (11), 536.
19. Jiang W., Wang D., Wilson BAP., Voeller D., et al. Sinularamides A-G, Terpenoid-Derived Spermidine and Spermine Conjugates with Casitas B-Lineage Lymphoma Proto-Oncogene B (Cbl-b) Inhibitory Activities from a Sinularia sp. Soft Coral. *J. Nat. Prod.* **2021**, *84* (6) 1831-1837.
20. Jiang W., Wang D., Wilson BAP., Kang U., et al. Agelasine Diterpenoids and Cbl-b Inhibitory Ageliferins from the Coralline Demosponge *Astrosclera willeyana*. *Mar. Drugs.* **2021**, *19* (7), 361.
21. Wu L., Grigoryan A. V., Li Y., Hao B., Pagano M., Cardozo T. Specific Small Molecule Inhibitors of Skp2-Mediated p27 Degradation. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (12), 1515-1524.
22. Zhong H. J., Liu L. J., Chong C. M., Lu L., Wang M., Chan D. S. H., et al. Discovery of a Natural Product-Like iNOS Inhibitor by Molecular Docking with Potential Neuroprotective Effects In Vivo. *PLoS ONE*, **2014**, *9* (4), e92905.
23. Borriello L., Montès M., Lepelletier Y., Leforban B., Liu, W. Q., Demange L., et al. Structure-based discovery of a small non-peptidic Neuropilins antagonist exerting in vitro and in vivo anti-tumor activity on breast cancer model. *Cancer Letters*, **2014**, *349* (2), 120-127.
24. Gabrielsen M., Kurczab R., Siwek A., Wolak M., Ravna A. W., Kristiansen K., et al. Identification of Novel Serotonin Transporter Compounds by Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (3), 933-943.
25. Sorna V., Theisen E. R., Stephens B., Warner S. L., Bearss D. J., Vankayalapati H., Sharma, S. High-Throughput Virtual Screening Identifies Novel N'-(1-Phenylethylidene)-

benzohydrazides as Potent, Specific, and Reversible LSD1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (23), 9496-9508.

26. Chan F. Y., Sun N., Neves M. A. C., Lam P. C. H., Chung W. H., et al. Identification of a New Class of FtsZ Inhibitors by Structure-Based Design and in Vitro Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53 (8), 2131-2140.

27. Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. ICM - A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.* **1994**, 15, 488-506.

28. Neves M. A., Totrov M., Abagyan R. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2012**, 26 (6), 675-686.

29. Enamine REAL Space. <https://enamine.net/library-synthesis/real-compounds/real-space-navigator> (12.05.2024).

30. GalaXi Space. <https://www.labnetwork.com/frontend-app/p/#!/library/virtual> (12.05.2024).

31. CHEMriya Space. <https://www.otavachemicals.com/products/chemriya> (12.05.2024).

32. Bellmann L., Penner P., Gastreich M., Rarey M. Comparison of Combinatorial Fragment Spaces and Its Application to Ultralarge Make-on-Demand Compound Catalogs. *J. Chem. Inf. Model.* **2022** 62 (3), 553-566.

33. Nazarova A., Katritch V. It all clicks together: In silico drug discovery becoming mainstream. *Clinical and Translational Medicine.* **2022**, 12 (4), e766.

34. Korn M., Ehrt C., Ruggiu F., Gastreich M., Rarey M. Navigating large chemical spaces in early-phase drug discovery. *Current Opinion in Structural Biology.* **2023**, 80, 102578.

35. Hoffmann T., Gastreich M. The next level in chemical space navigation: going far beyond enumerable compound libraries. *Drug Discovery Today.* **2019**, 24 (5), 1148-1156.

36. Neumann A., Marrison L., Klein R. Relevance of the Trillion-Sized Chemical Space “eXplore” as a Source for Drug Discovery. *ACS Med. Chem. Lett.* **2023**, 14 (4), 466-472.

37. Niek van Hilten, Chevillard F., Kolb P. Virtual Compound Libraries in Computer-Assisted Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, 59 (2), 644-651.

38. Bellmann L., Klein R., Rarey M. Calculating and Optimizing Physicochemical Property Distributions of Large Combinatorial Fragment Spaces. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, 62 (11), 2800-2810.

39. Grygorenko O. O., Radchenko D. S., Dziuba I., Chuprina A., Gubina K. E., Moroz Y. S. Generating Multibillion Chemical Space of Readily Accessible Screening Compounds. *iScience.* **2020**, 23 (11), 101681.

40. Sadybekov A. A., Sadybekov A. V., Liu Y. et al. Synthon-based ligand discovery in virtual libraries of over 11 billion compounds. *Nature*. **2022**, *601*, 452-459.
41. Baell J. B., Holloway G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2719-2740.
42. Walters W. P., Stahl M. T., Murcko M. A. Virtual screening - an overview. *Drug Discov. Today* **1998**, *3*, 160-178.