

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

Доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № _____ засідання кафедри

від « ___ » _____ 20__ р.

**IN VITRO ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРЕДБАЧЕНОЇ ПЕРСПЕКТИВИ
ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ ВИЗНАЧЕНОЇ
МЕТОДАМИ IN SILICO**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності
091 Біологія
ОП «Біоінформатика та структурна біологія»
Алексєєвої Діани Олегівни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к. б. н., доцент **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у науково-виборничому хіміко-біологічному центрі
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
під керівництвом к.б.н. **Бориска Петра Олександровича**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Алексеева Д.О. In vitro дослідження передбаченої перспективи протипухлинної активності визначеної методами in silico – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика та структурна біологія».

У роботі висвітлено in vitro етап тестування сполук на предмет потенційної протипухлинної активності, що була визначена методами in silico для потенційного використання у пошуку та створенні протиракової терапії. Після проведення першого етапу передбачення методами in silico було сформовано припущення про потенційність дослідження сполуки C12C1IM-Cl. На основі отриманих результатів було сформовано етапи перевірки сполуки методами in vitro для їх підтвердження чи спростування. Так були проведені дослідження за допомогою методів TSA, SIRT-Glo та ADP-Glo проти біомішеней SIRT-1, BRD4, Aurora A, Aurora B та JAK2 асоційованих з канцерогенезом, а саме хронічної мієлоїдної лейкемії та нейробластоми. Було підтверджено потенційне комплексотворення з мішенню SIRT-1, що проявилось у зсуві температури плавлення білка. В результаті проведених ензиматичних есеїв було визначено інгібуючу активність цієї сполуки на активність SIRT-1, що корелювало з результатами in silico. Усі ці результати свідчать про ефективність використання створених моделей та використаних методів in silico для подальшого використання у дослідженнях, що може пришвидшити пошук та створення альтернатив для лікування нейробластоми та хронічного мієлоїдного лейкозу та заслуговують на подальше дослідження.

Важливо зазначити, що дані результати пройшли літературні апробацію та були опубліковані у статті з Д. Алексеевою у співавторстві «Anticancer activity features of imidazole-based ionic liquids and lysosomotropic detergents: in silico and in vitro studies» з Алексеевою Д.О. у співавторстві [1].

Ключові слова: in vitro, ХМЛ, НБ, SIRT1, TSA, ADP-Glo, SIRT-Glo.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Проблематика та шляхи пошуку протиракової терапії.....	7
1.2. Молекулярні біомішені асоційовані з онкогезом нейробластоми та хронічної мієлоїдної лейкемії	8
1.2.1. Загальна інформація про SIRT-1	9
1.2.2. Загальна інформація про BRD4	10
1.2.3. Загальна інформація про Aurora A та Aurora B.....	12
1.2.4. Загальна інформація про JAK2	13
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	15
2.1. Обладнання використане для дослідження	15
2.2. Матеріали та реактиви	15
2.3. Схема проведення дослідження.....	16
2.4. Докінг сполук в активний сайт онкологічних біомішеней.....	18
2.5. Загальна інформація про метод TSA.....	19
2.6. Скринінг речовини на SIRT-1 та BRD4	20
2.7. Перевірка сполук на предмет неселективної взаємодії.....	22
2.8. Методи аналізу даних у TSA	23
2.9. Загальний опис методу визначення ензиматичної активності білка за допомогою SIRT-Glo Kinase Assay.....	26
2.10. Скринінг сполук проти SIRT-1 за допомогою SIRT-Glo	27
2.11. Загальний опис ADP-Glo Kinase Assay	29
2.12. Скринінг сполук проти Aurora A/B, JAK2 за допомогою ADP-Glo Kinase Assay	30
2.13. Методи аналізу ензиматичних есеїв.....	32
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	36
3.1. Результати докінгу відібраної сполуки.....	36
3.2. Результати тестування сполуки методом TSA.....	38
3.3. Результати тестування сполуки методом SIRT-Glo та ADP-Glo	41

ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	48

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ХМЛ	–	хронічна мієлоїдна лейкемія
НБ	–	нейробластома
ДМСО	–	диметилсульфоксид
SIRT	–	silent mating type information regulation 2 homolog 1
BD	–	бромодомен
BRD4	–	бромодомен-вмісний білок 4
BET	–	бром і екстратермінальний домен
	–	Bromodomain and Extra-Terminal domain
HTS	–	(High-Throughput Screening)
	–	високопродуктивний скринінг
T _m	–	Температура плавлення
dT _m	–	дельта температури плавлення
АТФ	–	аденозинтрифосфат або аденозинтрифосфорна кислота
АДФ	–	аденозиндифосфат або аденозиндифосфорна кислота
QC	–	(quality control) – контроль якості експерименту
RLU	–	Relative luminescence Units
	–	одиниця вимірювання сигналу люмінесценції
SO	–	(Sypro Orange) – флюорисцентний гідрофобний барвник
TSA	–	(Thermal Shift Assay) – метод визначення зсуву температури плавлення
IC ₅₀	–	Концентрація 50% інгібування
S/B (RS/B)	–	відношення сигналу до фону (signal-to-background)

ВСТУП

Проблема терапії раку є актуальною темою досліджень вже не перший десяток років і залишається такою до сьогодні, тому тема даної дипломної роботи присвячена перевірці шляху дослідженню речовин, що можуть бути використані для пригнічення розвитку онкологічних захворювань. Мішенями дослідження для етапу *in vitro* в ході дослідження були обрані SIRT-1, BRD4, Aurora A/B та JAK2, що є потенційними молекулярними біомішенями, асоційованими з онкогенезом, в тому числі нейробластоми та хронічної мієлоїдної лейкемії. Перевірка сполук відібраних на етапі *in silico* методами *in vitro* є важливими для оптимізації процесу розвитку інтегрованих проєктів та пришвидшенню розвитку перспективних лікарських препаратів.

Метою роботи було тестування *in vitro* відібраної на *in silico* етапі сполуки з потенційною протипухлинною активністю у розрізі нейробластоми та хронічної мієлоїдної лейкемії.

Наступні завдання були поставленні перед виконанням дослідження:

1. Протестувати сполуку на предмет зв'язування з обраними біомішенями методом TSA.
2. Протестувати сполуку на предмет інгібування обраних біомішеней методами визначення ензиматичної активності.
3. Порівняти результати *in vitro* та *in silico* етапів дослідження.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Проблематика та шляхи пошуку протиракової терапії

Проблема терапії раку є актуальною темою досліджень вже не перший десяток років і залишається такою до сьогодні, оскільки є однією з головних причин захворювань і смерті людей у всьому світі[2]. За рахунок високих ризиків смертності, використана терапія також зазвичай асоційована з появою небажаних побічних ефектів, проте співвідношення «ризик-користь» в даному контексті на стороні допомоги пацієнтам побороти хворобу. Так, хіміотерапія залишається стандартним підходом до лікування злоякісних пухлин, особливо на пізніх стадіях, що робить відкриття та розробка альтернативних протипухлинних препаратів з мінімальними побічними ефектами залишається актуальним [4, 5].

У даній роботі увага зосереджена на нейробластомі та хронічній мієлоїдній лейкемії (ХМЛ). Це два типи ракових захворювань, які мають серйозні наслідки для пацієнтів та потребують уваги у розробці та застосуванні ефективних методів лікування.

Нейробластома (НБ) - це тип раку, який утворюється в нервовій тканині і зазвичай починається найчастіше в надниркових залозах. Зазвичай виникає у дітей (згідно з даними American Cancer Society середній вік дітей на момент діагностування - 1-2 роки) і рідко в дорослих[5]. Для дітей, які страждають на нейробластому, ефективні методи лікування є критично важливими для покращення їх шансів на виживання та якості життя. Незважаючи на прогрес у мультимодальному лікуванні, нейробластома (НБ) хворим дітям необхідно впоратися з довгостроковими побічними ефектами високодозової хіміотерапії та опромінення, що вимагає створення покращеної терапії.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) - це тип раку крові, який характеризується надмірним утворенням мієлоїдних клітин у кістковому мозку. ХМЛ може прогресувати повільно та часто залишатися безсимптомною протягом тривалого часу (середній вік діагностування – 64 роки відповідно до даних American Cancer Society[6]), але, якщо не лікувати, вона може перейти в більш агресивну форму або спричинити ускладнення, такі як прогресування до активної лейкемії. Ефективні методи лікування можуть допомогти контролювати хворобу та зменшити ризик ускладнень.

Вважається, що розвиток нових *in silico* підходів для пошуку перспективних препаратів для розвитку

Інтенсивні зусилля з відкриття ліків від раку дедалі більше зосереджуються на визначенні молекулярних шляхів за участю змінених білків, що сприяло прогресу в персоналізованій медицині. Обчислювальні методи значно прискорили цей процес, іноді навіть сприяючи відкриттю нових терапевтичних засобів на основі малих молекул.[7] Ця область досліджень бачила численні історії успіху, зокрема завдяки інтеграції підходів *in silico*. Наприклад, Marção та інші[8] використовували алгоритм машинного навчання для оцінки стовбурності ракових клітин і досліджували вплив (+)-JQ1 на інгібування білків BET, відомі своєю залученістю у низку біологічних процесів, включно з онкогенезом, що стало підґрунтям для подальших відкриттів кандидатів для протиракової терапії.

Їхні висновки, як і багато інших[9], [10] підкреслюють потенціал обчислювальних методів у розумінні та націленні на стовбур раку, що є важливим для розробки точної терапії.

1.2. Молекулярні біомішені асоційовані з онкогенезом нейробластоми та хронічної мієлоїдної лейкемії

На разі особливий напрямок та роль займає ідентифікація потенційних біологічних мішеней для розробки лікарських препаратів. З такою метою були навіть розроблені мапи раку (Cancer Dependency Map[11], [12]), які і можна використовувати у процесі підбору біомішеней дослідження, як додаткове джерело інформації.

Так, у результаті дослідження (на основі отриманих даних) наш інтерес сфокусувався навколо SIRT-1, BRD4, Aurora A, Aurora B, JAK2, які і були використані у дослідженні. Слід зазначити, що SIRT-1, Аврора А та JAK2 розглядалися низкою авторів як перспективні біомішені для розробки ліків різноманітних паталогічних станів, стислий опис яких наведений далі у цій роботі, що також включало створення протипухлинної терапії, у тому числі НБ та типів лейкемії [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21]. BRD4 ж становило додаткову цікавість у контексті порівняння з SIRT-1 оскільки попередні дослідження продемонстрували зв'язок між білками BET і SIRT1[22]. Прикладом такого є те, що у одному з досліджень інгібування BRD4 посилювало регуляцію SIRT1[23], а у іншому таргетування SIRT1 синергетично покращувало протипухлинну дію JQ-1 (інгібітора BRD4) при гепатоцелюлярній карциномі[24].

1.2.1. Загальна інформація про SIRT-1

Сиртуїн 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1), також відомий як НАД-залежна деацетилаза сиртуїн-1, є білком, який у людей кодується геном SIRT1. Цей фермент, розташований головним чином у ядрі клітини. Він деацетилює фактори транскрипції, які сприяють клітинній регуляції (такі як реакція на стресори)[25].

Він може змінювати одну з основних посттрансляційних модифікацій білка, важливих для різних клітинних функцій, через деацетилювання групи за допомогою нікотинамід-аденозин-динуклеотиду (NAD) [26], [27], [28].

Було показано, що SIRT1 має вплив на одразу кілька сигнальних шляхів, такі як аутофагія, репарації пошкодженої ДНК, енергетичний гомеостаз, шлях PI3K/AKT та пригнічення розвитку пухлин[29].

Здебільшого SIRT1 асоційований з розвитком раку не за рахунок надмірної експресії, хоч це і теж є причиною[30], а через свою здатність до деацетилювання. Так за допомогою цього відбувається пригнічення p53, та p73 та p16, що є супресорами пухлин, чим сприяє розвитку та прогресуванню раку[29], [31]. Іншим таким проявом є залучення SIRT1 під час надмірної експресії гена MYCN, один з найважливіших біологічних маркерів нейробластоми. Білок N-MYC активує експресію деацетилази SIRT1, що призводить до його стабілізації та, з рештою, прогресуванню нейробластоми. Вже було з'ясовано, що інгібітори SIRT1 можуть сповільнювати та зупиняти ріст клітин нейробластоми та пухлиноутворення у N-MYC трансгенних мишей[32].

Цікавим є те, що SIRT1 відіграє подвійну роль у пухлиногенезі, діючи і як супресор пухлини, і як онкоген залежно від типу та стадії раку[33], [34]. Експресія SIRT1 різко знижується при різних видах раку, включаючи карциному печінки, і його активація пригнічує ріст раку [35].

