

На правах рукописи



НОВИКОВА
Дарья Сергеевна

**РАЗРАБОТКА БЛОКАТОРОВ АВТОИНГИБИТОРНОГО ДОМЕНА
АМФК НА ОСНОВЕ ЗАВИСИМОСТИ IN SILICO–IN VITRO
АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 3-БЕНЗИЛИДЕНОКСИНДОЛА**

Специальность: 02.00.16 – Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург
2020

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная фармакология» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)».

Научный руководитель:

Трибулович Вячеслав Генрихович

кандидат химических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная фармакология» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Официальные оппоненты:

Тенникова Татьяна Борисовна

доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая межкафедральной лабораторией биомедицинской химии Института химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Кудрявцев Константин Викторович

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной фармакологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

Защита состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета Д 002.102.01 при ИФАВ РАН по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИФАВ РАН и на сайте ИФАВ РАН: www.ipac.ac.ru.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



к.х.н. С.В. Афанасьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия в связи с развитием технологий наблюдается нарушение баланса между питанием и двигательной активностью населения в развитых странах. Малоподвижный образ жизни и избыточное потребление способствуют развитию ряда заболеваний, ассоциированных с нарушением метаболических процессов. К таким заболеваниям в первую очередь относятся диабет, ожирение, сердечно-сосудистые патологии, метаболический синдром, рак.

Считается, что воздействие на основные биохимические процессы, осуществляющие поддержание энергетического баланса, является действенным подходом при терапии заболеваний, связанных с нарушением метаболических функций. Было показано, что основным регуляторным элементом энергетического сигнального каскада является АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК). В условиях различных стрессовых состояний, а также при физических нагрузках происходит активация АМФК, запускающая множественные процессы, направленные на энергосбережение в условиях создавшегося энергодефицита.

При различных патологических состояниях, таких как диабет и ожирение, активность АМФК подавляется, вследствие чего АМФК не может в полной мере реализовывать свои функции энергетического регулятора. Показано, что нарушение регуляции АМФК и АМФК-зависимых сигнальных каскадов лежит в основе патогенеза ряда заболеваний, в том числе метаболического синдрома. Таким образом, стимуляция активности АМФК с помощью фармакологических агентов является перспективным способом борьбы с указанной группой заболеваний.

В настоящее время АМФК находится в центре внимания исследователей и фармацевтических компаний как перспективная терапевтическая мишень. Однако лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию АМФК, в клинической практике пока нет. Исключением является метформин, не прямой активатор АМФК, лекарство первого выбора при диабете 2-ого типа. Несмотря на то, что его противодиабетическое действие лишь частично опосредовано активацией АМФК, препарат успешно применяется при борьбе с ожирением, в терапии метаболического синдрома и онкологических заболеваний.

Таким образом, разработка подходов к активации АМФК и выявление низкомолекулярных соединений, позволяющих восстановить активность фермента в клеточных условиях, являются первоочередными задачами на пути к созданию действенных лекарственных препаратов для борьбы с социально значимыми заболеваниями, ассоциированными с метаболической дисфункцией.

Степень разработанности темы диссертационного исследования

Несмотря на тот факт, что АМФК была идентифицирована более 30 лет назад, многие аспекты функционирования до сих пор остаются неизвестными в связи со сложной структурой киназы и участием в многочисленных сигнальных каскадах. Одним из таких аспектов является роль структурного элемента АМФК, отвечающего за автоингибирование каталитической функции фермента. Предположения о возможности его использования для таргетной активации АМФК высказывались еще до расшифровки трехмерной структуры полноразмерного киназного комплекса. Однако в связи с обнаружением альтернативного аллостерического сайта в результате высокопроизводительного скрининга библиотеки из 700000 соединений, инициированного компаниями Abbott и Novartis, основные силы исследователей были направлены на разработку активаторов АМФК, аффинных к обнаруженной активной области белка.

С 2014 года разработкой подхода к активации АМФК путем блокирования автоингибиторной функции фермента занимается НИЛ «Молекулярная фармакология», созданная на базе СПбГТИ(ТУ) под руководством Дженнаро Мелино в рамках реализации гранта №11.G34.31.0069 Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских ВУЗах.

Цели и задачи диссертационного исследования

Целью диссертационного исследования является разработка активаторов АМФК, действующих путем ингибирования внутримолекулярного взаимодействия между автоингибиторным доменом и киназным комплексом.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- разработка метода синтеза и осуществление направленного синтеза производных ряда 3-бензилиденоксиндола;
- исследование возможности использования в качестве мишени для разработки низкомолекулярных активаторов АМФК внутримолекулярного белок-белкового взаимодействия между автоингибиторным и киназным доменом;
- разработка количественного метода определения способности производных 3-бензилиденоксиндола активировать АМФК в клеточных условиях; валидация результатов клеточных экспериментов с использованием *in vitro* методов;
- определение сайта взаимодействия производных 3-бензилиденоксиндола с каталитической областью АМФК; *in silico* изучение влияния заместителей на целевую активность соединений;
- разработка подхода для создания новых и модификации известных блокаторов автоингибиторного домена на основе корреляции расчетной и экспериментальной активности соединений ряда 3-бензилиденоксиндола.

Научная новизна

С помощью *in silico* методов впервые показана возможность использования в качестве мишени внутримолекулярного белок-белкового взаимодействия автоингибиторного и киназного доменов АМФК. Определен наиболее вероятный сайт связывания низкомолекулярных соединений и предложена расчетная модель для создания новых и оптимизации известных блокаторов автоингибиторного домена.

Доказана возможность активации АМФК за счет ингибирования функции автоингибиторного домена. Установлена прямая зависимость между расчетной энергией связывания низкомолекулярных соединений и активностью АМФК, определенной различными методами.

Впервые предложена схема синтеза 3-бензилиденоксиндолов на основе конвергентной стратегии, позволяющая легко вводить необходимые заместители на разных этапах синтеза. Разработанная схема использована для синтеза сфокусированной библиотеки активаторов АМФК, действующих путем блокирования автоингибиторного домена.

Предложен оригинальный катализатор для первой стадии синтеза 3-бензилиденоксиндолов – конденсации Кневенагеля, позволяющий с хорошими выходами осуществлять взаимодействие между оксиндолами и бензофенонами, малоактивными при иных условиях проведения данного типа реакций.

Создана клеточная тест-система активации АМФК на основе FRET-биосенсора. Показана возможность ее использования как для проведения скрининговых исследований по оценке активности низкомолекулярных соединений по отношению к АМФК, так и для определения кинетики активации АМФК.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе работы была синтезирована сфокусированная библиотека производных 3-бензилиденоксиндола, обладающих различным активирующим потенциалом по отношению к АМФК. Синтезированные соединения могут быть использованы для *in vivo* исследования зависимости эффектов активации АМФК от степени активации субстрата. Предложенная схема синтеза 3-бензилиденоксиндолов может быть использована как для синтеза новых структур, так и для препаративной наработки уже известных активаторов АМФК.

Разработанная методика конденсации Кневенагеля между оксиндолами и бензофенонами представляет практический интерес в связи с тем, что бензилиденный фрагмент часто встречается в структуре биологически активных соединений. Данная методика

может быть использована при синтезе как новых активаторов АМФК, так и других биологически активных соединений.

Тест-система на основе FRET-биосенсора может быть использована для определения степени активации АМФК при воздействии соединений с различным механизмом действия и различных внутриклеточных стимулов. Разработанная методика позволяет проводить исследования активационного процесса в режиме одной клетки (single cell).

Расчетная модель, построенная в ходе работы, может быть использована для поиска новых соединений со скаффолдом, отличным от исследованного, способных активировать АМФК путем ингибирования взаимодействия автоингибиторного и киназного доменов, а также для прогнозирования влияния химических модификаций на целевую активность соединений.

В целом предложенный подход по определению сайта взаимодействия активных соединений, основанный на корреляции расчетных и экспериментальных данных, может быть использован для сложных мишеней, для которых определение области взаимодействия низкомолекулярного агента прямыми методами затруднено.

Методология и методы исследования

В работе были использованы следующие *in silico* и *in vitro* методы: молекулярный докинг, молекулярная динамика, клеточный скрининг для оценки способности веществ активировать АМФК, вестерн-блоттинг для подтверждения активности соединений. Для определения строения и подтверждения чистоты полученных в работе соединений был использован комплекс современных физико-химических методов исследования, включающий рентгеноструктурный анализ, хромато-масс-спектрометрию, спектроскопию ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Для очистки полупродуктов и конечных соединений использовали флэш-хроматографию.

На защиту выносятся:

- схема и метод синтеза 3-бензилиденоксиндолов с использованием алкоголята алюминия на стадии конденсации по Кневенагелю;
- *in vitro* метод на основе FRET-эффекта для количественного определения способности низкомолекулярных соединений вызывать активацию АМФК;
- метод проведения высокоинформативного скрининга с использованием АМПКAR-модифицированных живых клеток;
- метод идентификации активных сайтов АМФК, основанный на корреляции расчетных показателей аффинности низкомолекулярных соединений и экспериментальных данных по биологической активности;
- способ активации АМФК за счет ингибирования функции автоингибиторного домена с помощью производных 3-бензилиденоксиндола.

Степень достоверности результатов проведённых исследований

Исследование выполнено с использованием современных методов медицинской химии. Достоверность экспериментальных результатов и сделанных на их основе выводов подтверждается согласующимися между собой данными, полученными различными методами. Сформулированные в работе выводы научно обоснованы и соответствуют современным научным представлениям.

