

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

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії  
проф. Рябухін Сергій Вікторович  
Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри  
від « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р.

**РАЦІОНАЛЬНИЙ ДИЗАЙН ІНГІБІТОРІВ ТИРОЗИНКІНАЗИ JAK1**

Випускна кваліфікаційна робота магістра  
студентки спеціальності 102 Хімія  
ОП «Високі технології (Хемоінформатика)»  
Васильчук Марини Олександрівни

Науковий керівник від кафедри, д.х.н.  
проф. Рябухін Сергій Вікторович

Робота виконана під керівництвом  
к.б.н. Протопопова Миколи Васильовича

Оцінка захисту роботи

---

Київ-2024

## АНОТАЦІЯ

Васильчук М.О. Раціональний дизайн інгібіторів тирозинкінази JAK1. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 102 Хімія ОП «Високі технології (Хемоінформатика)».

Випускна кваліфікаційна робота присвячена раціональному дизайну інгібіторів протеїнкінази JAK1 з використанням методів комп'ютерного моделювання. Функціонування JAK1 тісно пов'язане із процесами кровотворення, відновлення тканин, імунної відповіді, апоптозу та запалень. Розробка інгібіторів даної протеїнкінази є важливою ланкою у процесі пошуку ліків від ряду захворювань, включаючи різні типи ракових пухлин, аутоімунні порушення, хворобу Паркінсона, астму, ревматоїдний артрит, atopічний дерматит, тощо. У даній роботі було проведено віртуальний скринінг у два етапи. Спочатку було виконано ліганд-орієнтований скринінг, а після цього - рецептор-орієнтований. Нами було проаналізовано тримільйонну колекцію сполук із метою пошуку потенційних інгібіторів JAK1 за допомогою методів розпізнавання молекулярної форми APF RIDE та USRCAT, що враховують структурні та фармакофорні властивості. Для виявлення біологічно активних лігандів протеїнкінази JAK1 було застосовано метод 4D молекулярного докінгу у поєднанні із подальшим *in vitro* тестуванням інгібувальної здатності кандидатів. У результаті дослідження було знайдено два неселективних інгібітора протеїнкінази JAK1 із показниками  $IC_{50}$  41,3 та 30,1 мкМ.

**Ключові слова:** протеїнкіназа JAK1, методи розпізнавання молекулярної форми, молекулярний докінг, тирозинкіназні інгібітори.

## ANNOTATION

Vasylchuk M.O. Computer-aided design of Janus kinase 1 inhibitors. – Master's final qualification work in specialty 102 Chemistry OP "High technologies (Cheminformatics)".

The aim of this final qualification work is to design new JAK1 tyrosine kinase inhibitors using computer modeling methods. The functioning of JAK1 is closely related to the processes of hematopoiesis, tissue repair, immune response, apoptosis and inflammation. The development of inhibitors of this protein kinase is an important step in the process of finding drugs for a number of diseases, including various types of cancer tumors, autoimmune disorders, Parkinson's disease, asthma, rheumatoid arthritis, atopic dermatitis, etc. In this work, virtual screening was carried out in two stages. Ligand-oriented screening was performed first, followed by receptor-oriented screening. We screened a collection of three million compounds for potential JAK1 inhibitors using APF RIDE and USRCAT molecular shape recognition methods that take structural and pharmacophore properties into account. To identify biologically active JAK1 tyrosine kinase ligands, the method of 4D molecular docking was used in combination with further in vitro testing of the candidates' inhibitory ability. As a result of the study, two non-selective JAK1 tyrosine kinase inhibitors were found with IC<sub>50</sub> values of 41.3 and 30.1  $\mu\text{M}$ .

**Key words:** tyrosine kinase JAK1, molecular shape recognition methods, molecular docking, tyrosine kinase inhibitors.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Розділ 1. Огляд літератури.....	7
1.1. Опис будови та функцій протеїнкінази JAK1 та її інгібіторів .....	7
1.1.1. Структура протеїнкінази JAK1 .....	7
1.1.2. Аналіз відомих структур протеїнкінази JAK1 та лігандів.....	10
1.1.3. Функції протеїнкінази JAK1 .....	19
1.1.4. Огляд інгібіторів протеїнкінази JAK1 .....	21
1.1.4.1. Огляд інгібіторів першого покоління .....	23
1.1.4.2. Огляд інгібіторів наступного (другого) покоління.....	25
1.2. Методи молекулярного моделювання .....	27
1.2.1. Методи розпізнавання молекулярної форми .....	27
1.2.2. Молекулярний докінг .....	29
1.2.3. Процедура молекулярного докінгу з використанням програмного пакету Molsoft ICM-Pro .....	31
Розділ 2. Дані та методи.....	33
2.1. Дані. ....	33
2.2. Методи розпізнавання молекулярної форми RIDE та USRCAT.....	33
2.3. Молекулярний докінг. ....	34
Розділ 3. Аналіз результатів.....	39
3.1. Молекулярне моделювання .....	39
3.2. Біохімічне тестування <i>in vitro</i> .....	48
ВИСНОВКИ.....	53
Список використаних джерел .....	54

## ВСТУП

### **Актуальність теми.**

JAK/STAT сигнальний шлях вважається одним із центральних комунікаційних вузлів функціонування клітини. Його діяльність тісно пов'язана із процесами кровотворення, відновлення тканин, імунної відповіді, апоптозу та запалень. Тому порушення JAK/STAT сигнального шляху може призводити до широкого спектру захворювань, таких як злоякісні пухлини, запальні та аутоімунні хвороби [1].