Таким чином таргетування SIRT1 є перспективним для створення протиракової терапії, а поглиблене розуміння шляхів цього інгібування та потенційну залученість у інші шляхи допоможуть краще розуміння спектру можливостей.

1.2.2. Загальна інформація про BRD4

Бромодомен-містить 4 (BRD4) - білок сімейства бром і екстратермінальних доменів (Bromodomain and Extra-Terminal domain, BET), що локалізований у ядрі, хромосомах та містить два бромодомени (BD) на N-кінці молекули та екстратермінальний домен. BD є високо консервативними

доменами і мають характерну структуру, що складається з чотирьох альфа-спіралей, відокремлених петлями різної довжини. Ці альфа-спіралі утворюють ліво-закручений пучок, що формує гідрофобну кишеню, спеціально пристосовану для розпізнавання ацетилованих залишків лізину[36]. Важливо зазначити, що білки сімейства BET мають відносно низьку афінність до одиничних залишків ацетиллізину, проте їх афінність значно зростає до ділянок з множинними сайтами ацетилювання, що дозволяє BET білкам ефективно зв'язуватися з високо ацетильованими ділянками хроматину.

Екстратермінальний домен відіграє важливу роль у взаємодії з іншими білками та комплексами, що забезпечує специфічні функції білків сімейства BET у регуляції транскрипції та інших процесах, пов'язаних з хроматином[36].

Крім того BRD4 задієний у репарації ДНК, ацетилюванні, альтернативному сплайсингу та підтримці довжини теломер, а біохімічні дослідження показали, що BD1 білків BET відповідає за підтримання злоякісного фенотипу клітин гострої мієлоїдної лейкемії [37]

Недавні дослідження супер-енхансерів (містять більшу концентрацію факторів транскрипції та регуляторів[38]) та їх взаємозв'язок з білком BRD4 вказують на те, що ефективність BETі у лікуванні раку може залежати від кількості цих особливих регіонів. Дослідження, проведені на різних типах раку, показали, що наявність і кількість супер-енхансерів корелюють з активністю онкогенів і можуть бути унікальними для ракових клітин[39]. Взаємодія BRD4 з супер-енхансерами сприяє стійкості ракових клітин, а блокування BRD4 призводить до руйнування функціональної організації цих структур, зниження експресії онкогенів і, в кінцевому результаті, пригнічення або припинення росту ракових клітин.

Саме за рахунок широкого діапазона залученості як за нормальні, так і патологічних станів BRD4 залишається перспективною мішенню для

досліджень з метою створення протиракової терапії в частості з використанням ВЕТ-інгібіторів (ВЕТі).

1.2.3. Загальна інформація про Aurora A та Aurora B

Кінази Aurora є серин/треонін-кіназами, необхідними для клітинної проліферації. Вони грають важливу роль у поділі клітин, зокрема, у контролі сегрегації хроматид. Дефекти у цьому процесі можуть призводити до генетичної нестабільності, що пов'язано з раковими захворюваннями. У ссавців існують три члени родини Аврора-кіназ: Аврора А (AURKA), Аврора В (AURKB) і Аврора С (AURKC). Ці кінази виявлені як регулятори мітозу та викликали інтерес у дослідженні раку через їх підвищену експресію в ракових захворюваннях. Хоча ці три кінази подібні за структурою, їх моделі експресії, клітинна локалізація та фізіологічні функції відрізняються.

Аврора-кіназа А (Aurora A) відіграє важливу роль у клітинних процесах, таких як мітотичний вхід, дозрівання центросом та формування веретена поділу. Виявлено, що надмірна експресія або генна ампліфікація/мутація Aurora A виникає при різних типах раку, включаючи НБ. Зміни в Aurora A можуть впливати на різні характеристики раку, включаючи стійкість до лікування та резистентність до хіміотерапії, таргетної терапії та радіаційної терапії[40]. Дослідження показали, що Aurora A може бути перспективною мішенню для лікування НБ, особливо в групах пацієнтів з ампліфікацією гена MYCN, через вплив на процеси реплікації та транскрипції клітин. Комбіноване використання інгібіторів Aurora A та ATR показало ефективність у лікуванні нейробластоми у мишачих моделях, що може вказувати на можливість розвитку нових терапевтичних стратегій для цього типу раку[41].

В свою чергу Аврора-кіназа В грає важливу роль у забезпеченні прикріплення мітотичного веретена до центромери. Виявлено, що у декількох типах пухлин спостерігається підвищена експресія цієї кінази, що часто пов'язується з нерівномірним розподілом генетичної інформації, створюючи анеуплоїдні клітини, що є характерними ознаками раку та зазвичай позначається погіршенням прогнозу для хворих[42].

Терапевтичне блокування кінази Aurora В вважається потенційним методом боротьби з раком через її важливу роль у клітинному поділі. Схоже до Аврора А, Аврора В є потенційним таргетом для боротьби з НБ. Так наприклад, лікування барасертибом, селективною до AURKB сполукою, MYCN-ампліфікованих/TP53 ксенотрансплантатів нейробластом дикого типу призвело до пригнічення росту та регресії пухлини[43]. Таким чином, інгібування аврора В-кінази є дуже ефективним при агресивній нейробластомі та вимагає подальшого дослідження в клінічних випробуваннях.

1.2.4. Загальна інформація про JAK2

Janus-kinase (JAK) – перетворювач сигналу та активатор шляху транскрипції (signal transducer and activator of transcription (STAT)), відповідає за стимуляцію та вироблення понад 50 цитокінів. Цим він відіграє важливу роль у багатьох життєво важливих процесах, таких як клітинна проліферація, апоптоз, диференціювання та імуномодуляція, і має значення у розвитку різних захворювань, зокрема раку та аутоімуних розладів[44], [45], [46], [47].

Сімейство JAK включає нерцепторні тирозинкінази, які зв'язані з внутрішньоклітинними доменами рецепторів цитокінів типу I та II. У ссавців це сімейство складається з чотирьох членів: JAK1, JAK2, JAK3 та TYK2 (тирозинкіназа 2).

Згідно з попередніми досліджень JAK2 асоційований з багатьма паталогічними станами, такими як мієлопроліферативні новоутворення, рак легень (обумовлені мутаціями), лімфома Ходжкіна, ревматоїдний артрит, atopічний дерматит (обумовлені надмірною експресією)[45], [48], [49].

Важливо зазначити, що вагомим підтвердженням ефективності JAK2 у ролі біологічної мішені є селективні інгібітори, що застосовуються у клінічній практиці для боротьби з хворобами. Перелік кількох з таких інгібіторів продемонстрований у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1. Селективні інгібітори JAK2 та їх застосування. ^{JAK1} – демонструє селективну активність відносно JAK1 додатково до JAK2. ^{FDA/EU} – препарати визнані FDA чи EU комітетами до застосування. ^{Phase2/3} – препарати на фазі II чи II клінічних досліджень

Інгібітор	Паталогічний стан за якого застосовуються
Baricitinib ^{JAK1}	Ревматоїдний артрит ^{FDA/EU} , Вовчанка ^{Phase2/3} , Атопічний дерматит ^{Phase2/3} , COVID-19 ^{Phase2/3} , Аутоімунна алопеція ^{Phase2/3}
Ruxolitinib ^{JAK1}	Аутоімунна алопеція ^{Phase2/3} , Вітиліго ^{Phase2/3} , Есенціальна тромбоцитемія ^{Phase2/3} , Атопічний дерматит ^{Phase2/3} , COVID-19 ^{Phase2/3}
Fedratinib	Мієлофіброз ^{FDA/EU} , Гостра мієлоїдна лейкемія ^{Phase2/3}
Racritinib	Мієлофіброз ^{Phase2/3} , Гостра мієлоїдна лейкемія ^{Phase2/3}
Gandotinib	мієлопроліферативні новоутворення ^{Phase2/3} , Есенціальна тромбоцитемія ^{Phase2/3}

Таким чином відібрані мішені досліджень є перспективними біомішеннями для боротьби з широкою вибіркою паталогічних станів, як онкогенного так і іншого походження.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обладнання використане для дослідження

В дослідженні було використано наступне обладнання[1]:

центрифуга Multifuge X1 Pro (Thermo Fisher Scientific, США), система для очищення води NANO pure Diamond B 11911 (Barnstead MicroPure Thermo, США), інкубатор iEMS (Thermo Fisher Scientific, США), багатоканальна автоматизована піпетка (Thermo Fisher Scientific, США), міні-центрифура Vortex mixer (Thermo Fisher Scientific, США), акустичний диспансер Echo 550 (Labcyte inc., США), ПЛР система ViiA 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США), 384-лункові плати (Thermo Fisher Scientific, Cat. 4309849, США та Greiner Bio-One Cat 784075, США), термостабільні плівки ThermalSeal RT2 (Excel Scientific, Cat. TS-RT2, США), прилад для вимірювання оптичних та спектральних показників у мікропланшетах BMG PHERAstar FSX (Cytiva, Швеція), 384-лункові плати (Greiner Bio-One, Cat. 781270, США), прилад для заклеювання плат фольгою Thermo Abgene Microplate Sealer ALPS 300 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2. Матеріали та реактиви

В дослідженні було використано наступні реактиви[1]:

DMSO (Cat# 49.442-9), Bovine Serum Albumin (Cat#A9056), TRIS (Cat# 252859), MgCl₂ (Cat# M2670), Carbonic Anhydrase (Cat#C3934-100MG) та Acetazolamide (Cat#A6011-10G) від Sigma-Aldrich, США. HEPES (Cat# HB0264), NaCl (Cat# SB0476) та Na₂PO₄ (Cat# SB0879) від Bio Basic Inc, Канада. Sypro Orange (Cat: S6650) від Thermo Fischer Scientific, США. SIRT1, BRD4 та CHEMBL1828978/Z2466249226 були експресована/синтезовані у Bienta/Enamine Ltd (Україна). Aurora A (Cat#A28-10G), Aurora B (Cat#A31-

10G), JAK2 (Cat# J02-11G-05), MBP субстрат (Cat#M42-51N), та IRS1 субстрат (Cat#I40-58-1000), були куплені у SignalChem, Канада. SIRT-Glo™ Assay (Cat#G6450) від Promega, США. DTT (Cat# SC-29089C) від ChemCruz, Нідерланди. (Cat# S1133) and Barasertib (Cat#S1147) отримані від Selleckchem, США.

2.3. Схема проведення дослідження

До дослідження були долучені працівники трьох департаментів. Дана робота висвітлює лише частковий внесок у дослідження, що було опубліковано[1]. Повна схема дослідження продемонстрована на рисунку 2.1.



Рис. 2.1. Схема етапів проведення дослідження та перевірки передбаченої протипухлинної активності для сполуки.

Першим етапом було створено та протестувано моделі для передбачення протипухлинної активності сполук, одна проти клітинної лінії нейробластоми, інша - клітинної лінії хронічної мієлоїдної лейкемії. Кілька-

етапне тренування та тестування моделей дозволило стверджувати, що моделі готові до тестування сполук інтересу[1].

Після *in silico* скринінгу було відібрано перспективні сполуки включаючи сполуку C12C1IM-Cl, що продемонструвала найбільшу активність як у скринінгу проти нейробластоми, так і лейкемії[1]. Саме ця сполука була синтезована та тестувалась надалі у *in vitro* етапах скринінгу.

Першим етапом *in vitro* тестувань було дослідження цитотоксичності проти ліній клітин нейробластоми людини SK-N-DZ та хронічної мієлоїдної лейкемії людини K-562. Додатково всі перевірені сполуки були перевірені на незлоякісних клітинних лініях HEK293 і MRC-5. Результати опрацьовані та висвітлені А. Гринюковою для подальшого формування етапів дослідження[1].

Для поглибленого розуміння інгібіторного потенціалу синтезованої сполуки було проведено докінг та порівняльний аналіз розрахованої енергії комплексоутворення найбільш активних сполук в активні центри 22 потенційних молекулярних біомішеней, асоційованих з онкогенезом, включаючи НБ та ХМЛ.

Для підтвердження результатів відбувалось тестування відібраних речовин методом визначення зсуву температури плавлення білка (Thermal Shift Assay, TSA) проти кількох потенційних молекулярних біомішеней SIRT-1 та BRD4.

Надалі ж, для перевірки ефекту інгібування було проведено тестування впливу на ензиматичну активність за допомогою SIRT-Glo та ADP-Glo кіназних есеїв проти мішеней SIRT-1, Aurora A, Aurora B та JAK2.

В даній роботі будуть висвітлені часткові результати останніх 3-ох етапів дослідження. Додатково опис усіх етапів з відповідними результатами можуть бути переглянуті у публікації [1].