Апробация работы: основные положения диссертационной работы представлены на VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев 2014» (Санкт-Петербург, 2014), XX Симпозиуме «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» (Москва, 2014), 20-м Европейском симпозиуме EuroQSAR (Санкт-Петербург, 2014), VI Международной конференции молодых ученых «ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ СЕГОДНЯ» InterCYS-2014 (Санкт-Петербург, 2014), XXI Симпозиуме «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» (Москва, 2015), научной конференции грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века» (Москва, 2016), 3rd European Workshop on АМПК (Поркероль, 2017), Third International School-Seminar «From Empirical to Predictive Chemistry» (Казань, 2018), Четвёртом Междисциплинарном Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике «МОБИ-ХимФарма2018» (Новый Свет, 2018), XXVI Международной научной

конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019), 4th European Workshop on AMPK (Лувэн-ла-Нев, 2019). По материалам конференций опубликованы сборники тезисов докладов.

Публикации: по теме диссертации опубликовано 5 работ в изданиях, рекомендуемых ВАК и индексируемых Scopus и Web of Science, а также тезисы 18 докладов на конференциях 2014–2019 года.

Объем и структура работы: диссертация состоит из введения, трёх глав (литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальная часть), заключения, списка сокращений, списка использованной литературы. Материал изложен на 147 страницах, содержит 10 таблиц, 32 рисунка, 8 схем. Список литературы включает 175 ссылок.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Правительства РФ (№11.G34.31.0069 и №14.B37.21.0855), гранта РФФИ (мол.а №14-03-31592) и гранта РНФ (№16-13-10358), а также стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов (СП-1554.2018.4).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Выбор объектов исследования

Активаторы АМФК, проявляющие свою активность за счет блокирования функции автоингибиторного домена, представляют собой уникальные объекты для исследований. Функционируя как активаторы, они фактически являются ингибиторами белок-белкового взаимодействия, что позволяет применять для их разработки классические подходы медицинской химии.

Первой структурой, обладающей антагонистическим действием по отношению к автоингибиторному домену АМФК, стало соединение **PT1**. Для него была показана дозозависимая активация как отдельно взятой α -субъединицы АМФК, так и гетеротримерного киназного комплекса. Соединение **PT1** по ряду причин не нашло широкого применения, однако его дальнейшая модификация позволила выявить серию соединений на основе оксиндольного скаффолда, среди которых наибольшую активность проявило соединение **C24** (Схема 1). Для соединений ряда 3-бензилиденоксиндола был продемонстрирован высокий активирующий потенциал в испытаниях *in vitro*, при этом высокая активность соединения **C24** сохранялась в испытаниях *in vivo*. В целом, выявленная серия показала не только удовлетворительные ADMET характеристики, но и возможность трансляции исследований от клеточных объектов к животным моделям.

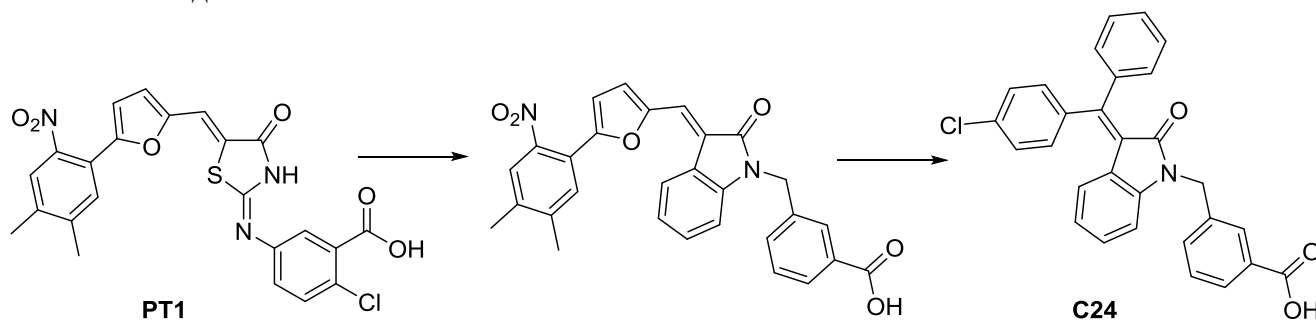


Схема 1 – Эволюция соединения **PT1**, активного по отношению к АМФК.

В качестве объектов исследования наиболее привлекательным представлялся класс 3-бензилиденоксиндолов (Рисунок 1). Выбор был обусловлен следующими факторами:

- данные структуры доступны в качестве объектов исследования ввиду относительной легкости синтеза;

- предполагается, что рассматриваемые соединения активирует АМФК путем блокирования автоингибиторной функции, т.е. они являются ингибиторами внутримолекулярного белок-белкового взаимодействия;
- соединения ряда 3-бензилиденоксинолов обладают активностью по отношению к АМФК, при этом соединение **C24** является наиболее активным, и одновременно одним из наиболее сильных активаторов АМФК, известных на сегодняшний день;
- рассматриваемый класс соединений предоставляет широкие возможности для химической модификации по различным элементам структуры (R_1 , R_2 , R_3 , X; Рисунок 1).

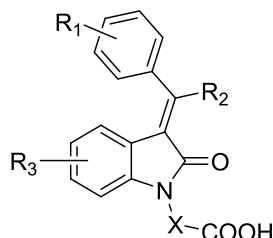


Рисунок 1 – Структура соединений класса 3-бензилиденоксинолов

2 Синтез 3-бензилиденоксинолов

Описанный в литературе метод синтеза соединений типа **C24** заключается в амидировании 3-фенилпропиолевой кислоты анилином, алкилировании метиловым эфиром 3-(бромметил)бензойной кислоты, циклизации образующегося интермедиата с последующим гидролизом сложноэфирной группы (Схема 2). Данная схема соответствует линейной стратегии синтеза, при которой молекула целевого соединения создается путем последовательного введения фенильных колец А-В-С-Д. При синтезе сфокусированных библиотек соединений применение линейной стратегии не является оптимальным ввиду возникновения дивергенции уже на начальных стадиях, что приводит к индивидуализации синтеза и увеличению трудоемкости.

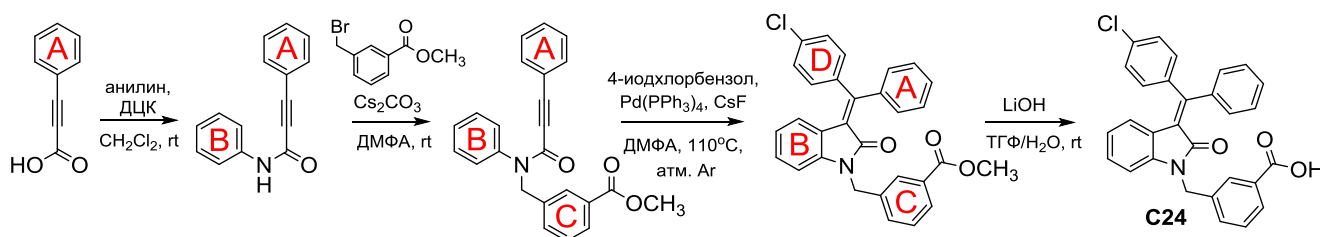


Схема 2 – Линейная схема синтеза соединения **C24**.

Нами было показано, что имеющаяся схема имеет ряд недостатков, ограничивающих ее применение как при синтезе препаративных количеств соединения **C24**, так и получения сфокусированной библиотеки соединений. При отработке и оптимизации синтеза общий выход соединения **C24** не превысил 29%. Наиболее слабым местом схемы оказалась стадия циклизации, на которой может происходить частичное дегалогенирование целевого соединения с образованием трудноотделимого побочного продукта.

Таким образом, представленная в литературе схема синтеза соединения **C24** обладает рядом недостатков, что делает ее малопривлекательной для наработки сфокусированной библиотеки соединений ввиду следующих причин:

- необходимость получения замещенных фенилпропиолевых кислот при введении заместителей в кольцо А;

- обеспечение химического разнообразия до наиболее трудоемкой стадии построения углеродного скелета;
- возможность образования побочных дегалогенированных продуктов при использовании палладиевого катализатора.

Для обеспечения разнообразия структур при синтезе сфокусированных библиотек наиболее подходящей является конвергентная стратегия синтеза. Конвергентная схема синтеза соединения **C24** может быть реализована на основе пути, полученного с использованием процедуры очевидных расчленений (англ. obvious disconnections) в рамках ретросинтетического анализа (Схема 3).

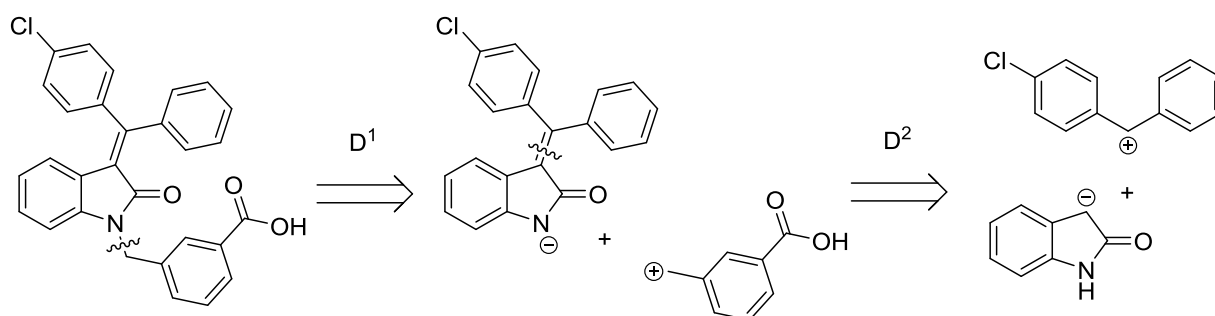


Схема 3 – Ретросинтетический анализ соединения **C24**.