2.4. Докінг сполук в активний сайт онкологічних біомішеней

Для пошуку потенційних молекулярних шляхів/об'єктів, пов'язаних з онкогенезом НБ, використовували такі таргети[1]:

- β -катенін PDB ID: 2GL7;
- білок MDM2 PDB ID: 3LBL;
- кіназа анапластичної лімфоми (ALK) PDB ID: 4JOA;

Таргети, пов'язані з онкогенезом ХМЛ[1]:

- ABL кіназа PDB ID: 1IEP;
- білок STAT5A PDB ID: 1Y1U;
- c-Jun N-кінцева кіназа (JNK1) PDB ID: 4HYS;
- моноаміноксидаза B (MAOB) PDB ID: 1Y1U;
- білки тирозинкінази JAK1 PDB ID: 4EHZ;
- JAK2 PDB ID: 6VNE;

Таргети, пов'язані як з НБ, так і ХМЛ[1]:

- фосфоінозитид 3-кіназа γ (PI3K γ) PDB ID: 4PS3;
- кіназа B-RAF PDB ID: 5CT7;
- кіназа рецептора тропоміозину A (TrkA) PDB ID: 6DKB;
- кіназа рецептора тропоміозину B (TrkB) PDB ID: 4AT4;
- бромодоменвмісний протеїн 4 (BRD4) PDB ID: 5WUU;
- білок SURVIVIN PDB ID: 3UIH;
- NAD⁺-залежна деацетилаза сіртуїну 1 (SIRT1) PDB ID: 4I5I;
- VEGFR-2 PDB ID: 3VO3;
- циклін-залежна кіназа 4 (CDK4) PDB ID: 2W96;
- циклін-залежна кіназа 6 (CDK6) PDB ID: 4EZ5;
- Aurora A кіназа PDB ID: 4B0G;
- Aurora B кіназа PDB ID: 2BFX;
- тирозинкіназа Src PDB ID : 6E6E;

Процедура докінгу описана у відповідній публікації[1]. Важливо примітити, що дана частина роботи була виконана відділом медико-біологічних досліджень Інститут Біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАНУ України та лягла в основу подальших досліджень *in vitro*.

2.5. Загальна інформація про метод TSA.

Для оцінки взаємодії речовин з SIRT-1 та BRD4 використовувався метод визначення температурного зсуву плавлення (Thermal Shift Assay, TSA). Цей метод ґрунтується на вимірюванні зміни температури денатурації, іншими словами очка плавлення, білка. Він використовує спеціальні флуоресцентні барвники, такі як Sypro Orange (SO) чи DQTCI, які неспецифічно зв'язуються з гідрофобною частиною білка, що в звичайних умовах (стабільна температура для зберігання/роботи з білком, рН близький до ізоелектричної точки та інші) перебувають «заховані» у середину білка та не доступні для барвника. При збільшенні температури білок розгортається, що спричиняє збільшення флуоресценції барвника (Рис. 2.2). Це може служити індикатором змін у стабільності білка в залежності від різних факторів, таких як вплив речовини, рН буфера, іонна сила, окислювально-відновний потенціал, мутації послідовності і т.д.

Крім того, за рахунок такого методу дослідження можна визначати кількість енергії, що потрібна білку для досягнення точки плавлення за проміжок часу, що зараз стрімко розвивається, в частності компанією NanoTherm у підходах диференціальної скануючої флуорометрії, одним з яких і є TSA, проте оскільки цей підхід ще на етапі розвитку, в нашому дослідженні він не використовувався.

Перевагами методу є відсутність потреби у використанні специфічних міток для білків, швидкість та простота. Недоліком методу є потреба у великій кількості та чистоті білка.

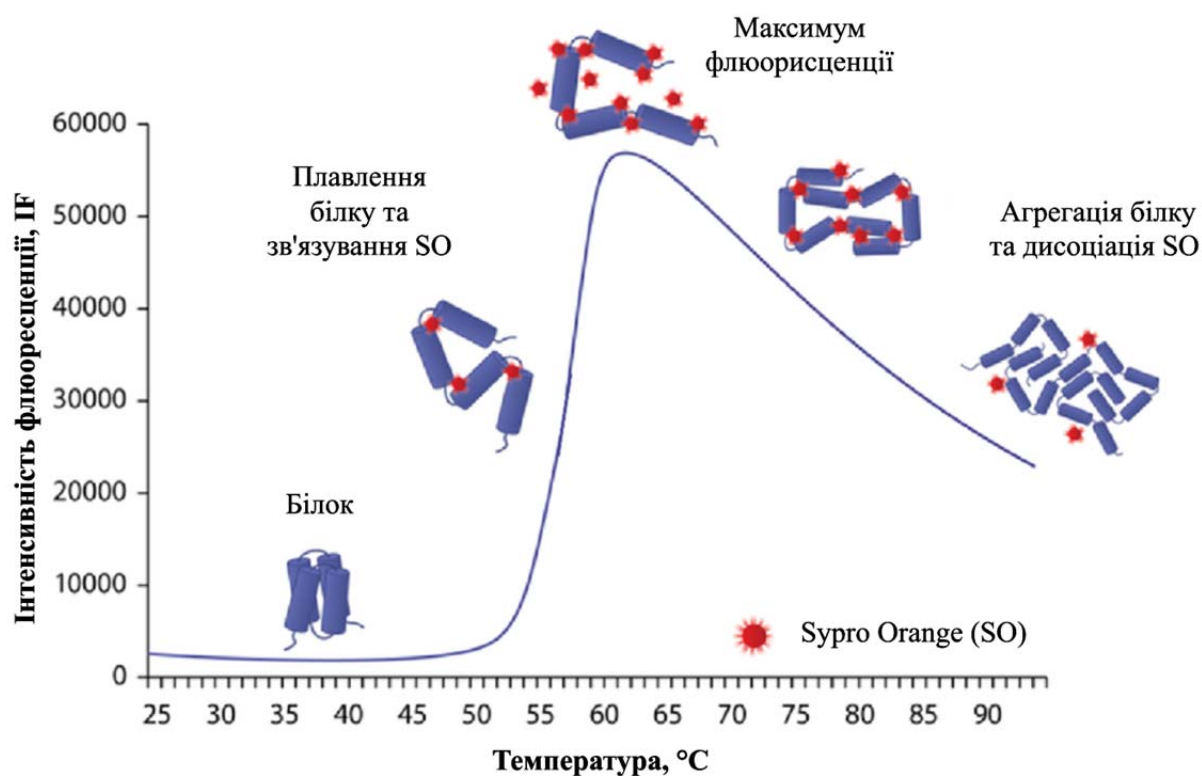


Рис 2.2. Схематичне зображення принципу тестування речовин методом TSA використовуючи гідрофобний барвник SO.

2.6. Скринінг речовини на SIRT-1 та BRD4

Дослідження проводилось за раніше розроблених умовах для дослідження SIRT-1 та BRD4 методом TSA[34], [50]. Детектування флюорисценції барвника SO та контроль температурних режимів відбувались за допомогою пристрою ViiA 7 Real-Time PCR System.

Сполука тестувались за одним протоколом експерименту для усіх білків, який проілюстрований у вигляді схеми на рисунку 2.3.

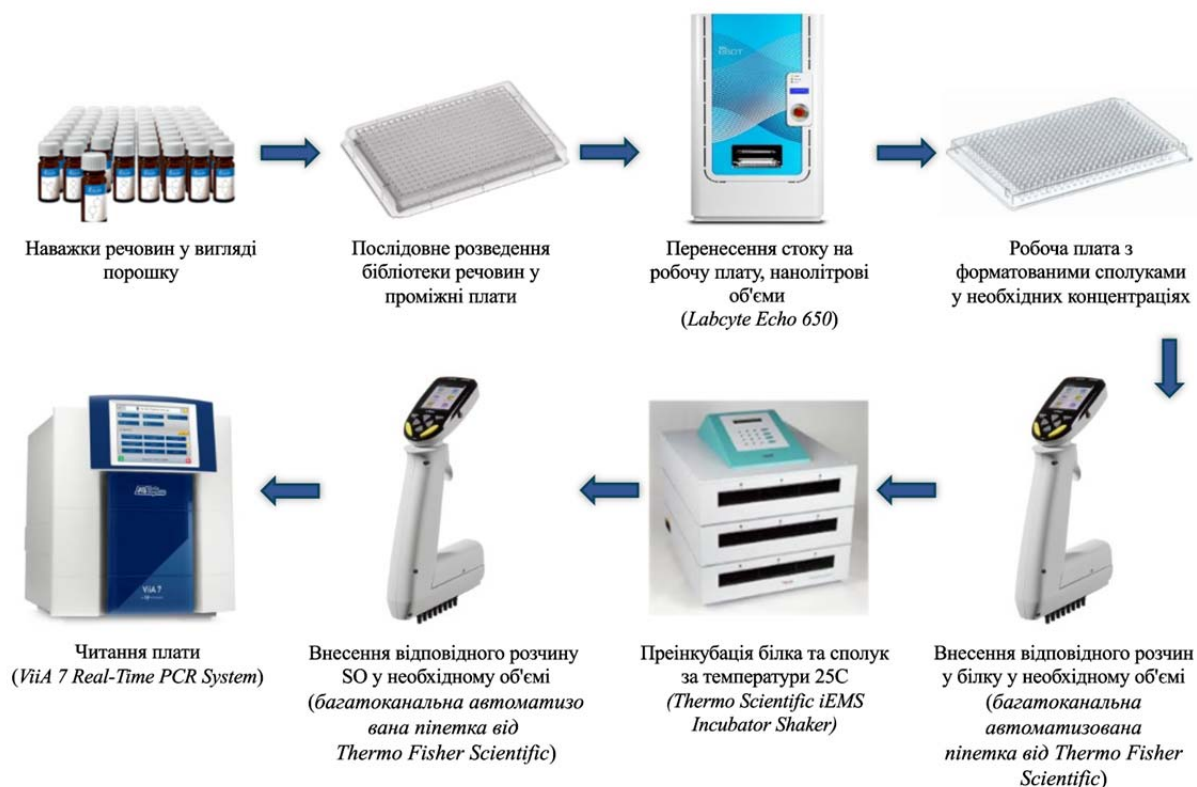


Рис 2.3. Схема проведення експерименту методом TSA з зображенням використаного обладнання та етапів протоколу.

Речовина були наважена та розчиненна в ДМСО до стокової концентрації 10 мМ. Далі відбувалось її послідовне розведення у необхідному концентраційному діапазоні для приготування проміжних стоків для подальшого форматування. Готові стоки переносяться на робочу плату у об'ємі 100 нЛ.

У день проведення дослідження у робочу плату послідовно додається розчин білку, заклеюється плівкою для мінімізації випаровування, центрифугується та ставиться у термостат для преінкубації з речовинами протягом 15 хв за температурі 25°C.

По завершенню преінкубації додається розчин барвника для детектування впливу температури на структуру білка, в даному дослідженні це Sypro Orange. Після чого плата заклеюється термостабільною плівкою,

центрифугується та розміщується у прилад для читання, де і відбувається детекція сигналу.

Речовина тестувались у 8 концентраціях з 2-кратним розведенням з топової концентрації 100 мкМ.

Для білка SIRT-1 використовували буфер 20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl. Для BRD4 буфер складався з 50mM Na₂HPO₄ pH 7.5, 100 mM NaCl.

Фінальна концентрація обох білків – 100 мкг/мл, що становило 1,3 та 6,4 мкМ для SIRT-1 та BRD4 відповідно. Концентрація барвника SO у реакції була 8x для SIRT-1 та 6x для BRD4. У тестуванні з BRD4 додатково використовувався контроль – референтна сполука CHEMBL1828978 (відомий інгібітор білка) у концентрації 25 мкМ. Для SIRT1 референтною сполукою був Нікотинамід у концентрації 70 мкМ.

Температурний діапазон плавлення SIRT-1 у протоколі складала 35-75°C з кроком 1.6 °C/сек до досягнення температури в 35 °C і кроком 0.5 °C/сек протягом температурного діапазону 35-75 °C. Для BRD4 ці умови становили 35-80 °C з кроком 1.6 °C/сек до досягнення температури в 35 °C і з кроком 0.1 °C/сек протягом діапазону 35-80 °C.

Зчитування флуоресцентного сигналу відбувалось з інтервалом 2 секунди використовуючи фільтри EX470/EM623 nm.

2.7. Перевірка сполук на предмет неселективної взаємодії

З метою перевірки неспецифічних взаємодій підібраних лігандів використовували Карбоангідразу (CA). Речовина тестувалась у аналогічних умовах та процедурі тестування до висвітленого у пункті 2.6 та на рисунку 2.3.