Наиболее простым способом осуществления превращения, обратного стадии D^2 , является проведение конденсации Кневенагеля между оксиндолом и 4-хлорбензофеноном, поэтому для синтеза соединения **C24** была предложена схема синтеза, включающая данную реакцию (Схема 4). Несмотря на то, что оксиндол является неклассическим субстратом для реакции Кневенагеля, его конденсация с альдегидами и алкилфенонами находит широкое применение при синтезе биологически активных молекул. Было показано, что оксиндол легко взаимодействует с рядом альдегидов и алкилфенонов при обычных условиях, тогда как при использовании незамещенного бензофенона и бензофенонов с донорными и акцепторными заместителями в качестве карбонильной компоненты продукт конденсации образовывается в следовых количествах (Таблица 1).

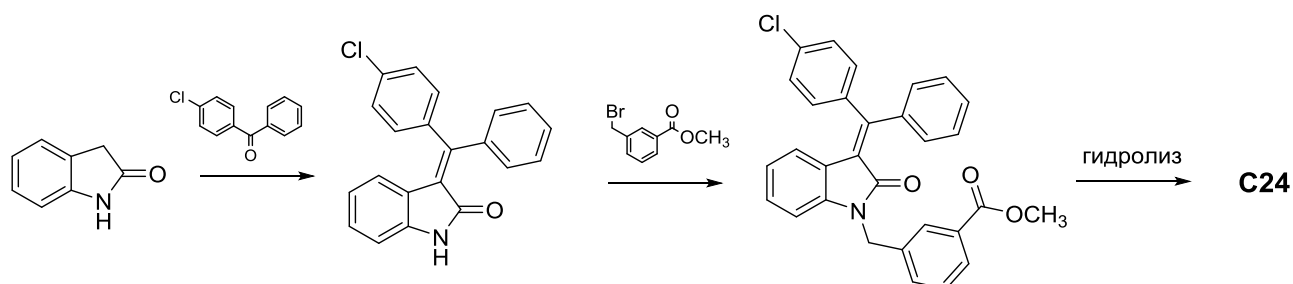


Схема 4 – Конвергентная схема синтеза соединения **C24**.

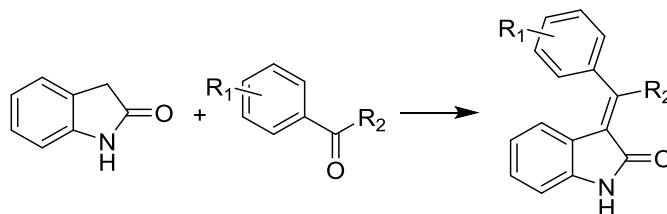
Известно, что бензофеноны существенно хуже вступают в реакцию Кневенагеля по сравнению с альдегидами и кетонами, однако вопрос о разработке процедур, позволяющих проводить конденсацию оксиндолов и бензофенонов, в литературе не рассматривался. Таким образом, одной из задач исследования стала разработка условий реакции Кневенагеля для конденсации оксиндола и 4-хлорбензофенона.

Подбор условий реакции конденсации осуществляли путем варьирования растворителей и используемых оснований. Однако существенной конверсии исходных реагентов в рамках классических методик добиться не удалось. Лишь при использовании эквимольных добавок ацетата аммония к реакционной массе выход целевого продукта составил 20% (Таблица 2).

Также была оптимизирована вторая стадия синтеза, заключающаяся в *N*-алкилировании образовавшегося 3-бензилиденоксиндола метиловым эфиром 3-(бромметил)бензойной кислоты. Для выбора оптимальной методики реакция была проведена в наиболее часто используемых для *N*-алкилирования условиях. Наибольший выход целевого продукта был получен при использовании трех эквивалентов карбоната калия в ДМФА (Таблица 3).

На заключительной стадии синтеза был использован щелочной гидролиз в водном ТГФ, позволяющий получать целевые кислоты с практически количественным выходом.

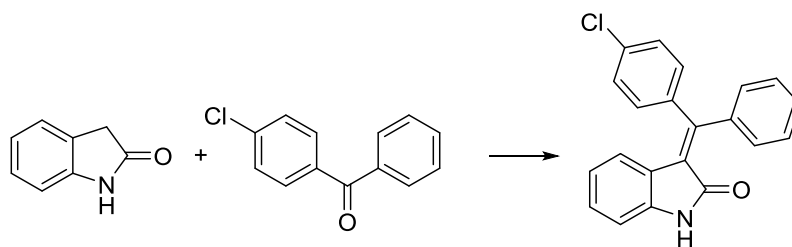
Таблица 1 – Конденсация Кневенагеля карбонильных соединений с незамещенным оксиндолом. Условия: кипячение в толуоле с насадкой Дина-Старка в присутствии пирролидина.



№	R ₁	R ₂	Время реакции, ч	Выход, %
1	4-Cl	H	0.25	96 ^a
2	2-Cl	H	3	72 ^b
3	H	CH ₃	0.5	94 ^b
4	4-Cl	CH ₃	1	91 ^b
5	2-Cl	CH ₃	3	65 ^b
6	H	C ₂ H ₅	2	85 ^b
7	H	n-C ₃ H ₇	2	76 ^b
8	3',4'-метилендиокси	CH ₃	1	80 ^b
9	H	Ph	24	следы
10	4-Cl	Ph	24	следы ^a
11	4-OCH ₃	Ph	24	следы ^a

^a Смесь *E,Z*-изомеров. ^b Преимущественно *E*-изомер.

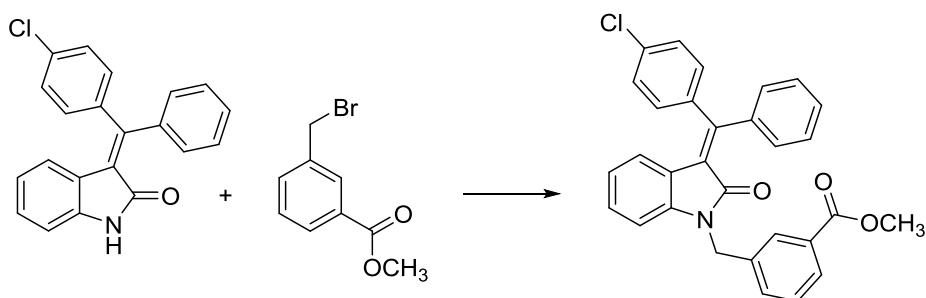
Таблица 2 – Подбор условий конденсации Кневенагеля оксиндола с 4-хлорбензофеноном.



№	Основание	Эквивалент	Растворитель	Выход, %
1	пиперидин	2	этанол	следы
2	NH ₃	избыток ^a	толуол	следы
3	NaNH	1.1	ТГФ	8
4	NaNH	1.1	ДМФА	6
5	NaOH	1	этанол	5
6	NaOH	1	бутанол	7
7	NH ₄ COOCH ₃	избыток ^a	толуол	20

^a Около 10 экв.

Таблица 3 – Оптимизация условий *N*-алкилирования метиловым эфиром 3-(бромметил)бензойной кислоты.



№	Основание	Эквивалент	Растворитель	Выход, %
1	Na ₂ CO ₃	3	DMF	4
2	K ₂ CO ₃	3	DMF	93
3	NaN	1.5	ТГФ	62
4	NaN	1.1	DMF	78–83
5	ТЭА	3	DMF	следы
6	ТЭА	3	толуол	29
7	K ₂ CO ₃	3	DMCO	47
8	K ₂ CO ₃	3	ацетон	34

3 Al-опосредованная конденсация Кневенагеля

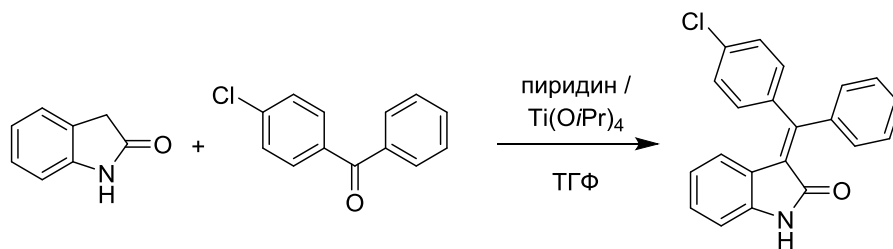
Несмотря на существенное увеличение выхода конденсации Кневенагеля между оксиндолами и бензофенонами при использовании ацетата аммония в качестве основания, данная методика не подходит для наработки препаративных количеств и получения серии соединений. Среди многочисленных методов конденсации, предложенных за последние годы, наиболее интересным оказалось применение системы изопробилат титана/пиридин для получения продуктов конденсации Кневенагеля, в том числе при использовании незамещенного оксиндола в качестве субстрата.

В ходе разработки методики конденсации Кневенагеля было показано, что система изопробилат титана/пиридин может быть использована при синтезе бензофеноновых производных. При этом выход реакции существенно изменяется в зависимости от качества используемых реагентов, в частности, длительное хранение изопробилата титана способствует падению выхода продукта конденсации вплоть до следовых количеств (Таблица 4).

Конденсация между оксиндолами и бензофенонами в присутствии изопробилата титана позволила предположить возможность использования других алкоколятов. При поиске менее капризного, но не менее эффективного конденсирующего агента, был предложен изопробилат алюминия. Несмотря на то, что гетерогенный катализ аналогичных субстратов на оксиде алюминия описан в литературе, не было обнаружено каких-либо упоминаний об использовании алкоколятов алюминия для гомогенного катализа реакции Кневенагеля. Практическая ценность изопробилата алюминия обусловлена его физико-химическими свойствами, позволяющими легко получать данный агент в лабораторных условиях.

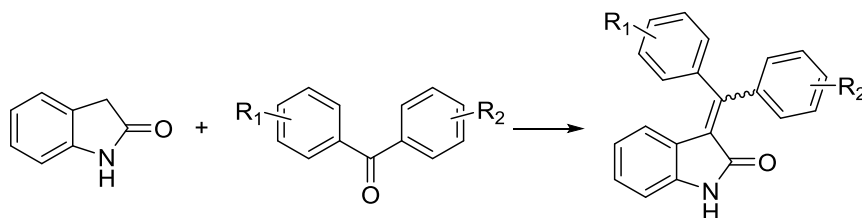
Изопробилат алюминия был выбран для проведения конденсации Кневенагеля между оксиндолом и различными бензофенонами (Таблица 5). Несмотря на то, что изопробилат алюминия показал близкую к изопробилату титана каталитическую активность, его применение оказалось более целесообразным ввиду меньшей склонности к гидролизу, не оказывающей фатального влияния на способность катализировать реакцию Кневенагеля. Было показано, что применение изопробилата алюминия позволяет получать продукты конденсации с функциональными группами в бензофеноновом фрагменте, такими как гидроксильная группа.

Таблица 4 – Конденсация Кневенагеля в присутствии изопропилата титана.



№	Длительность хранения Ti(OiPr) ₄	Температура, °С	Выход, %
1	–	25	58
2	–	60	86
3	2 дня	60	34
4	5 дней	60	следы

Таблица 5 – Алюминий-катализируемая конденсация Кневенагеля.



№	R ₁	R ₂	Выход ^a , %
1	H	H	76
2	2-Cl	H	80
3	4-Cl	H	82
4	4-Cl	4-Cl	86
5	4-Cl	2,4-Cl	83
6	4-OH	H	77
7	4-OCH ₃	H	73
8	3-CH ₃	4-Cl	83
9	3-CH ₃	4-OH	80
10	4-CH ₃	4-Cl	79
11	4-CH ₃	4-OH	72

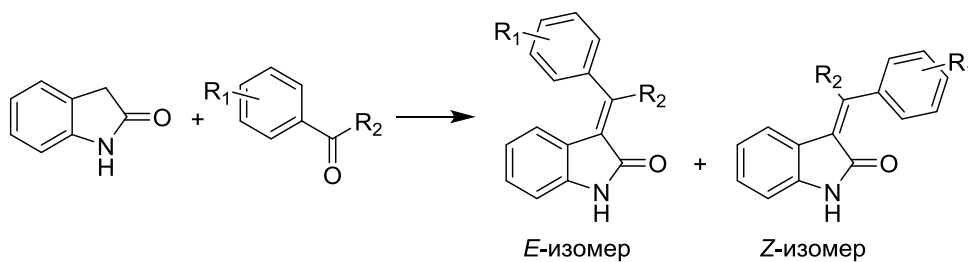
^a Общий выход (для *E*- и *Z*-изомера).

4 Определение пространственной конфигурации 3-бензилиденоксиндолов

Известно, что соединения ряда 3-бензилиденоксиндола могут существовать в виде двух изомерных форм (*E*, *Z*), которые при определенных условиях могут переходить одна в другую. В растворе соединения, содержащие 3-метилениндолиноновый фрагмент, находятся в равновесии (Схема 5), достижение которого ускоряется при действии видимого света или УФ-излучения.

Было показано, что возможность перехода одного изомера в другой при существенно разных физико-химических характеристиках изомеров делает возможным получение двух изомеров из изначально изомерно чистого продукта. Для однозначной идентификации продуктов, образующихся при конденсации Кневенагеля, а также для подтверждения сохранения пространственной конфигурации конечных соединений, была использована

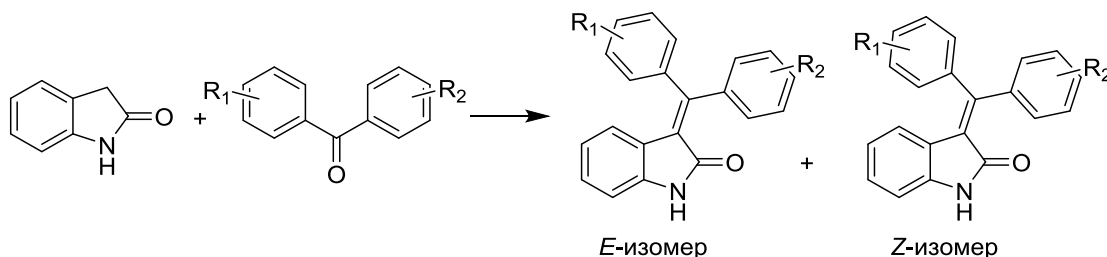
Таблица 6 – Соотношение изомеров при конденсации Кневенагеля в классических условиях.



№	R ₁	R ₂	Соотношение изомеров ^a (E/Z, %)
1	4-Cl	H	63/36
2	2-Cl	H	98/2
3	H	CH ₃	96/4
4	4-Cl	CH ₃	96/4
5	2-Cl	CH ₃	99/1
6	H	C ₂ H ₅	95/5
7	H	n-C ₃ H ₇	95/5
8	3',4'-метилendioкси	CH ₃	98/2
9	4-Cl	Ph	~50/50
10	4-OCH ₃	Ph	~50/50

^a Согласно ¹H ЯМР спектрам после обработки реакционной смеси.

Таблица 7 – Соотношение изомеров при конденсации Кневенагеля в присутствии изопрпилата алюминия.



№	R ₁	R ₂	Соотношение изомеров ^a (E/Z, %)
1	2-Cl	H	63/37
2	4-Cl	H	37/63
3	2,4-Cl	4-Cl	56/44
4	4-OH	H	~50/50
5	4-OCH ₃	H	37/63
6	3-CH ₃	4-Cl	40/60
7	3-CH ₃	4-OH	~50/50
8	4-Cl	4-CH ₃	44/56
9	4-OH	4-CH ₃	~50/50

^a Согласно ¹H ЯМР спектрам после обработки реакционной смеси.

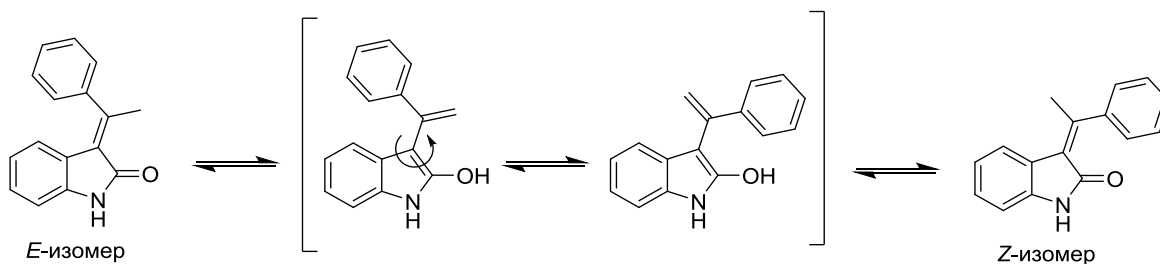


Схема 6 – Таутомерное равновесие для продуктов конденсации оксиндолов с алкилфенонами.

Таким образом, основным результатом химической части настоящего исследования стал синтез сфокусированной серии из 63 соединений ряда 3-бензилиденоксиндола, строение которых было подтверждено совокупностью физико-химических методов.

5 *In silico* исследования

Для подтверждения возможности использования внутримолекулярного белок-белкового взаимодействия между автоингибиторным (AID) и киназным (KD) доменами в качестве мишени для разработки низкомолекулярных активаторов АМФК было проведено детальное изучение взаимодействий в KD–AID структуре (модель 4RED) и выявлены ключевые элементы блокирующей функции автоингибиторного домена.

Проведено моделирование взаимодействия автоингибиторного домена с областью киназного домена с использованием белок-белкового докинга. Показана возможность образования комплексов, близких к данным рентгеноструктурного анализа (Рисунок 3), а также наличие других способов KD–AID взаимодействий. Установлена область преимущественного связывания автоингибиторного домена с каталитической α -субъединицей.

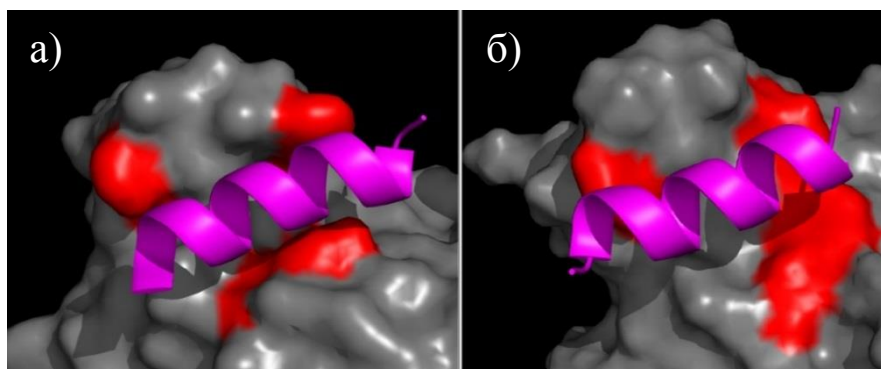


Рисунок 3 – Сравнение данных рентгеноструктурного анализа (а) и белок-белкового докинга (б). Пурпурным показан участок автоингибиторного домена α 1:320–333, красным выделены аминокислотные остатки His-17, His-42 и Tyr-82.