Для білка CA використовували 10 mM фосфатний буфер, 50 mM NaCl, pH 7.0. Фінальна концентрація білка – 100 мкг/мл (3,3 мкМ), барвника SO – 8x.

Температурний діапазон плавлення білка складав 40-85 °C (з кроком 1.6 °C/сек до досягнення температури в 35 °C і кроком 0.5 °C/сек протягом температурного діапазону 40-85 °C).

Як додатковий контроль використовувався референтна сполука Ацетазоламід у концентрації 20 мкМ.

2.8. Методи аналізу даних у TSA

Результати, отримані в результаті ексерименту в TSA аналізуються у програмному забезпечення Protein Thermal Shift. У ньому переглядаються криві плавлення білка, визначаються необхідні параметри та вивантажуються данні у зручному форматі для подальшого аналізу.

В результаті тестування методом TSA обраховується температура плавлення білка (T_m , рис 2.4) з отриманої кривої для кожної лунки плати. Для обрахунку даної характеристики зазвичай використовується derivative T_m (T_mD), яка розраховується за допомогою визначення похідної кривої плавлення.

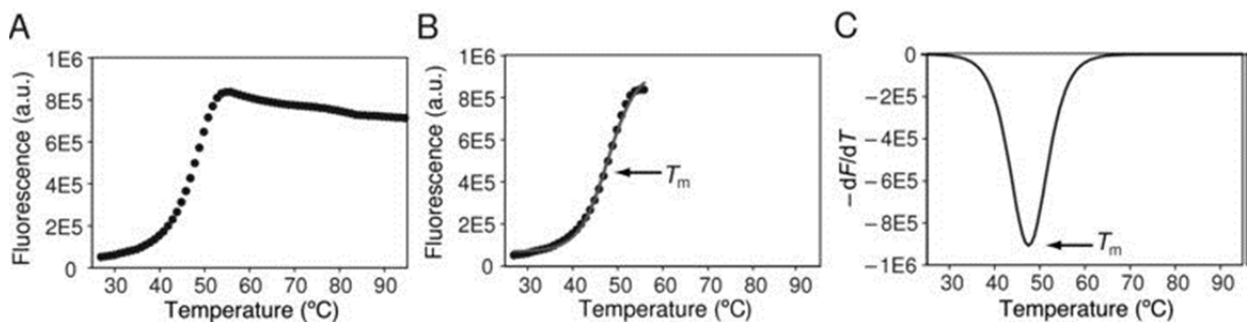


Рис 2.4. Приклад результатів отриманих методом TSA. А. Репрезентативна крива плавлення білка методом TSA та схема аналізу кривої, що візуалізована за допомогою флуорисценції як функція температури. В. Температура плавлення T_m це значення температури, що відповідає середині кривої плавлення за якої половина білка розгорнута. С. Також визначається за допомогою першої похідної флуорисценції як

функція температури ($-dF/dT$), де точка переходу представлена як точка локального мінімуму. Джерело:[51].

В аналізі сполук методом TSA важливим параметром є зсув температури плавлення (dT_m), що вираховується як різниця між температурою плавлення білка з (зразком) речовиною у певній концентрації та білка у лунках контролю, де фіксується вплив розчинника (ДМСО) на білок (Формула 2.1).

$$dT_m = T_m(\text{білок з речовиною}) - T_m(\text{контроль}) \quad (2.1)$$

Якщо речовина спричиняє зміщення температури плавлення білка, це вказує на її активність. Якщо зсув відбувається в напрямку зниження температури, це свідчить про дестабілізуючий ефект речовини, а якщо в напрямку підвищення - про стабілізуючий. Оскільки в даному дослідженні важливою є не сама дестабілізація, але і можливість взаємодії сполуки з білком до уваги брались як позитивні, так і негативні зміщення. Згідно з правилом 3-ох стандартних відхилень, потенційно активними вважаються сполуки, які спричиняють зсув температури плавлення білка на величину, що перевищує у три рази стандартне відхилення (standard deviation, SD) в контрольних зразках, що враховує можливість випадкових змін і коливань у дослідженнях. (Формула 2.2).

$$|dT_m(\text{білок з речовиною})| > 3 * T_m RSD (\text{контроль}) \quad (2.2)$$

Таким чином формується критерій відбору потенційно активних сполук, який є індивідуальний для кожного експерименту з відповідними контролями.

При тестуванні бібліотек сполук у мініатюризovaných об'ємах, як це робиться у високопродуктивному скринінгу (High-Throughput Screening, HTS) збільшується ймовірність отримання викидів, що вирізняються від загального тренду даних, через посилений вплив зовнішніх факторів. Тому для аналізу даних прийнято використовувати робастну, також називають надійну, (robust) статистику.

У робастній статистиці для обрахунків результатів замість середніх значень та стандартних відхилень використовують медіану та робастне стандартне відхилення за медіаною (RSD). За допомогою цього артефакти чи випадні точки (outliers) (точки, що випали в результаті механічних помилок чи неточностей) мають незначний вплив на результати та їх обрахунок.

Крім того у HTS застосовуються параметри для оцінки якості проведеного експерименту, quality control (QC), що є важливим етапом аналізу результатів. QC обраховується для кожної плати індивідуально з даних контрольних точок у експерименту (для TSA це, як описано вище, зразки де у реакції присутній білок з розчинником, без речовини). Параметром QC для TSA є RSD контролю, що не повинен перевищувати 0,5% та значення T_m тестованого білка, що повинен відтворюватись з наявними літературними даними чи отриманими у попередніх експериментах. Додатково оцінюється якість отриманих кривих на предмет відповідності патерну кривої плавлення білка у контрольних лунках та відтворюваність кривих.

Отриманні результати візуалізувались у програмному забезпеченні GraphPad Prism, MS Excel.

2.9. Загальний опис методу визначення ензиматичної активності білка за допомогою SIRT-Glo Kinase Assay

Система аналізу та скринінгу SIRT-Glo™ Kinase Assay — це однорідні люмінесцентні аналізи з додаванням одного реагенту, які вимірюють відносну активність NAD⁺-залежної гістондеацетилази (HDAC) ферментів класу III (сиртуїни; SIRT) із очищених джерела ферментів. Цей аналіз широко застосовується для ферментів класу III, але його чутливість і ефективність будуть змінюватися в залежності від каталітичної ефективності окремих ферментів. В аналізі використовується ацетильований люміногенний пептидний субстрат, який може бути деацетильований активністю SIRT (рис. 2.5.). Деацетилювання пептидного субстрату вимірюється за допомогою пов'язаної ферментативної системи, в якій протеаза в Developer Reagent відщеплює пептид від амінолюциферину, який кількісно визначається в реакції з використанням рекомбінантної люциферази, що входить у склад Detection Reagent SIRT-Glo™ Kinase Assay Kit.

Перевагами методу є відсутність потреби у використанні специфічних міток для білків, швидкість та простота. Недоліком методу є можлива взаємодія з компонентами реакції, що може спотворювати результати до хибно-позитивних чи хибно-негативних. Крім того в порівнянні з TSA даним метод є дорожчим.

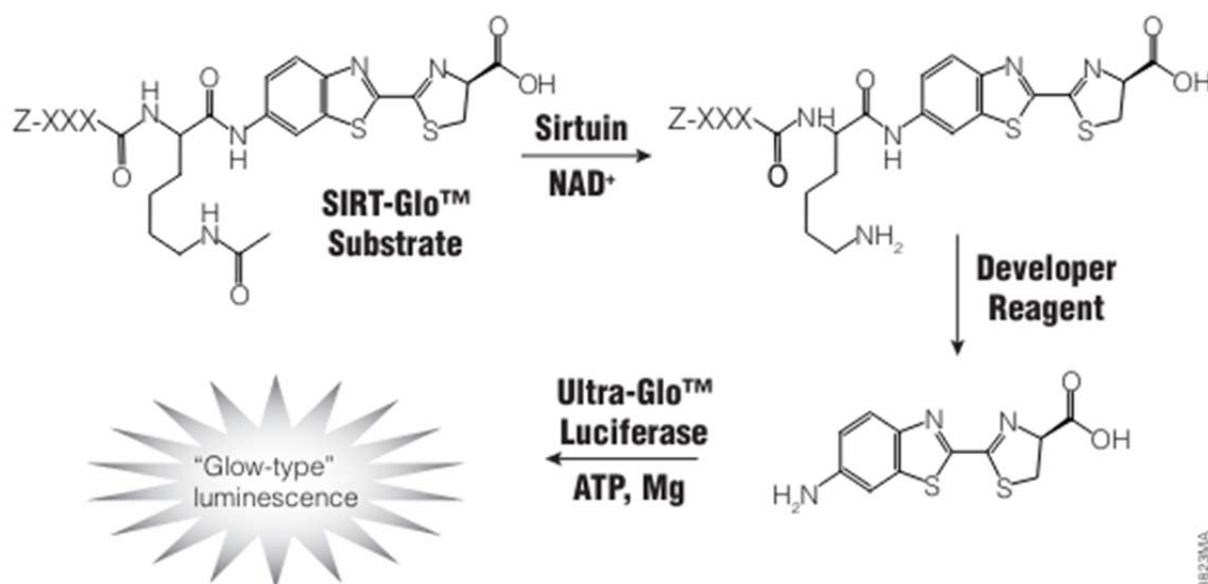


Рис 2.5. Реакція в основі SIRT-Glo™ ензиматичного есею. Активність SIRT деацетилює люміногенний субстрат SIRT-Glo™, роблячи пептид чутливим до специфічного протеолітичного розщеплення, яке опосередковується реагентом SIRT-Glo™ і вивільняє амінолюциферин. Тоді вільний амінолюциферин можна виміряти за допомогою люциферазної реакції для отримання стабільного постійного випромінювання світла. Z являє собою амінокінцеву блокуючу групу, яка захищає субстрат від неспецифічного розщеплення. XXXLysine — це SIRT-оптимізована амінокислотна послідовність на основі консенсусної послідовності, отриманої з p53. Джерело: [52]

2.10. Скринінг сполук проти SIRT-1 за допомогою SIRT-Glo

Дослідження проводились відповідно до протоколу раніше розробленого SIRT-Glo кіназного есею[34]. Сполуки тестувались за процедурою продемонстрованою на рис 2.6.

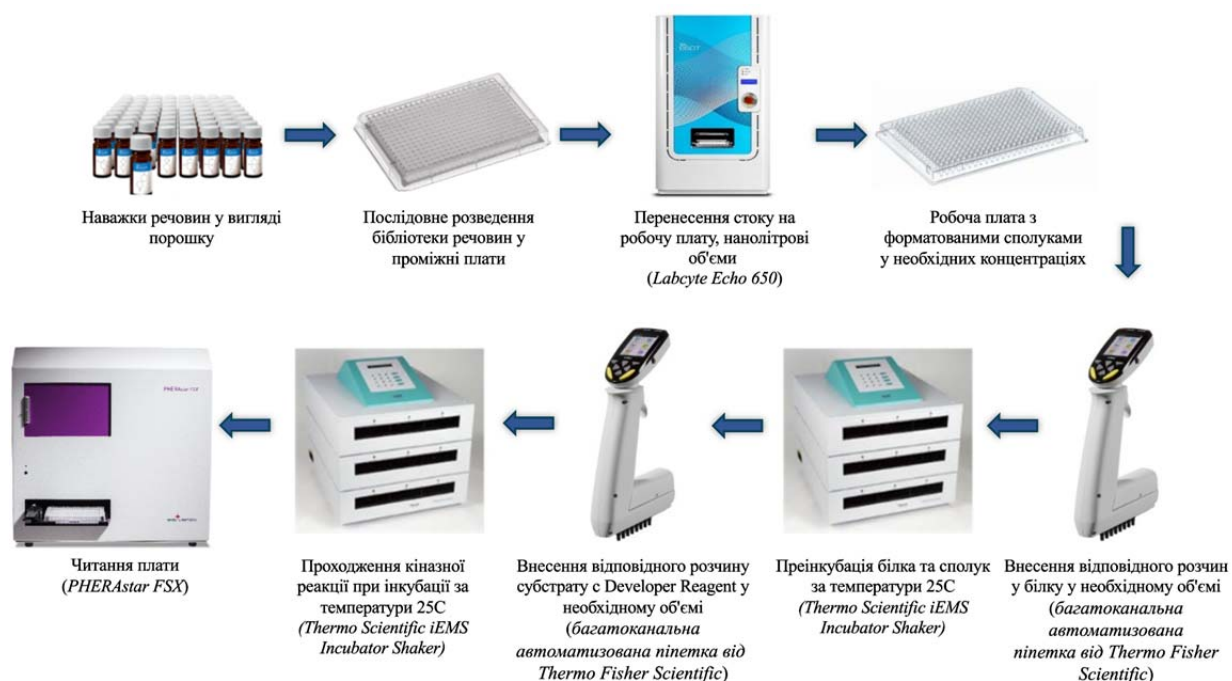


Рис. 2.6. Схема проведення експерименту з SIRT-Glo Kinase Assay. з зображенням використаного обладнання та етапів протоколу.