На основе анализа данных белок-белкового докинга участка автоингибиторного домена к киназному домену α -субъединицы сделаны выводы о возможности взаимодействия автоингибиторного домена с областью киназного домена в полноразмерном комплексе АМФК, возможном внутримолекулярном и межмолекулярном характере этого взаимодействия, а также о смещении сайта внутримолекулярного взаимодействия автоингибиторного домена в более липофильную область по сравнению с имеющимися данными.

Исследование *in silico* активности синтезированных структур было проведено с помощью метода молекулярного докинга. Учитывая, что в клеточных условиях АМФК комплекс находится в равновесии между активным и неактивным состоянием, в качестве

белковых мишеней использовались как неактивные гетеротримерные комплексы, так и комплексы в активированном состоянии (Таблица 8).

Таблица 8 – Характеристика PDB моделей АМФК, использованных для молекулярного докинга синтезированных структур.

№	PDB код	Описание модели	Состояние
1	4REW	Комплекс $\alpha 1\beta 2\gamma 1$	неактивный
2	4RER	Комплекс $\alpha 1\beta 2\gamma 1$	активный
3	4RED	Димер $\alpha 1\text{KD}-\text{AID}$	неактивный
4	4QFG	Комплекс $\alpha 1\beta 1\gamma 1$	неактивный
5	4QFR	Комплекс $\alpha 1\beta 1\gamma 1$	активный

Ограничение области докинга проводили на основании предварительных экспериментов с учетом данных о протеолитических мутациях. В связи с выявленными конформационными различиями в предполагаемой области связывания, для моделей 4QFG и 4QFR рассматривали два перекрывающихся сайта связывания (условно сайт А и сайт В). При проведении расчетного эксперимента использовалась процедура гибкого докинга, реализуемая в программном пакете GOLD Suite v5.2.2. В результате был получен массив данных, содержащий набор оптимальных укладок для каждого исследуемого соединения во всех рассматриваемых сайтах связывания и значения оценочных функций, соответствующих этим укладкам. Максимальное значение скоринговой функции GoldScore было использовано в качестве величины расчетной активности (Таблица 9).

Анализ полученных данных показал увеличение значения расчетной активности с увеличением липофильности исследуемых соединений при использовании всех моделей, подтверждающее липофильный характер сайта связывания. Более высокие значения функции GoldScore были получены при докинге серии 3-бензилиденоксиндолов с использованием моделей 4REW и 4RED, а при использовании модели 4RED для укладок соединений с наилучшими значениями функции GoldScore наблюдались максимальные или близкие к максимальным оценочные показатели ChemScore, Lipo, ΔG .

Детальный анализ профиля связывания исследуемых соединений выявил ряд особенностей и объяснил различия в значениях функции GoldScore для разных моделей и сайтов. В частности, было показано, что соединения с бензильным фрагментом демонстрируют профиль взаимодействия, имитирующий структуру автоингибиторного домена (Рисунок 4). Этот факт указывает на значение данного структурного элемента для проявления целевой активности соединений ряда 3-бензилиденоксиндола.

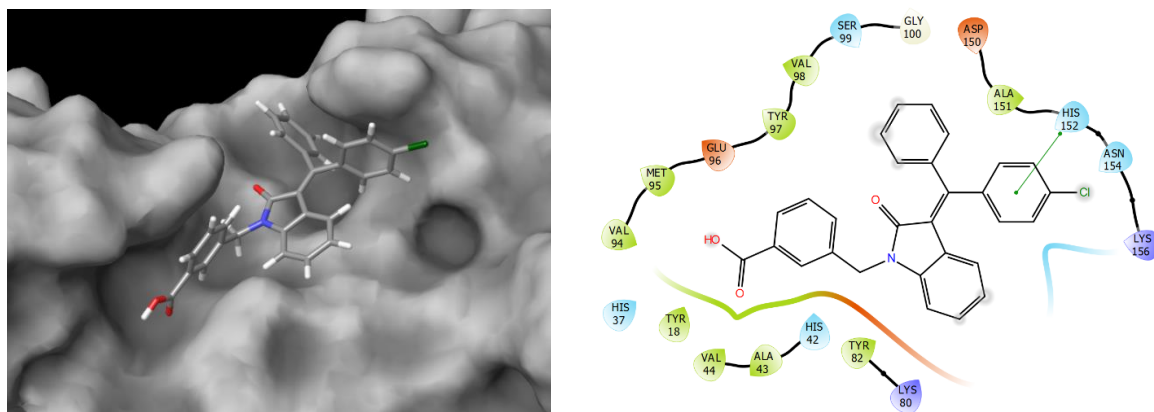


Рисунок 4 – Укладка (*E*)-3-((3-((4-хлорфенил)(фенил)метил)-2-оксоиндолин-1-ил)метил)бензойной кислоты (соединение C24) при докинге по модели 4RED.

6 *In vitro* исследования

При выборе метода исследования особое внимание было уделено флуоресцентным методам, позволяющим визуализировать исследуемые биологических процессы как *in vitro*, так и *in vivo*. Среди таких методов особое место занимают FRET-биосенсоры (Förster resonance energy transfer). Использование FRET-биосенсора, специфичного к АМФК и экспрессируемого в клеточных условиях, позволяет измерять непосредственно киназную активность АМФК без специальной обработки клеток, что позволяет получить более достоверные данные. Очевидным преимуществом FRET-биосенсора активности АМФК является возможность мониторинга активности субстрата во времени.

АМПКАР представляет собой сенсор киназной активности, специфичный по отношению к АМФК, на основе пары цианового (CFP) и желтого (YFP) флуоресцентного белка (Рисунок 5). Его функционирование определяется специфичностью лигандного и субстратного доменов, соединенных гибким линкером. При активации АМФК осуществляется фосфорилирование субстратного мотива по треониновому остатку, которое распознается лигандным доменом, что приводит к сближению флуорофоров, расположенных по концам сенсора, и возможности осуществления переноса энергии (FRET-эффекта).

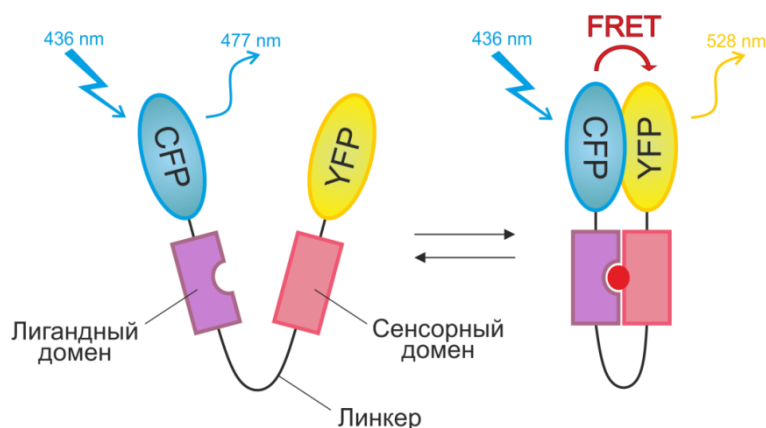


Рисунок 5 – FRET-биосенсор на основе цианового (CFP) и желтого флуоресцентного белка (YFP).

Данный сенсор был положен в основу клеточной тест-системы для оценки активности АМФК. При создании тест-системы была использована плазида, несущая в себе конструкцию АМПКАР. Выбор клеточной линии H1299 (немелкоклеточный рак легкого человека) обусловлен рядом сформулированных критериев. Встраивание генной конструкции в клетки проводили путем лентивирусной трансфекции. Валидацию полученной тест-системы проводили с использованием известных активаторов АМФК в различных режимах (Рисунок 6).

Полученные результаты демонстрируют адекватный ответ клеточной тест-системы на обработку известными активаторами АМФК, несмотря на небольшой диапазон значений Δ FRET, обусловленный спецификой эффекта FRET. Таким образом, было установлено, что тест-система пригодна для использования в высокопроизводительных скрининговых исследованиях.

Активность всех синтезированных соединений была исследована с использованием разработанного нами метода определения степени активации АМФК на основе FRET-биосенсора. В качестве экспериментальной активности рассматривалась максимальная величина Δ FRET (Таблица 9), соответствующая отношению интенсивности флуоресценции YFP и CFP, отнесенному к контрольному значению. Было показано, что максимальное значение экспериментальной активности достигается через 50 мин после начала эксперимента для всех исследованных 3-бензилиденоксинолов.

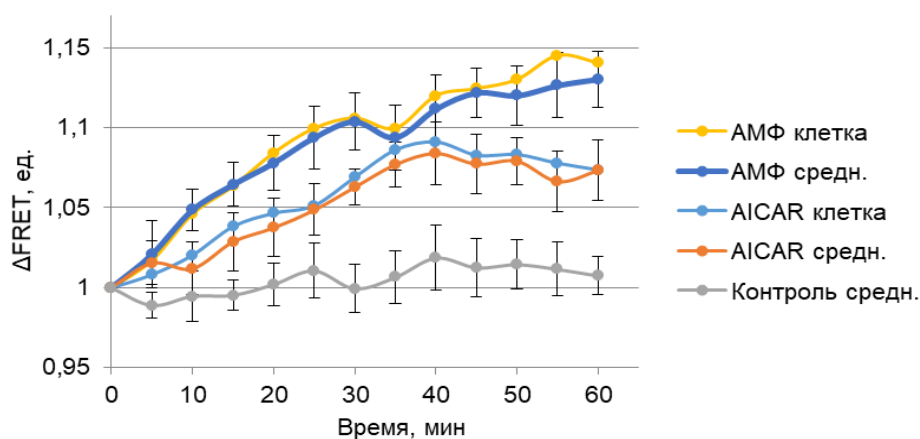
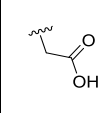
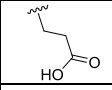
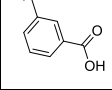
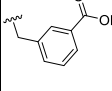


Рисунок 6 – Реакция клеточной модели активации АМФК на АМФ и АИКАР. Кривые «АМФ клетка» и «АИКАР клетка» соответствуют FRET-эффекту, измеренному для отдельной клетки.