Перші 4 етапи відповідають процедурі підготовки до тестування методом TSA. Надалі ж протокол відрізняється іншими реагентами у реакції та тривалістю інкубацій. Так відбувається послідовне додавання розчину білка, преінкубація протягом 30 хв білка з речовинами та наступним додаванням субстрату з Developer Reagent. Останній етап ініціює початок кіназної реакції, яка триває 45 хв за температури 25°C.

Детекція відбувається у режимі зчитування люмінесценції за допомогою приладу PHERAstar FSX. Плата читається без плівок, в порівнянні з попередньо-описаним методом TSA.

Речовина тестувалась у 8 концентраціях, 3-кратним розведенням, з топової концентрації 100 мкМ. Нікотинамід був використаний у якості реферу та тестований у 8 концентраціях, з топовою 333 мкМ і наступним 3-кратним розведенням.

Буфер для розведень та проведення реакцій є частиною комерційного кіта. Фінальна концентрація SIRT-1 у реакції 0,52 нМ. Інші умови та концентрації були витримані відповідно до рекомендацій від виробника.

2.11. Загальний опис ADP-Glo Kinase Assay

ADP-Glo Kinase Assay - люмінесцентна система виявлення аденозиндифосфату (АДФ) для дослідження кіназ та інших аденозинтрифосфат(АТФ)-залежних ферментів. Аналіз за допомогою ADP-Glo™ вимірює АДФ, що утворюється в результаті кіназної реакції, після опрацювання АТФ. Для вимірювання результатів залишковий АТФ прибирається з реакції, а отриманий АДФ перетворюється на АТФ. Цей новоутворений АТФ використовується для генерації світла в люциферазній реакції. Таким чином генерована люмінесценція корелює з активністю кінази та ефективності проходження кіназної реакції. Даний процес візуалізований на рис 2.7.

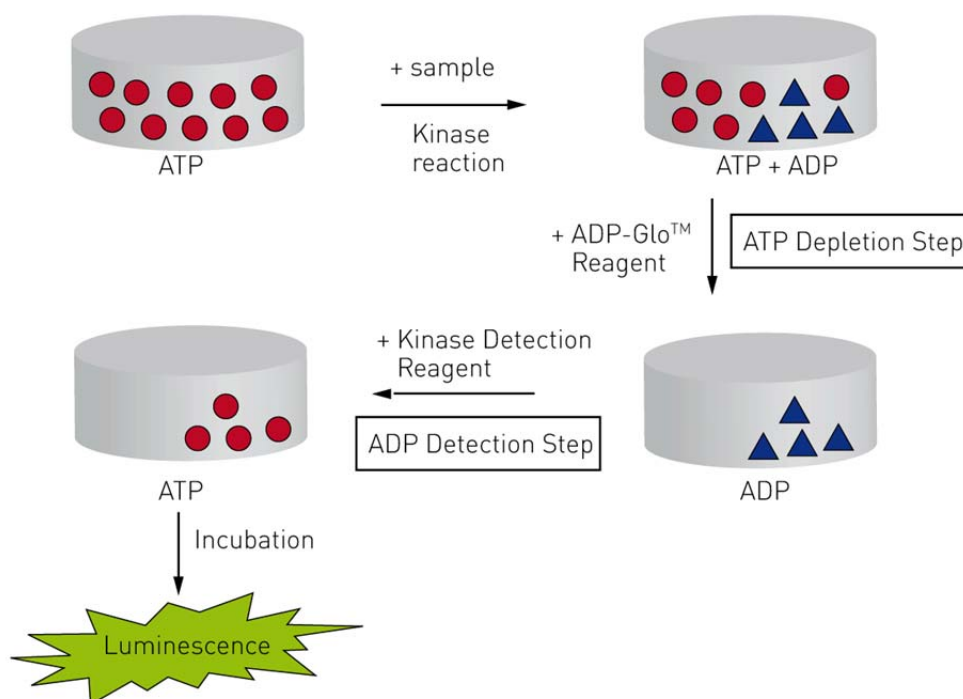


Рис 2.7. Схема роботи ADP-Glo™ Kinase Assay. Під час проходження кіназної чи АТФ-залежної реакції АТФ наявне у реакції конвертується у АДФ. Після додавання ADP-Glo Reagent відбувається блокування та прибирання залишкового АТФ з реакції, що залишає доступним лише

новостворений АДФ для подальших перетворень. Після чого додавши Kinase Detection Reagent реакція «блокування та прибирання» АТФ з реакції зупиняється, натомість АДФ конвертується в АТФ. Як результат, щойно перетворений АТФ бере участь у люциферазній реакції, продукуючи люмінесценцію, яка детектується. Джерело:[53]

Аналіз добре підходить для вимірювання впливу хімічних сполук на активність багатьох очищених кіназ, що робить його ідеальним для первинного скринінгу, а також профілювання селективності кіназ. Швидкість та простота використання за участі неміченого білка є додатковими перевагами методу. Недоліки відповідні до методу SIRT-Glo Kinase Assay – специфічні компоненти реакції, що можуть бути підґрунтям для хибно-позитивних чи негативних результатів та порівняна дорожча вартість.

2.12. Скринінг сполук проти Aurora A/B, JAK2 за допомогою ADP-Glo Kinase Assay

Дослідження проводились відповідно до протоколу раніше розроблених ADP-Glo есеїв та відповідно до рекомендацій від виробника. Сполуки тестувались за процедурою продемонстрованою на рис 2.8.

Перші 4 етапи відповідають процедурі підготовки до тестування іншими методами. Надалі ж кількість етапів збільшується та модифікується. Так відбувається послідовне додавання 4 реагентів та відповідні інкубації:

- розчин білка, що преінкубується з сполуками протягом 15 хв.
- розчин субстрату відповідного ензиму та АТФ з наступною інкубацією протягом 40 хв.
- ADP-Glo реагент. Інкубація 40 хв.
- Detection Reagent. Інкубація 30 хв.

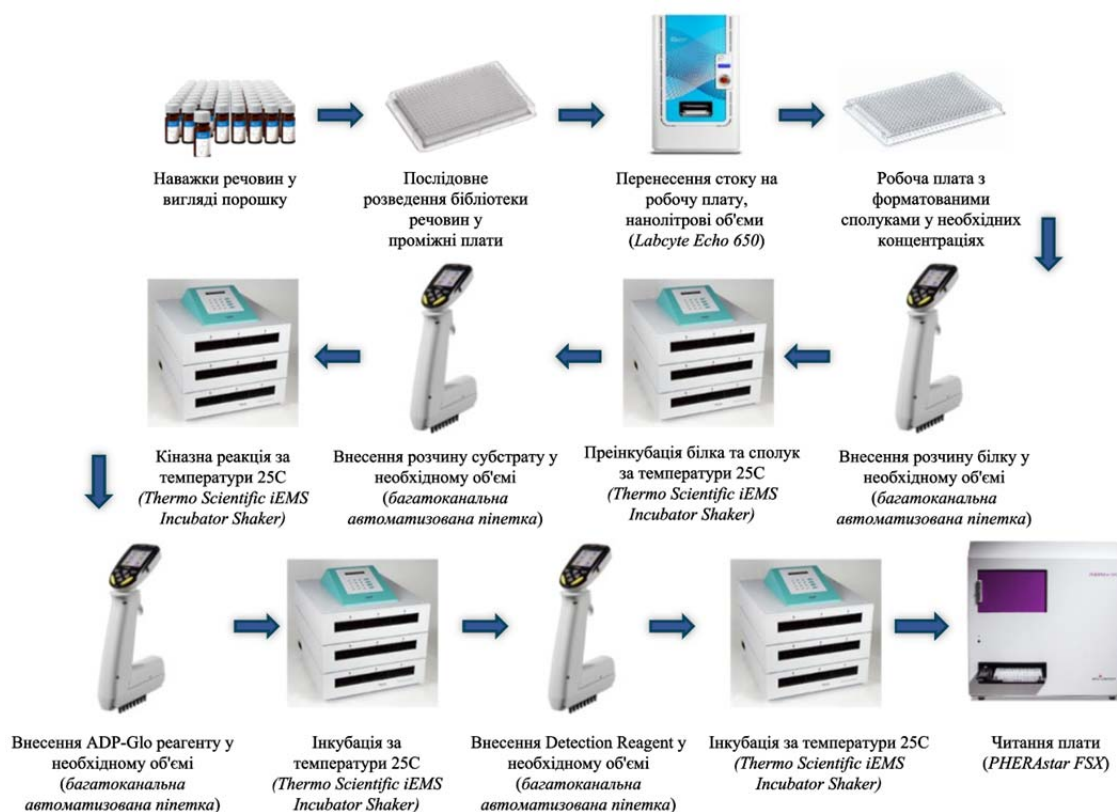


Рис. 2.8. Схема проведення експерименту з ADP-Glo Kinase Assay з зображенням використаного обладнання та етапів протоколу.

Після кожної розкапки, крім останнього етапу плата заклеюється плівками та центрифугується, для лімітування ефекту від випаровування та осаджування всіх розчинів.

Детекція відбувається у режимі зчитування люмінесценції у приладі PHERAstar FSX, плата читається без плівок.

Речовина тестувалась у 8 концентраціях, 3-кратним розведенням, з топової концентрації 100 мкМ.

Наступні буфери були використані для розведень та проведення реакцій:

- Для Aurora A це був 40 мМ Tris-HCl, 20 мМ MgCl₂, 50 мкМ DTT, 0.1 мг/мл BSA, pH 7.5
- Для Aurora B, JAK2 це 40 мМ Tris-HCl, 20 мМ MgCl₂, 50 мкМ DTT, 0.02% Pluronic, 0.005% Triton X-100, 0.1 мг/мл BSA, pH 7.5

Фінальна концентрація Ауога А, Ауога В та JAK2 була 5, 2,5 та 27,8 нМ відповідно. Алісертіб та Барасертіб були використані як референсні сполуки для Ауога А та Ауога В титруючи з 2,45 мкМ 3-кратно на 8 концентраційних точок.

В якості субстрату для Ауога А та Ауога В використовувався 4.65 мкМ MBP субстрат, а для JAK2 – 110 мкМ IRS1 субстрат.

Інші умови були витримані відповідно до рекомендацій від виробника.

2.13. Методи аналізу даних ензиматичних есеїв.

В результаті ензиматичних есеїв описаних у цій роботі дані отримуються у форматі таблиць з значеннями RLU (Relative Luminescence Unit) для кожного зразка у експерименті, структурованих у форматі плат. Попередній аналіз відбувається в MS Excel або за допомогою Python.

Першим оцінюється якість експерименту за допомогою параметрів контролю якості (QC): signal-to-background (формула 2.3) та z-prime (формула 2.4).

Signal-to-background (S/B, співвідношення сигналу до фону) - визначається відповідними співвідношеннями люмінесцентних сигналів високого та низького рівня, які зазвичай відповідають позитивному та негативному контролю. Цей параметр дозволяє оцінити динамічний діапазон сигналу в аналізі, що надає інформацію про продуктивність реакції у випадку ензиматичних есеїв (проте для точного визначення цього існують окремі параметри). Для HTS оптимальним значенням S/B, що означатиме якісно налаштований протокол та проведений експеримент має бути більше 3. Оскільки в HTS використовується робастна статистика, то і у цьому випадку S/B визначається як відношення медіанного значення сигналу позитивного контролю до медіанного значення сигналу негативного

контролю. В такому випадку часто позначається як RS/B (robust signal-to-background):

$$RS/B = \frac{median_{K+}}{median_{K-}} \quad (2.3)$$

де, $median_{K+}$ - медіанне значення рівня сигналу позитивного контролю, $median_{K-}$ - медіанне значення рівня сигналу негативного контролю

Z-prime (Z-коефіцієнт) – міра статистичної достовірності даних та внеску розкидів на аналіз даних. Z-prime вважається найкращою метрикою для опису якості аналізу, оскільки він характеризує відтворюваність результату, поєднуючи середні значення позитивних та негативних контролів, а також їх середньоквадратичні відхилення. Значення Z-prime може вказувати на ймовірність помилкових позитивних чи негативних результатів. Значення Z-prime наближається до 1 (ідеальний аналіз) у міру наближення середньоквадратичних відхилень сигналів до нуля або наближення динамічного діапазону до нескінченності. Аналіз із значенням Z-prime вище 0,5 вважається відмінним та надійним. Значення Z-prime від 0 до 0,5 вказує на низьку якість отриманих даних, тоді коли від’ємні значення вказують на не якісні дані [54]. За використання робастної статистики позначається RZ' та знаходять за наступною формулою:

$$RZ' = 1 - \frac{3*(RSD_{max} + RSD_{min})}{(RLU_{max} - RLU_{min})} \quad (2.4)$$

де, RSD_{max} - стандартне відхилення люмінесцентного сигналу позитивного контролю за надійною статистикою, RSD_{min} - стандартне відхилення люмінесцентного сигналу негативного контролю за надійною

статистикою, RLU_{max} - медіанне значення люмінесцентного сигналу позитивного контролю, RLU_{min} - медіанне значення люмінесцентного сигналу негативного контролю.

Після підтвердження якості експериментальних даних відбувається аналіз результатів протестованих зразків. Для цього значення нормалізуються відносно контролів, і головним параметром такого перетворення та подальшого аналізу є відсоток інгібування речовиною, який визначається за формулою:

$$\text{Інгібування, \%} = \frac{RLU_{max} - RLU_{sample}}{RLU_{max} - RLU_{min}} \quad (2.1)$$

де RLU_{max} - медіанне значення люмінесценції в лунках з позитивним контролем, RLU_{min} - медіанне значення люмінесценції в лунках з негативним контролем, RLU_{sample} - значення люмінесценції в лунці з речовиною.

У випадку тестування речовин у різних концентраціях відсоток інгібування визначається для кожної концентраційної точки та для кожного реплікату. Таким чином нормалізовані дані використовуються для визначення IC50 (концентрація напівмаксимального інгібування).

IC50 – показник ефективності пригнічення активності біологічної мішені лігандом. Це кількісний показник, що показує концентрацію речовини, що необхідна для пригнічення біологічного процесу на 50%. Визначається шляхом нелінійної регресії, сигмоподібною чотирипараметричною логістичною кривою (4PL). Це математична модель S-подібної доз-залежності (Рис.2.9).

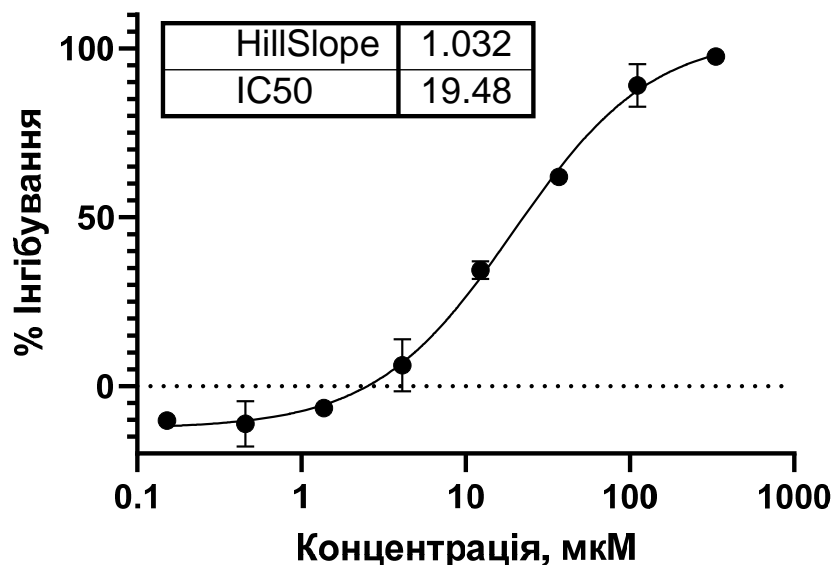


Рис. 2.9. Репрезентативна крива доз-залежної дії сполук, нелінійна регресія сигмоподібною 4PL.

Часто використовують обернений до IC50 параметр - $\log(1/IC50)$. Він дозволяє перетворити експоненціальну шкалу IC50 до логарифмічної шкали, що дозволяє краще порівнювати значення, проводити зручніший статистичний аналіз та моделювання. Крім того це забезпечує пряму кореляцію, де більші значення $\log(1/IC50)$ відповідають більш ефективним інгібіторам (меншим значенням IC50).

Статистичний аналіз та візуалізація була підготована за допомогою MS Excel, GraphPad Prism.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати докінгу відібраної сполуки

В результаті докінгу, що був проведений групою з відділу мед-біологічних досліджень, було успішно проведено тестування сполуки C12C1IM-Cl проти 22 відібраних біомішеней[1]. Їх результати підсумовані у таблиці 3.1. Можна побачити, що комплекси білок-ліганд показали розраховану енергію зв'язку від $-3,4$ до $-8,0$ ккал/моль. Умовно, їх можна розділити на 3 групи:

- слабкі комплексоутворення ($-3,4$ – -5 ккал/моль),
- комплексоутворювачі середньої сили ($-5,1$ – $-6,5$ ккал/моль)
- сильні комплексоутворювачі ($-6,5$ – $-8,0$ ккал/моль)

Вони розташовані відповідним чином у таблиці (у порядку спадання енергії зв'язування).

Найбільш енергетично вигідні комплекси сполука C12C1IM-Cl утворила з SIRT1 з енергією зв'язку $-8,0$ ккал/моль[1]. Комплекс білка та цієї сполуки стабілізувалися як водневими зв'язками так і гідрофобними взаємодіями:

- 3 водневі зв'язки: з HIS363, VAL412 і гідроксильною групою рибози NAD⁺
- 5 гідрофобних взаємодій: з PHE273, ILE347, NAD⁺, ILE270, ILE316

Цікаво примітити, що стабілізація зв'язком з гідроксильною групою рибози NAD⁺ є цікавим результатом докінгу, чого не часто можна спростерігати у інших кіназах чи схожих кейсах, що може позначати потенційну підвищену селективність до SIRT1 за рахунок таких широких взаємодій.

Особливості комплексоутворення ліганду C12C1IM-Cl у сайт зв'язування субстрату SIRT1 показано на рисунку 3.1.

Таблиця 3.1. Порівняльний аналіз на основі результатів докінгу ліганду C12C11M-Cl в активні сайти потенційних біомішеней ХМЛ та НБ.
Джерело:[1]

PDB: ID	Біомішень відносно паталогічного стану		Енергія зв'язування, kcal/mol
	ХМЛ	НБ	Сполука C12C11M-Cl
2GL7	-	b-catenin	-3.4
4UIH	Survivin		-3.9
4JOA	-	ALK	-4.6
4HYS	JNK1	-	-4.7
1Y1U	STAT5A	-	-4.9
3LBL	-	MDM2	-5.0
5WUU	BRD4		-5.2
6VNE	JAK2	-	-5.4
4B0G	Aurora-A		-5.4
2BFX	Aurora-B		-5.6
2W96	CDK4		-5.7
4PS3	P13Kg		-5.7
6E6E	Src		-5.7
4EHZ	JAK1	-	-5.8
4EZ5	CDK6		-5.9
6DKB	TrkA		-6.0
4AT4	TrkB		-6.1
5CT7	B-RAF		-6.2
1IEP	ABL	-	-6.6
1OJD	MAOB	-	-6.7
3VO3	VEGFR-2		-6.8
4I5I	Sirtuin 1		-8.0

Результати прогнозування докінгу також показали, що розрахована енергія зв'язування сполуки 2 з Aurora A/B, JAK 2 та BRD4 були в діапазоні $-5,2$ і $-5,6$ ккал/моль, які були зазначені як помірні, що вказує на те, що ці сполуки потенційно можуть взаємодіяти з іншими важливими біомішенями, залученими до пухлиноутворення ХМЛ або НБ[1]. Саме це і потребує перевірки методами *in vitro*.

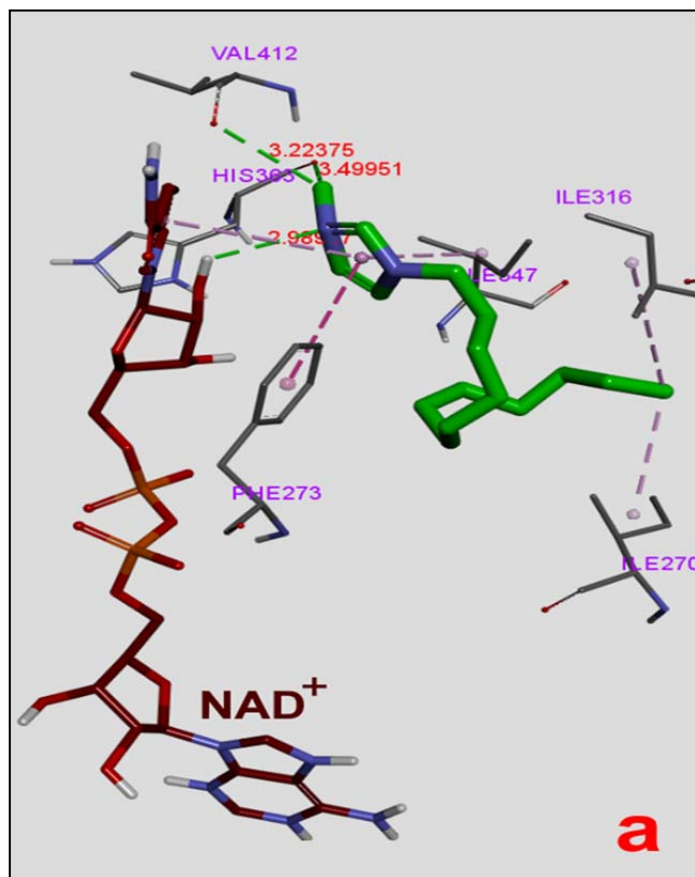


Рисунок 3.1. Докінг сполуки C12C1IM-Cl до сайту зв'язування субстрату SIRT1; червоний – NAD⁺ ; зелений – сполуки. Джерело: [1]

Для перевірки цих результатів було проведено дослідження за допомогою аналізу теплового зсуву проти SIRT1 і BRD4.

3.2. Результати тестування сполуки методом TSA

Сполука була успішно протестована методом визначення зсуву температури плавлення проти SIRT1 і BRD4, параметри контролю якості були витримані (Таблиця 3.2). Наші результати показали, що сполука C12C1IM-Cl мала найсильніший специфічний вплив на білок SIRT1 зі найбільшим зсувом $-1,5^{\circ}\text{C}$ (таблиця 3.3). Беручи до уваги додатковий стандартний критерій у методі TSA – сполуки можуть вважатись селективними до таргету, оскільки не продемонстрували зсув температури

плавлення, що більший $0,5^{\circ}\text{C}$ в сторону стабілізації чи дестабілізації інших тестованих білків.

Таблиця 3.2. Результати параметрів для контролю якості проведених експериментів тестування сполук проти SIRT1, BRD4 та CA методом визначення зсуву температури плавлення. Наведені дані для тестованих плат для кожної мішені дослідження. Містить інформацію про значення TmD , TmD RSD для контрольних зразків та ΔTmD ($dTmD$) ($^{\circ}\text{C}$) для референтних сполук.

Білок	TmD Контроля	TmD RSD контроля	$dTmD$ референтних сполук
SIRT1	49,16	0,21	8,93
CA	66,81	0,05	4,04
BRD4	51,24	0,15	1,35

Крім того важливо відзначити доз-залежну поведінку цієї сполуки, яка продемонстрована на рисунку 3.2, та таблиці 3.3 що є додатковим підтвердженням якісної взаємодії та потенційного використання сполуки у розвитку лікарських препаратів, що і було частково передбачено методами *in silico*[1].

Такої поведінки не було виявлено для білка BRD4, що може позначати перспективну дію на шлях де залучений лише SIRT1, без стороннього впливу на BRD4. Також це підтверджує результати докінгу, що ця мішень - сильний комплексоутворювач. Проте дане припущення бажано додатково підтвердити методами перевірки впливу безпосередньо на активність білка-мішені.

Також важливо примітити, що сполука не продемонструвала зміни температури плавлення CA (рис 3.2), що на разі показує, що сполука не проявила неспецифічну взаємодію.

Таблиця 3.3. Таблиця з значеннями $dTmD$ (у $^{\circ}C$) отриманими у результаті тестування сполуки C12C11M-C1 проти SIRT1, BRD4 та CA методом визначення зсуву температури плавлення. Дані продемонстровані для кожної тестованої концентраційної точки.