Таблица 9 – Значения липофильности и активности соединений ряда 3-бензилиденоксииндола, полученные расчетными методами, а также активность соединений, измеренная с использованием клеточной тест-системы активации АМФК.

				logP	4REW	4RER	4RED	4QFG		4QFR		ΔFRET, ед.*
R	R ₁	R ₂	R ₃					A	B	A	B	
	2-Cl	H	H	3,25	39,4	40,0	40,5	39,6	39,7	41,2	40,2	0,99
	4-Cl	H	H	3,25	39,9	40,2	40,2	39,4	39,8	41,4	40,5	0,98
	H	CH ₃	H	2,80	40,0	40,1	41,3	40,5	41,9	42,5	38,2	1,04
	H	CH ₃	5-Cl	3,58	39,8	40,8	43,9	38,8	39,2	42,5	39,2	1,17
	H	CH ₃	5-Br	3,54	40,4	41,0	44,3	38,8	39,4	42,6	39,7	1,12
	H	CH ₃	6-Cl	3,60	43,0	40,8	41,5	38,9	39,4	40,5	38,0	1,08
	2-Cl	CH ₃	H	3,58	41,0	40,2	40,3	39,4	39,2	42,2	38,8	1,10
	4-Cl	CH ₃	H	3,50	39,2	40,3	44,4	41,5	40,7	41,7	39,9	1,16
	4-Cl	CH ₃	5-Cl	4,10	40,7	40,2	43,7	40,3	41,4	46,1	39,3	1,21
	H	C ₂ H ₅	H	3,33	39,1	39,4	43,8	42,5	40,0	43,2	38,7	1,01
	H	C ₂ H ₅	5-Cl	3,91	39,4	40,1	42,3	38,6	40,1	42,6	39,7	1,05
	H	C ₃ H ₇	H	3,67	38,9	40	41,9	35,2	40,2	42,0	39,3	1,00
	3',4'-метилен-диокси	CH ₃	H	2,19	39,2	40,1	42,3	35,9	39,7	41,7	39,4	1,00
	H	Ph	H	3,93	40,7	40,3	44,4	34,9	42,3	41,5	42,0	1,26
	H	Ph	5-Cl	4,55	41,3	40,9	45,1	39,6	42,4	45,2	41,1	1,28
	H	Ph	6-Cl	4,58	41,5	40,7	44,9	39,2	44,5	44,3	43,2	1,19
	2-Cl	Ph	H	4,57	40,7	40,6	43,6	38,4	40,8	42,6	40,5	1,22
	H	2-Cl-Ph	H	4,57	41,4	40,2	45,1	39,6	40,6	43,1	39,9	1,21
	4-Cl	Ph	H	4,54	43,5	43,2	45,6	37,6	44,5	44,2	42,3	1,35
	H	4-Cl-Ph	H	4,54	42,9	44,3	46,3	37,1	41,8	43,9	43,8	1,47
4-Cl	Ph	5-Cl	5,17	44,1	43,5	45,7	40,2	42,2	45,2	44	1,40	

Таблица 9 (Продолжение).

	H	4-Cl-Ph	5-Cl	5,17	43,5	42,4	45,8	39,6	45,0	44,7	43,4	1,36
	4-Cl	4-Cl-Ph	H	5,14	42,3	41,7	46,3	41,1	44,3	44,0	48,5	1,32
	OH	Ph	H	4,45	41,8	43,1	44,7	38,9	41,4	43,9	40,8	1,20
	H	4-OH-Ph	H	4,45	40,9	42,4	44,5	38,8	41,5	43,8	40,6	1,20
	OCH ₃	Ph	H	3,97	41,5	42,7	45,3	40,3	43,1	46,5	42,3	1,27
	H	4-OCH ₃ -Ph	H	3,97	41,8	40,8	42,9	39,6	42,5	43,0	41,7	1,28
	H	CH ₃	H	2,92	39,3	38,9	40,8	35,7	39,7	40,8	39,0	1,00
	H	CH ₃	H	4,02	40,5	41,8	40,4	36,9	39,4	40,2	38,5	1,08
	4-Cl	CH ₃	H	4,39	42,1	41,3	41,4	38,4	40,0	41,5	39,6	1,12
	H	Ph	H	5,01	41,4	41,2	43,4	37,7	40,2	40,9	39,3	1,17
	2-Cl	H	H	4,35	40,5	40,7	41,7	38,0	39,8	42,0	40,1	1,03
	4-Cl	H	H	4,34	40,2	40,9	41,2	38,2	40,3	43,1	39,7	1,03
	H	CH ₃	H	3,90	47,5	47,5	50,4	43,5	45,5	49,3	53,0	1,53
	H	CH ₃	5-Cl	4,50	46,6	47,6	50,8	45,2	45,8	48,6	52,5	1,55
	2-Cl	CH ₃	H	4,52	48,1	47,7	49,9	42,3	47,3	45,7	49,0	1,45
	4-Cl	CH ₃	H	4,46	49,5	47,5	51,6	46,0	46,0	51,4	48,6	1,71
	H	C ₂ H ₅	H	4,66	49,3	46,3	50,5	42,9	48,1	46,6	47,6	1,43
	3',4'-метилendioкси	CH ₃	H	3,77	46,8	45,4	49,4	45,6	48,5	47,8	47,9	1,39
	H	Ph	H	4,87	54,9	45,8	54,5	46,3	47,7	52,1	48,5	1,89
	H	Ph	5-Cl	5,71	54,3	47,9	55,7	46,1	48,8	54,4	49,3	1,92
	H	Ph	6-Cl	5,68	52,4	49,7	54,5	44,5	48,2	50,1	47,7	1,78
	2-Cl	Ph	H	5,72	54,5	50,1	55,8	44,9	47,5	54,3	46,9	1,80
	H	2-Cl-Ph	H	5,72	54,2	48,8	56,1	45,7	49,1	51,2	48,0	1,81
	4-Cl	Ph	H	5,62	57,7	50,7	56,9	47,4	49,3	50,6	48,4	2,00
	H	4-Cl-Ph	H	5,62	50,6	47,2	54,6	48,3	48,6	55,3	46,2	1,83
	4-Cl	Ph	5-Cl	6,48	56,7	48,1	55,9	46,9	48,5	54,4	48,0	1,95
	H	4-Cl-Ph	5-Cl	6,48	55,9	48,8	54,8	47,2	49,6	52,8	47,8	1,89
	4-Cl	4-Cl-Ph	H	6,42	55,4	47,5	54,3	46,3	47,6	54,1	48,9	1,88
	2,4-Cl	4-Cl-Ph	H	7,09	54,6	49,3	55,0	48,6	50,8	52,9	51,9	1,77
	4-Cl	2,4-Cl-Ph	H	7,09	55,1	49,9	55,1	49,1	51,1	51,4	52,5	1,72
	OH	Ph	H	5,27	52,3	48,4	54,5	47,7	48,1	48,7	47,2	1,51
	H	4-OH-Ph	H	5,27	53,0	47,2	53,9	46,8	47,6	46,5	46,7	1,62
	OCH ₃	Ph	H	5,08	55,2	46,5	53,7	48,4	45,9	49,3	44,5	1,63
	H	4-OCH ₃ -Ph	H	5,08	54,8	44,7	52,5	48,2	45,5	46,3	44,1	1,59
	3-CH ₃	4-Cl-Ph	H	5,90	53,1	47,8	54,2	46,1	44,3	47,2	45,6	1,68
	4-Cl	3-CH ₃ -Ph	H	5,90	53,4	49,1	55,0	46,0	45,1	45,0	45,6	1,69
	3-CH ₃	4-OH-Ph	H	5,61	49,9	45,7	53,9	43,7	43,2	44,9	42,4	1,49
4-OH	3-CH ₃ -Ph	H	5,61	50,3	44,2	54,2	44,0	42,8	45,2	42,7	1,55	
4-Cl	4-CH ₃ -Ph	H	5,92	53,7	48,4	56,0	42,5	46,6	47,1	48,0	1,73	
4-CH ₃	4-Cl-Ph	H	5,92	54,0	48,2	55,7	44,3	47,0	46,8	47,0	1,69	
4-OH	4-CH ₃ -Ph	H	5,61	52,8	46,5	53,7	43,6	48,8	44,3	49,7	1,50	
4-CH ₃	4-OH-Ph	H	5,61	51,9	46,1	53,9	43,9	49,7	44,6	50,6	1,55	

* Соответствует англ. RFU (relative fluorescent units)

Анализ полученных данных выявил ряд закономерностей структура–активность. В частности, для двух производных, являющихся продуктами конденсации оксиндола с альдегидами, была показана определенная ингибирующая активность по отношению к АМФК, что согласуется с литературными данными об ингибирующей активности данного структурного подкласса по отношению к киназам. Также отмечена тенденция к увеличению экспериментальной активности при увеличении липофильности соединений, при этом введение в структуру алкильных цепочек в различных положениях приводило к снижению активности.