Концентрація, мкМ	SIRT1 $dTmD$, $^{\circ}C$	BRD4 $dTmD$, $^{\circ}C$	CA $dTmD$, $^{\circ}C$
0,78	-0,1	-0,15	-0,05
1,56	-0,1	-0,15	-0,05
3,12	-0,15	-0,05	0,05
6,25	-0,15	-0,1	0,05
12,5	-0,2	-0,1	0,05
25	-0,25	-0,05	-0,05
50	-0,5	0,05	-0,15
100	-1,5	-0,2	-0,4

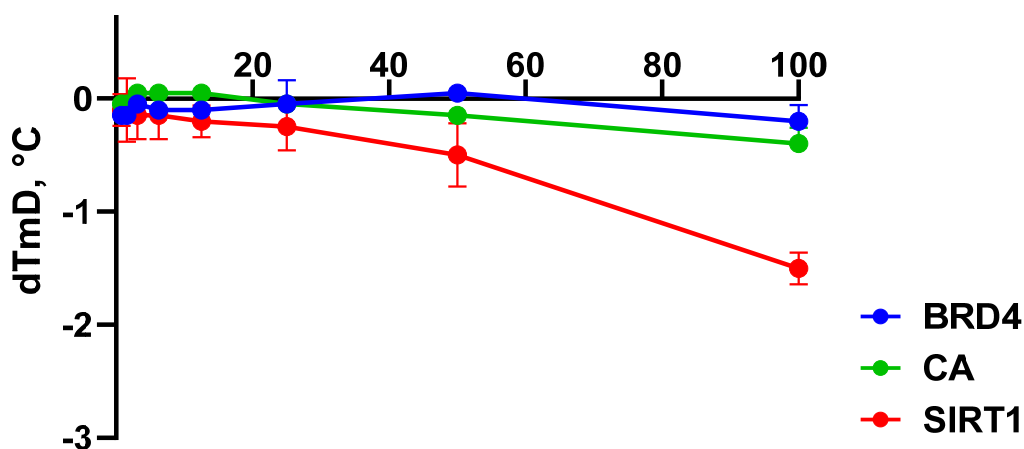


Рис 3.2. Термічний зсув (dTm , $^{\circ}C$) протестованої сполуки проти SIRT1, BRD4 та CA методом TCA.

Для порівняння також використовували інформацію про температурний зсув спричинений контрольними сполуками Нікотинамід, Ацетазоламід та CHEMBL1828978 на їх відповідну мішень, продемонстровані на рисунку 3.3.

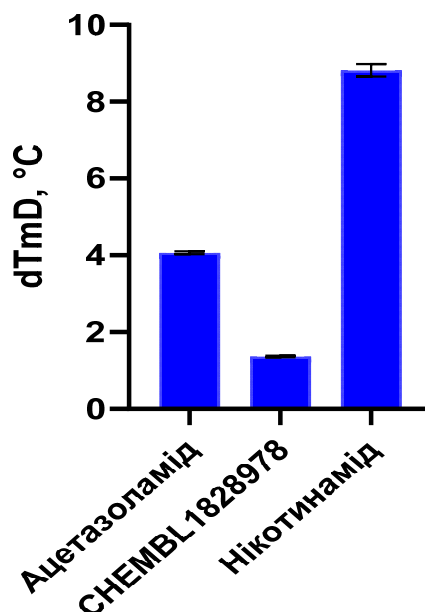


Рис 3.3. Термічний зсув, викликаний контрольними сполуками Ацетазоламід, CHEMBL1828978 та Нікотинамід на CA, BRD4 та SIRT1 відповідно.

Для перевірки на здатність до інгібування ферментативної активності SIRT1 за допомогою функціональних аналізів. Такими є ензиматичні ессеї: SIRT-Glo та ADP-Glo Kinase assays.

3.3. Результати тестування сполуки методом SIRT-Glo та ADP-Glo

Щоб перевірити вплив сполуки, для якої було передбачено потенційну протипухлинну дію[1], на активність інгібування деацетилази SIRT1, а також на предмет взаємодії з кіназами Aurora A/B та JAK2, проводили дослідження ферментативної активності *in vitro*. Умови контролю якості експерименту були витримані та дані можуть вважатись надійними (Таблиця 3.4).

Таблиця 3.4. Параметри для контролю якості проведеного експерименту тестування сполуки C12C1IM-Cl проти SIRT1, BRD4 та CA на предмет інгібування ензиматичної активності за допомогою SIRT-Glo та ADP-Glo кіназних есеїв. Наведені дані для тестованих плат для кожної мішені дослідження. Містить інформацію про значення RZ' та RS/S (в умовних одиницях).

Блок	RZ' prime	RS/B
SIRT1	0,711	5,05
Aurora A	0,83	18,35
Aurora B	0,54	3,02
JAK2	0,536	7,87

Як видно з результатів підсумованих у таблиці 3.5 та на рисунку 3.4 сполука C12C1IM-Cl продемонструвала найбільшу активність щодо SIRT1 зі значеннями IC50 34,5 мкМ. Зазвичай для створення потенційних лікарських препаратів рекомендованими значеннями IC50 є 1-10 мкМ, проте це вже є якісним експериментальним підґрунтям для розвитку сполуки C12C1IM-Cl, як перспективний препарат у протираковій терапії. Проте, також може спостерігатись вплив на активність JAK2, що за стандартного обрахунку IC50 надає результат, що наближається до 70 мкМ. У даному випадку, оскільки сполука не демонструє чіткого нижнього та верхнього плато (максимальне інгібування лише 76%), визначене значення активності не може вважатись надійним.

Ці результати демонструють, що сполука інгібувала активність деацетилази SIRT1, що підтверджує та доповнює результати на предмет зв'язування *in vitro* описані у попередньому підрозділі. Більше того, ці результати можуть пояснити цитотоксичний ефект на клітини нейробластоми

SK-N-DZ, що були отримані у попередньому етапі дослідження[1]. Було припущено, що ці клітини мають високий рівень ампліфікації MYCN, і враховуючи, що саме активність SIRT1 корелює з активністю та стабільністю N-MYC, ймовірно, що ця сполука змінює кілька внутрішньоклітинних шляхів у клітинах нейробластоми, стримуючи їх прогресію та пухлиноутворення[1].

Таблиця 3.5. Значення IC50 сполук та Hill Slope, що отримані в результаті проведених ензиматичних есеїв проти білків-мішеней (SIRT1, Aurora A/B та JAK2). N/A використовується для позначення у випадку, якщо IC50 не може бути визначено.

Мішень	Активність інгібування сполуки C12C1IM-C1			
	SIRT1	Aurora A	Aurora B	JAK2
IC50, мкМ	34,4	N/A	N/A	N/A
Hill Slope	1,2	-	-	-

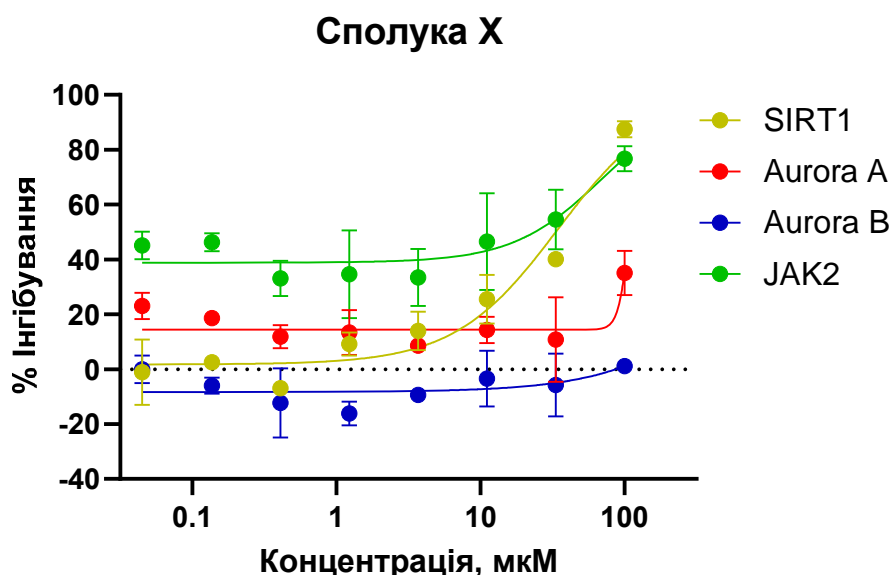


Рис 3.4. Доз-залежне інгібування ензиматичної активності SIRT1, Aurora A, Aurora B та JAK2 тестованою сполукою (позначені кольорами відносно мішені дослідження).

Для порівняння також використовували інформацію про силу інгібування референтними сполуками: Нікотинамід, Алісертіб та Барасертіб на їх відповідну мішень (SIRT1, Aurora A, Aurora B), що продемонстровані на рисунку 3.5 та таблиці 3.6.

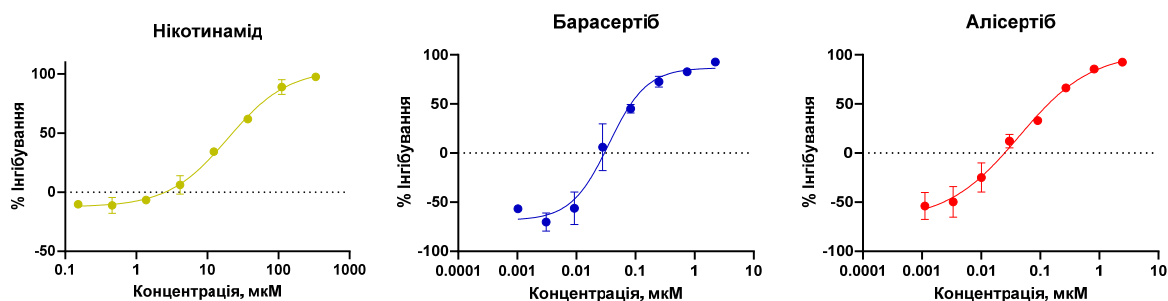


Рис 3.5. Доз-залежне інгібування ензиматичної активності SIRT1, Aurora A та Aurora B референтними сполуками відповідних мішеней (позначені кольорами, що відповідають легенді рисунку 3.4).

Таблиця 3.6. Значення IC50 та Hill Slope сполук, що були отримані в результаті проведених ензиматичних есеїв проти білків-мішеней (SIRT1, Aurora A та JAK2).

Мішень	Активність інгібування сполуки C12C1IM-C1		
	Нікотинамід (SIRT1)	Алісертіб (Aurora A)	Барасертіб (Aurora B)
IC50	19,5 мкМ	43 нМ	35 нМ
Hill Slope	1	0,71	1,359

Дані тестування сполук на предмет інгібування активності білків були також порівнянні з попередньоотриманими результатами *in silico* досліджень за допомогою моделі передбачення протипухлинної активності проти клітин нейробластоми та лейкемії, які підсумовані у таблиці 3.7[1].

Таблиця 3.7. Значення $\text{Log}(1/\text{IC}_{50})$ для порівняння сили інгібування сполукою C12C1IM-C1 активності білків-мішеней та передбаченої протипухлинної активності хронічної мієлоїдної лейкемії та нейробластоми. З *in vitro* етапу зібрані результати погруповані відносно біологічної мішені з вказуванням асоційованого типу раку (НБ чи ХМЛ). Для результатів *in silico* результати поділені лише за захворюванням. Джерело:[1]

Log(1/IC50) отримані in vitro			Log(1/IC50) отримані in silico	
SIRT1 (ХМЛ, НБ)	Aurora A/B (ХМЛ, НБ)	JAK2 (ХМЛ)	НБ	ХМЛ
4,46	-	-	5,13	4,33

З даних видно, що результати *in vitro* та передбачення *in silico* відтворились з варіабельністю менш ніж на один порядок значень IC_{50} , що може вважатись підтвердженням прогнозованих результатів.

Крім того, цікавим є ознаки активності проти мішені JAK2, що були описані вище. JAK2 значно більше асоційований з лейкемією і це є цікавим, враховуючи, що значення $\text{Log}(1/\text{IC}_{50})$ відтворює в більшій мірі результати передбачення проти ХМЛ, ніж НБ. Можна припустити, що модель передбачення ХМЛ є більш точнішою щодо цієї сполуки, та активність інгібування SIRT1 обумовлена в частості каскадами, що асоційовані з ХМЛ. Проте, це в свою чергу, не доповнює припущення про можливий вплив на лінії клітин пов'язаний з НБ, описані вище та в опублікованій роботі[1].

Підсумовуючи усі отримані результати – було отримано важливе підтвердження успішного проведення етапу *in silico* та методів, що були використані під час цього, що несе важливе практичне значення для подальших досліджень використовуючи створені моделі та проведену методологію дослідження.