В соответствие с полученными результатами, все синтезированные соединения были разделены на четыре группы в соответствии с проявляемой способностью активировать АМФК, что предполагается использовать для последующих экспериментов по исследованию зависимости активность–терапевтический эффект. Подтверждение АМФК-стимулирующей активности проводили методом вестерн-блоттинга для наиболее перспективных представителей из каждой группы активности. С использованием данного метода оценивали степень фосфорилирования мишеней АМФК (АСС и Raptor) и непосредственно АМФК по основному активационному сайту. Было показано, что результаты вестерн-блоттинга согласуются с данными по активности соединений, полученными на клеточной тест-системе.

7 Сопоставление данных расчетной и экспериментальной активности 3-бензилиденоксиндолы

При исследовании соединений, проявляющих целевую активность, одной из первостепенных задач является определение биологической мишени и, в частности, активного сайта, воздействие на который вызывает целевой эффект. АМФК является достаточно сложной мишенью, так как она представляет собой гетеротримерный комплекс, подверженный существенным конформационным перестройкам. Для блокаторов автоингибиторного домена, несмотря на их перспективность, не было выработано фармакофорной гипотезы, как это было сделано для АМФ-миметиков и активаторов АDaM-сайта. Это связано как с высокой подвижностью автоингибиторного домена, его вовлеченностью в процесс аллостерической активации полноразмерного комплекса, так и с повышенным вниманием фармацевтических компаний к разработке активаторов АМФК, действующих по АDaM-сайту.

В случае блокаторов автоингибиторного домена для определения наиболее вероятной области связывания был применен комплексный подход с привлечением компьютерного моделирования. Была получена сфокусированная серия соединений, проявляющих различную активирующую способность по отношению к АМФК. Построение корреляционных зависимостей «расчетная активность»–«экспериментальная активность» осуществляли с использованием данных, полученных при докинге серии 3-бензилиденоксиндолы по различным белковым моделям, и экспериментальной активности, измеренной с помощью клеточной тест-системы активации АМФК (Таблица 9). При этом в качестве расчетной активности использовали величину GoldScore, хорошо зарекомендовавшую себя при построении корреляционных зависимостей.

Анализ зависимостей, построенных для моделей 4QFR и 4QFG, не выявил существенной корреляции между значениями расчетной и экспериментальной активности для всех исследованных сайтов (Рисунок 7). Несмотря на это, более высокий коэффициент корреляции, показанный для сайта А модели 4QFR, может указывать на существование липофильных участков в рассматриваемой области киназного домена АМФК, являющихся наводчиками на целевой сайт для исследуемой серии соединений.

Более высокие значения величины R^2 наблюдались при построении корреляционных зависимостей для моделей 4RER и 4REW (Рисунок 8). Интересно отметить, что значения расчетной энергии, полученные при использовании модели 4REW, оказались в целом выше несмотря на то, что данная модель представляет собой неактивный комплекс АМФК. Полученные результаты можно объяснить, предполагая равновесный характер процесса

активации АМФК, при котором исследуемые соединения обладают большим сродством к мишени в ее неактивной форме.

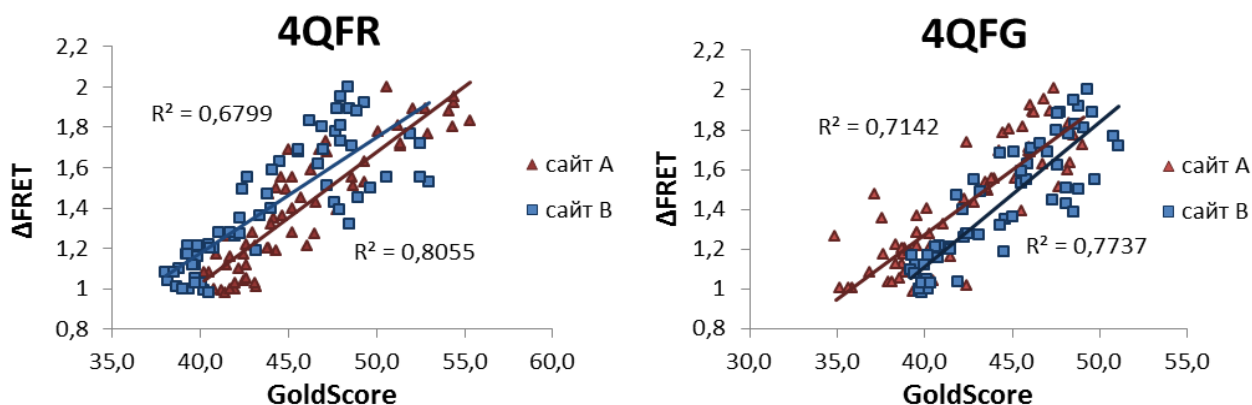


Рисунок 7 – Зависимости «расчетная активность–экспериментальная активность», полученные при использовании моделей с конформационной лабильностью остатка Arg-72.

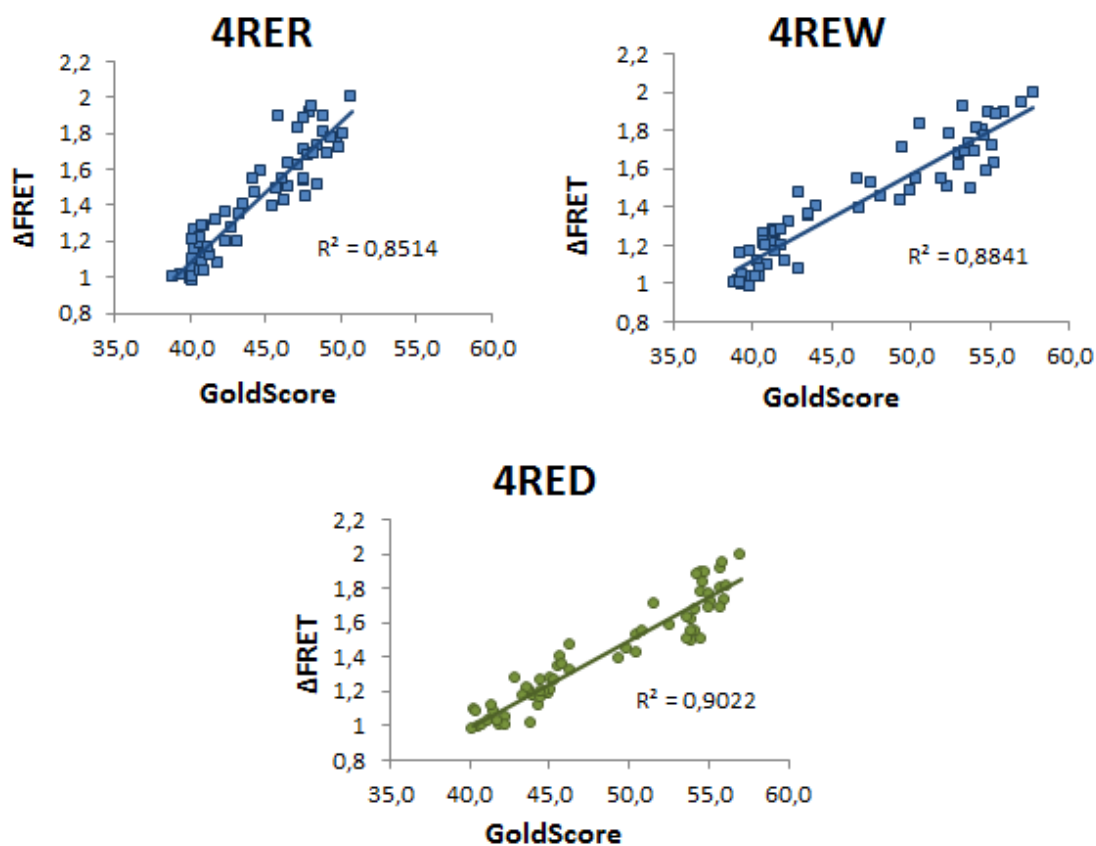


Рисунок 8 – Зависимости «расчетная активность–экспериментальная активность» для полноразмерных моделей 4RER и 4REW и димерной модели 4RED.

Лучшая корреляция была получена при использовании модели 4RED (Рисунок 8). Величина скоринговой функции при докинге по этой модели оказалась максимальной среди используемых моделей, при этом наибольшее значение было получено для соединения **C24**. Полученный результат соответствует данным биологических испытаний и литературным данным.

При анализе данных, полученных в ходе докинга по димерной модели 4RED, были зафиксированы рациональные укладки исследуемых соединений в липофильной полости АМФК. В данном случае можно говорить о соответствии пространственной структуры

исследованных 3-бензилиденноксидолов параметрам полости, формирующейся в модели 4RED для связывания автоингибиторного домена. В то же время модель 4RED, по-видимому, представляет собой крайнюю точку процесса автоингибирования, несмотря на то, что данная модель является усеченной в отличие от других полноразмерных моделей, использованных в данной работе.

Проведенное исследование показывает, что моделирование взаимодействия соединений ряда 3-бензилиденноксидола по области киназного домена, ограниченной аминокислотными остатками His-42–Tyr-82–Val-98–Lys-156, адекватно описывает реальный потенциал исследуемых соединений в отношении активации АМФК. Согласно полученным результатам, использование модели 4RED и рассмотрение указанного сайта наиболее целесообразно при поиске активаторов АМФК, действующих путем блокирования автоингибиторного домена, методом виртуального скрининга. Данную модель можно в дальнейшем использовать для модификации исследуемого класса соединений с целью придания структурам необходимых характеристик.

ВЫВОДЫ

1. Создана сфокусированная библиотека производных 3-бензилиденноксидола на базе разработанной схемы и методов синтеза; впервые показана возможность использования алколюлятов алюминия в реакции Кневенагеля.

2. На основании данных компьютерного моделирования установлены особенности внутримолекулярного белок-белкового взаимодействия, обуславливающего переход от активной к неактивной форме каталитической α -субъединицы АМФК.

3. Расчетными методами определен сайт взаимодействия производных 3-бензилиденноксидола с каталитической областью АМФК, приводящий к ингибированию функции автоингибиторного домена; изучено влияния заместителей и геометрической изомерии на целевую активность соединений.

4. Разработан количественный метод определения способности производных 3-бензилиденноксидола активировать АМФК в живых клетках, основанный на FRET-эффекте; достоверность полученных результатов подтверждена параллельным использованием антител к фосфорилированным формам АМФК и ее киназных мишеней.

5. На основе корреляции полученных расчетных и экспериментальных данных установлена возможность использования внутримолекулярного белок-белкового взаимодействия между автоингибиторным и киназным доменами белкового субстрата в качестве мишени для разработки низкомолекулярных активаторов АМФК.

6. Разработан подход для дизайна новых и модификации известных блокаторов автоингибиторного домена на основе корреляции данных расчетной и экспериментальной активности соединений ряда 3-бензилиденноксидола.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Новикова, Д. С.** АМРК: структура, функции и участие в патологических процессах / **Д. С. Новикова**, А. В. Гарабаджиу, Дж. Мелино, Н. А. Барлев, В. Г. Трибулович // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – № 2. – С. 163–183. [Переводная версия: Novikova, D. S. AMP-activated protein kinase: Structure, function, and role in pathological processes // D. S. Novikova, A. V. Garabadzhiu, G. Melino, N. A. Barlev, V. G. Tribulovich // Biochem. (Mosc.). – 2015. – Vol. 80. – № 2. – P. 127–144. DOI: 10.1134/S0006297915020017].

2. **Новикова, Д. С.** Низкомолекулярные активаторы АМФ-активируемой протеинкиназы – модуляторы энергетического метаболизма / **Д. С. Новикова**, А. В. Гарабаджиу, Дж. Мелино,

Н. А. Барлев, В. Г. Трибулович // Известия АН. Серия химическая. – 2015. – № 7. – С. 1497–1517. [Переводная версия: Novikova, D. S. Small-molecule activators of AMP-activated protein kinase as modulators of energy metabolism / D. S. Novikova, A. V. Garabadzhiu, G. Melino, N. A. Barlev, V. G. Tribulovich // Russ. Chem. Bull., Int. Ed. – 2015. – Vol. 64. – № 7. – P. 1497–1517. DOI: 10.1007/s11172-015-1036-x].

3. **Novikova, D. S.** Compounds of plant origin as AMP-activated protein kinase activators / **D. S. Novikova**, G. S. Ivanov, A. V. Garabadzhiu, V. G. Tribulovich // Chemistry and Technology of Plant Substances: Chemical and Biochemical Aspects; Eds. A. V. Kutchin, L. N. Shishkina, L. I. Weisfeld. – Apple Academic Press: New Jersey, 2017. – P. 181–209.

4. **Novikova, D. S.** Advanced palladium free approach to the synthesis of substituted alkene oxindoles via aluminum-promoted Knoevenagel reaction / **D. S. Novikova**, T. A. Grigoreva, A. A. Zolotarev, A. V. Garabadzhiu, V. G. Tribulovich // RSC Adv. – 2018. – Vol. 60. – № 8. – P. 34543–34551. DOI: 10.1039/C8RA07576J.

5. **Novikova, D. S.** Activating effect of 3-benzylidene oxindoles on AMPK: from computer simulation to high-content screening / **D. S. Novikova**, T. A. Grigoreva, G. S. Ivanov, G. Melino, N. A. Barlev, V. G. Tribulovich // ChemMedChem. – 2020. – Vol. 15. DOI: 10.1002/cmdc.202000579 [Epub ahead of print].

Избранные тезисы докладов на конференциях

1. **Новикова Д. С.**, Давидович П. Б., Трибулович В. Г., Барлев Н. А., Гарабаджиу А. В., Мелино Дж. Регулятор энергетического баланса как потенциальная мишень в противораковой терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12 – Вып. 2. – С. 61.

2. **Новикова Д. С.**, Давидович П. Б., Трибулович В. Г., Барлев Н. А., Гарабаджиу А. В., Мелино Дж. Моделирование поведения автоингибиторного домена АМФК // Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием (сборник тезисов). – Москва, 2013. – С. 237.

3. **Новикова Д. С.**, Давидович П. Б., Трибулович В. Г., Барлев Н. А., Гарабаджиу А. В., Мелино Дж. Использование автоингибиторного домена АМФК в качестве потенциальной мишени для разработки лекарственных препаратов // Медико-биологические аспекты химической безопасности. Сборник трудов Всероссийской научной конференции молодых ученых. – СПб.: Изд-во ВВМ, 2013. – С. 88-89.

4. **Новикова Д. С.**, Трибулович В. Г., Гарабаджиу А. В. Разработка блокаторов автоингибиторной функции АМФК // Менделеев-2014. Биоорганическая и медицинская химия. Металлоорганическая и координационная химия. Современный химический катализ и моделирование химических процессов. VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых учёных по химии. Тезисы докладов. – СПб., 2014. – С. 75-76.

5. **Новикова Д. С.**, Давидович П. Б., Трибулович В. Г., Гарабаджиу А. В. Особенности строения АМФ-активируемой протеин киназы как основа для создания активаторов // XXI Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Сборник материалов конгресса (тезисы докладов). – Москва, 2014. – С. 300-301.

6. **Novikova D.**, Garabadjiu A., Melino G., Tribulovich V. Biological activity and isomeric state relationship of 3-alkylideneoxindole derivatives // 20th EuroQSAR abstract book, 2014, P. 125.

7. **Новикова Д. С.**, Гарабаджиу А. В., Трибулович В. Г. E-, Z-Изомеры производных 3-алкилиденноксиндола при разработке активаторов АМФК // VI Международная конференция молодых ученых "ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ СЕГОДНЯ" InterCYS-2014. – СПб.: Издательство "ЛЕМА", 2014. – С. 66.

8. **Новикова Д. С.**, Гарабаджиу А. В., Трибулович В. Г. Разработка активаторов АМФК для терапии раковых заболеваний // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14 – Вып. 1. – С. 114.

9. **Новикова Д. С.**, Гарабаджиу А. В., Трибулович В. Г. Альтернативный сайт взаимодействия блокаторов функции автоингибиторного домена АМФ-активируемой протеин

киназы // XXII Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Сборник материалов конгресса (тезисы докладов). – Москва, 2015. – С. 238-239.

10. **Новикова Д. С.**, Иванов Г. С., Гарабаджиу А. В., Мелино Дж., Трибулович В. Г. Особенности использования клеточной тест-системы активации 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы для скрининга активных соединений // Медико-биологические аспекты химической безопасности: тезисы докладов Всероссийской науч. конф. молодых ученых 1-2 октября 2015 года / под общ. ред. В. Р. Рембовского. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – С. 81-83.

11. Трибулович В. Г., **Новикова Д. С.**, Гарабаджиу А. В. Проблематика компьютерного конструирования АМФ-подобных прямых активаторов АМФ-активируемой протеинкиназы // XXIII Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Сборник материалов конгресса (тезисы докладов). – Москва, 2016. – С. 205-206.

12. **Новикова Д. С.**, Семенов М. С., Гарабаджиу А. В., Трибулович В. Г. Синтез 3-бензилидениндолин-2-онов при формировании сфокусированных библиотек // Сборник тезисов научной конференции грантодержателей РФ «Фундаментальные химические исследования XXI-го века». – Москва, 2016. – С. 484.

13. **Novikova D.**, Barlev N., Garabadzhiu A., Tribulovich V. A mysterious role of the autoinhibitory domain: whether it can be useful for AMPK targeting? // 3rd European Workshop on AMPK, book of abstracts. – 2017. – P21.

14. **Novikova D.**, Grigoreva T., Ivanov G., Garabadzhiu A., Tribulovich V. Binding site prediction for 3-benzylidene oxindoles based on experimental data // Third International School-Seminar "From Empirical to Predictive Chemistry" (April 5–7, 2018, Kazan, Russia): book of abstracts / ed.: T.I. Madzhitov, V.A. Afonina; I.S. Antipin. – Kazan: Kazan University Press, 2018. – P. 54.

15. **Новикова Д. С.**, Григорьева Т. А., Иванов Г. С., Гарабаджиу А. В., Трибулович В. Г. Исследование сайтоспецифичности 3-бензилидениндолин-2-онов с использованием сочетания *in silico* и *in vitro* методов // Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике / под редакцией К. В. Кудрявцева и Е. М. Паниной. – М.: «Перо», 2018. – С. 165.

16. Львова М. Ю., **Новикова Д. С.**, Трибулович В. Г. Исследование каталитической функции изопропилата алюминия при синтезе активаторов АМФК // Сборник тезисов IX научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых в рамках мероприятий, посвященных 150-летию открытия Периодического закона химических элементов Д.И. Менделеевым «НЕДЕЛЯ НАУКИ-2019» (с международным участием). 1–3 апреля 2019 г. – СПб.: 2019. – С. 88.

17. **Новикова Д. С.**, Львова М. Ю. Разработка эффективного метода синтеза серии 3-бензилиденноксиндолов на основе конвергентной стратегии // Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», секция «Химия». – М.: Издательство «Перо», 2019. – С. 626.

18. **Novikova D.**, Chernyavskaya E., Grigoreva T., Ivanov G., Tribulovich V. Development of orally effective stimulators of physical activity // 4th European Workshop on AMPK, book of abstracts. – 2019. – P30.