ВИСНОВКИ

Дана робота була присвячена дослідженню методами *in vitro* сполуки, для якої на етапах *in silico* передбачили потенційну протипухлинну активність (в контексті нейробластоми та хронічної мієлоїдної лейкемії) та висунуто припущення щодо потенційного комплексоутворення з білками-мішенями, що асоційовані з онкогенезом таких захворювань як нейробластома та хронічна мієлоїдна лейкемія. В результаті дослідження:

1. Протестували сполуку методом визначення зсуву температури плавлення. Сполука C12C1IM-Cl продемонструвала найсильніший специфічний та дозо-залежний вплив на SIRT1.

2. Визначили інгібіторну активність синтезованої сполуки проти SIRT1, Aurora A, Aurora B та JAK2. Було відзначено, що сполука C12C1IM-Cl інгібує активність SIRT1 та визначено IC50, що дорівнює 34,5мкМ відповідно.

3. На основі отриманих результатів *in vitro* етапів можна стверджувати про створення якісних моделей та успішне проведення етапу *in silico*, що надало можливість ідентифікувати перспективні сполуки.

Крім того, встановлені показники впливу на мішені та селективності ферментативної дії сполуки C12C1IM-Cl дають змогу рекомендувати її як перспективний кандидат для подальшої розробки протипухлинних засобів для терапії хронічної мієлоїдної лейкемії та нейробластоми[1].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] A. Gryniukova *et al.*, “Anticancer activity features of imidazole-based ionic liquids and lysosomotropic detergents: in silico and in vitro studies,” *Mol Divers*, 2024, doi: 10.1007/s11030-023-10779-4.
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, N. S. Wagle, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2023,” *CA Cancer J Clin*, vol. 73, no. 1, 2023, doi: 10.3322/caac.21763.
- [3] C. A. Amjad, M, “Cancer Chemotherapy - StatPearls - NCBI Bookshelf,” *In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.*
- [4] R. Ali *et al.*, “New anticancer agents: Recent developments in tumor therapy,” *Anticancer Research*, vol. 32, no. 7. 2012.
- [5] American Cancer Society, “Key Statistics About Neuroblastoma,” <https://www.cancer.org/cancer/types/neuroblastoma/about/key-statistics.html>.
- [6] American Cancer Society, “Key Statistics for Chronic Myeloid Leukemia,” <https://www.cancer.org/cancer/types/chronic-myeloid-leukemia/about/statistics.html>.
- [7] C. Cerchia, J. Correa Basurto, A. Lupo, and A. Lavecchia, “Editorial: Recent trends in anti-cancer drug discovery by in silico methods,” *Frontiers in Drug Discovery*, vol. 4, May 2024, doi: 10.3389/fddsv.2024.1420267.
- [8] M. Marçãõ, S. Müller, P. L. P. Xavier, and T. M. Malta, “Stemness inhibition by (+)-JQ1 in canine and human mammary cancer cells revealed by machine learning,” *Frontiers in Drug Discovery*, vol. 2, Aug. 2022, doi: 10.3389/fddsv.2022.953988.
- [9] O. Iwaloye *et al.*, “Computer-aided drug design in anti-cancer drug discovery: What have we learnt and what is the way forward?,” *Inform Med Unlocked*, vol. 41, p. 101332, 2023, doi: 10.1016/j.imu.2023.101332.
- [10] J. B. Menendez-Gonzalez, K. E. Strange, M. Bassetto, A. Brancale, N. P. Rodrigues, and S. Ferla, “Ligand-based discovery of a novel GATA2 inhibitor targeting acute myeloid leukemia cells,” *Frontiers in Drug Discovery*, vol. 2, Oct. 2022, doi: 10.3389/fddsv.2022.1013229.

- [11] Broad Institute, “DepMap Portal | Chronic Myeloid Leukemia,” <https://depmap.org/portal/context/Chronic%20Myeloid%20Leukemia%2C%20BCR-ABL1%2B>.
- [12] Broad Institute, “DepMap Portal | Neuroblastoma,” <https://depmap.org/portal/context/Neuroblastoma>.
- [13] F.-. J. Chen, A. Asokan, and M. J. Cho, “Cytosolic delivery of macromolecules: I. Synthesis and characterization of pH-sensitive acyloxyalkylimidazoles,” *Biochim Biophys Acta*, vol. 1611, 2003, doi: 10.1016/S0005-2736(03)00049-X.
- [14] M. Cea *et al.*, “Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells,” *PLoS One*, vol. 6, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0022739.
- [15] C. A. Moreira-Nunes *et al.*, “Targeting aurora kinases as a potential prognostic and therapeutical biomarkers in pediatric acute lymphoblastic leukaemia,” *Sci Rep*, vol. 10, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-78024-8.
- [16] J. Leonard *et al.*, “Aurora A kinase as a target for therapy in TCF3-HLF rearranged acute lymphoblastic leukemia,” *Haematologica*, vol. 106, 2021, doi: 10.3324/haematol.2021.278692.
- [17] M. Michaelis *et al.*, “Aurora kinases as targets in drug-resistant neuroblastoma cells,” *PLoS One*, vol. 9, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108758.
- [18] M. Rishfi *et al.*, “Targeted AURKA degradation: towards new therapeutic agents for neuroblastoma,” *Eur J Med Chem*, vol. 247, 2023, doi: 10.1016/j.ejmech.2022.115033.
- [19] T. J. O’Donohue *et al.*, “Translational strategies for repotrectinib in neuroblastoma,” *Mol Cancer Ther*, vol. 20, 2021, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0126.
- [20] M. M. Reddy, A. Deshpande, and M. Sattler, “Targeting JAK2 in the therapy of myeloproliferative neoplasms,” *Expert Opin Ther Targets*, vol. 3, 2012, doi: 10.1517/14728222.2012.662956.
- [21] O. Yogev *et al.*, “In vivo modeling of chemoresistant neuroblastoma provides new insights into chemorefractory disease and metastasis,” *Cancer Res*, vol. 79, 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2759.

- [22] T. Kokkola *et al.*, “BET Inhibition Upregulates SIRT1 and Alleviates Inflammatory Responses,” *ChemBioChem*, vol. 16, no. 14, 2015, doi: 10.1002/cbic.201500272.
- [23] S. Shen *et al.*, “BRD4 Inhibition Protects Against Acute Pancreatitis Through Restoring Impaired Autophagic Flux,” *Front Pharmacol*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00618.
- [24] Y. Jiang *et al.*, “Targeting SIRT1 synergistically improves the antitumor effect of JQ-1 in hepatocellular carcinoma,” *Heliyon*, vol. 9, no. 11, 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22093.
- [25] Y. Fujita and T. Yamashita, “Sirtuins in Neuroendocrine Regulation and Neurological Diseases,” *Front Neurosci*, vol. 12, Oct. 2018, doi: 10.3389/fnins.2018.00778.
- [26] S. Pillarisetti, “A review of Sirt1 and Sirt1 modulators in cardiovascular and metabolic diseases,” *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, vol. 3, no. 3. 2008. doi: 10.2174/157489008786263989.
- [27] A. Drazic, L. M. Myklebust, R. Ree, and T. Arnesen, “The world of protein acetylation,” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1864, no. 10. 2016. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
- [28] R. N. Saha and K. Pahan, “HATs and HDACs in neurodegeneration: A tale of disconcerted acetylation homeostasis,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 4. 2006. doi: 10.1038/sj.cdd.4401769.
- [29] Z. Lin and D. Fang, “The Roles of SIRT1 in Cancer,” *Genes and Cancer*, vol. 4, no. 3–4. 2013. doi: 10.1177/1947601912475079.
- [30] M. Farcas *et al.*, “SIRT1 in the Development and Treatment of Hepatocellular Carcinoma,” *Frontiers in Nutrition*, vol. 6. 2019. doi: 10.3389/fnut.2019.00148.
- [31] M. D. Jin, Y. W. Zhi, C. S. Dao, X. L. Ru, and Q. W. Sheng, “SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity,” *J Cell Physiol*, vol. 210, no. 1, 2007, doi: 10.1002/jcp.20831.
- [32] G. M. Marshall *et al.*, “SIRT1 promotes N-Myc oncogenesis through a positive feedback loop involving the effects of MKP3 and ERK on N-Myc protein stability,” *PLoS Genet*, vol. 7, 2011, doi: 10.1371/journal.pgen.1002135.

- [33] Z. Nemeth, E. Kiss, and I. Takacs, "The Role of Epigenetic Regulator SIRT1 in Balancing the Homeostasis and Preventing the Formation of Specific 'soil' of Metabolic Disorders and Related Cancers," *Frontiers in Bioscience - Landmark*, vol. 27, no. 9. 2022. doi: 10.31083/j.fbl2709253.
- [34] A. Gryniukova *et al.*, "AI-Powered Virtual Screening of Large Compound Libraries Leads to the Discovery of Novel Inhibitors of Sirtuin-1," *J Med Chem*, vol. 66, no. 15, 2023, doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c00128.
- [35] L. M. Garcia-Peterson and X. Li, "Trending topics of SIRT1 in tumorigenicity," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1865, no. 9. 2021. doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129952.
- [36] B. N. Devaiah, A. Geronne, and D. S. Singer, "Bromodomain 4: a cellular Swiss army knife," *J Leukoc Biol*, vol. 100, no. 4, 2016, doi: 10.1189/jlb.2ri0616-250r.
- [37] D. S. Tyler *et al.*, "Click chemistry enables preclinical evaluation of targeted epigenetic therapies," *Science (1979)*, vol. 356, no. 6345, 2017, doi: 10.1126/science.aal2066.
- [38] S. Eyre and J. Worthington, "Take your PICS: Moving from GWAS to Immune Function," *Immunity*, vol. 41, no. 6. 2014. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.014.
- [39] H. Denes *et al.*, "Super-enhancers in the control of cell identity and disease," *Cell*, 2013.
- [40] D. Zheng *et al.*, "Emerging roles of Aurora-A kinase in cancer therapy resistance," *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 13, no. 7. 2023. doi: 10.1016/j.apsb.2023.03.013.
- [41] I. Roeschert *et al.*, "Combined inhibition of Aurora-A and ATR kinases results in regression of MYCN-amplified neuroblastoma," *Nat Cancer*, vol. 2, no. 3, 2021, doi: 10.1038/s43018-020-00171-8.
- [42] C. Wang, J. Chen, W. Cao, L. Sun, H. Sun, and Y. Liu, "Aurora-B and HDAC synergistically regulate survival and proliferation of lymphoma cell via AKT, mTOR and Notch pathways," *Eur J Pharmacol*, vol. 779, 2016, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.11.049.

- [43] D. Bogen *et al.*, “Aurora B kinase is a potent and selective target in MYCN-driven neuroblastoma,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 34, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.6208.
- [44] C. H. Lee, H. K. Lim, J. Sakong, Y. S. Lee, J. R. Kim, and S. H. Baek, “Janus kinase-signal transducer and activator of transcription mediates phosphatidic acid-induced interleukin (IL)-1 β and IL-6 production,” *Mol Pharmacol*, vol. 69, no. 3, 2006, doi: 10.1124/mol.105.018481.
- [45] X. Hu, J. li, M. Fu, X. Zhao, and W. Wang, “The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 1. 2021. doi: 10.1038/s41392-021-00791-1.
- [46] J. J. O’Shea, D. M. Schwartz, A. V. Villarino, M. Gadina, I. B. McInnes, and A. Laurence, “The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention,” *Annu Rev Med*, vol. 66, 2015, doi: 10.1146/annurev-med-051113-024537.
- [47] S. Banerjee, A. Biehl, M. Gadina, S. Hasni, and D. M. Schwartz, “JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects,” *Drugs*, vol. 77, no. 5. 2017. doi: 10.1007/s40265-017-0701-9.
- [48] A. V. Villarino, Y. Kanno, and J. J. O’Shea, “Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system,” *Nature Immunology*, vol. 18, no. 4. 2017. doi: 10.1038/ni.3691.
- [49] J. J. O’Shea and R. Plenge, “JAK and STAT Signaling Molecules in Immunoregulation and Immune-Mediated Disease,” *Immunity*, vol. 36, no. 4. 2012. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.014.
- [50] O. V. Savych *et al.*, “The iterative application of a large chemical space in the drug discovery process,” *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, vol. 19, no. 4(76), 2021, doi: 10.24959/ophcj.21.244362.
- [51] K. Huynh and C. L. Partch, “Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay,” *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 79, 2015, doi: 10.1002/0471140864.ps2809s79.
- [52] Promega, *SIRT-GloTM Assay and Screening System*. USA, 2014.
- [53] Sarah Shultz, Franka Ganske, and EJ Dell, “Promega’s ADP-Glo kinase assay,” Promega Corporation, BMG LABTECH.

- [54] Bray MA and Carpenter A, *Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis*. Imaging Platform, Broad Institute of MIT and Harvard, 2017.