Саме мутації протеїнкінази JAK1 є найчастішими причинами В-клітинного гострого лімфобластного лейкозу, Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозу [2] та системного червоного вовчачка [3]. Було доведено, що JAK1 відіграє вирішальну роль при алергічному риніті [4], астмі [5], ревматоїдному артриті [6], гострій фазі atopічного дерматиту [7], хворобі Паркінсона [8], запальному захворюванню кишечника [9] та різних видах раку [10].

Станом на сьогодні розроблено всього декілька інгібіторів JAK1, які є клінічно схваленими лікарськими засобами. Їхня ефективність у лікуванні численних хвороб підтверджена рядом досліджень. Однак більшість із цих інгібіторів не є селективними і це спричиняє численні побічні ефекти, які включають тромбоцитопенію, анемію, інфекції, хвороби органів шлунково-кишкового тракту і дихальної системи, тощо [11–13]. Також більшість знайдених нині інгібіторів мають подібну будову хімічного каркасу. Відповідно пошук нових інгібіторів може вирішити проблему токсичності та допоможе збільшити хімічне різноманіття.

Таким чином, метою даної роботи є раціональний пошук нових інгібіторів протеїнкінази JAK1 із використанням методів комп'ютерного моделювання.

**Мета дослідження:** раціональний пошук інгібіторів протеїнкінази JAK1 із використанням методів комп'ютерного моделювання.

*Об'єкт дослідження:* протеїнкіназа JAK1 та її інгібітори.

*Методи дослідження:* методи розпізнавання молекулярної форми, молекулярний докінг, *in vitro* тестування інгібування ензиматичної активності.

#### **Особистий внесок здобувача.**

Систематизація та аналіз літературних джерел з даної теми, обробка бібліотеки сполук, формування досліджуваної вибірки молекул, валідація докінгової моделі, проведення молекулярного докінгу, відбір речовин для *in vitro* тестування, узагальнення, аналіз, візуалізація та оформлення отриманих результатів було проведено здобувачем особисто. Тестування інгібування ензиматичної активності *in vitro* було проведено колегами із НВП «Бієнта». Постановка завдання дослідження та обговорення отриманих результатів проводились разом із науковим керівником к.б.н Протопоповим Миколою Васильовичем.

#### **Структура та обсяг роботи.**

Дипломна робота викладена на 68 сторінках і складається зі вступу, трьох розділів, висновків, переліку використаних джерел (124 найменувань). Перший розділ присвячений опису структури протеїнкінази JAK1 та огляду відомих інгібіторів. У другому розділі викладені методи, що були застосовані у даному дослідженні. Третій розділ є описом експериментальної частини та аналізом отриманих результатів дипломної роботи.

## Розділ 1. Огляд літератури

### 1.1. Опис будови та функцій протеїнкінази JAK1 та її інгібіторів

JAK кінрази (Янус-кінрази) – це внутрішньоклітинні нерцепторні протеїнкінази. Сімейство JAK включає чотири представники: JAK1, JAK2, JAK3 і TYK2. Останньою була відкрита протеїнкіназа JAK3 в 2005 році під час пошуку генів, що спричиняють комбінований імунний дефіцит [14]. Після секвенування геному людини інші протеїнкінази цього сімейства знайдені не були, тому вважається, що родина JAK кіназ складається з лише чотирьох членів.

Янус-кінрази експресуються майже в усіх тканинах організму людини [15–20], виключенням є JAK3, яка експресується лише в лімфатичній системі та у кістковому мозку [21]. Ці протеїнкінази відіграють вирішальну роль у JAK-STAT сигнальному шляху, який бере участь у процесах пов'язаних із імунітетом, клітинним поділом та смертю, утворенням ракових пухлин, тощо [22]. Порушення передачі сигналів JAK-STAT може призвести до захворювань шкіри, різних видів раку та аутоімунних хвороб. Саме тому представники JAK протеїнкіназ виявились важливими потенційними мішенями для лікування великого спектру захворювань [23].

#### 1.1.1. Структура протеїнкінази JAK1

Протеїнкіназа JAK1 побудована із семи доменів гомології (JH1-JH7) [24]. Нумерація доменів починається з С-кінця. (Рисунок 1.1, 1.2А)

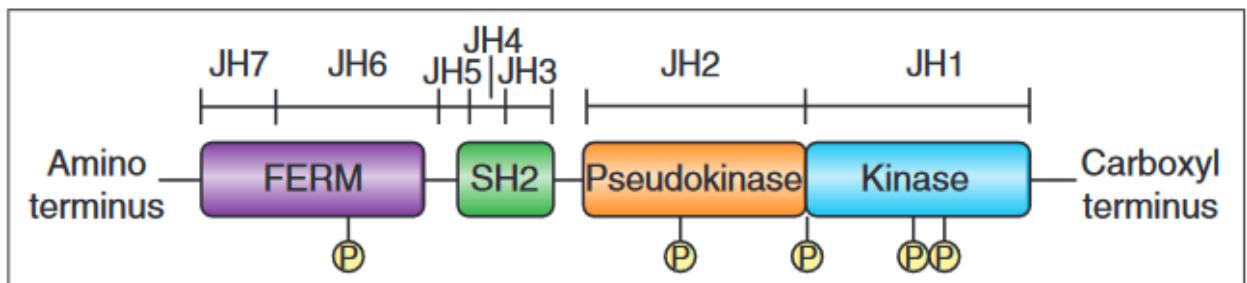


Рисунок 1.1 — Схематичне зображення доменної структури JAK1 [25].

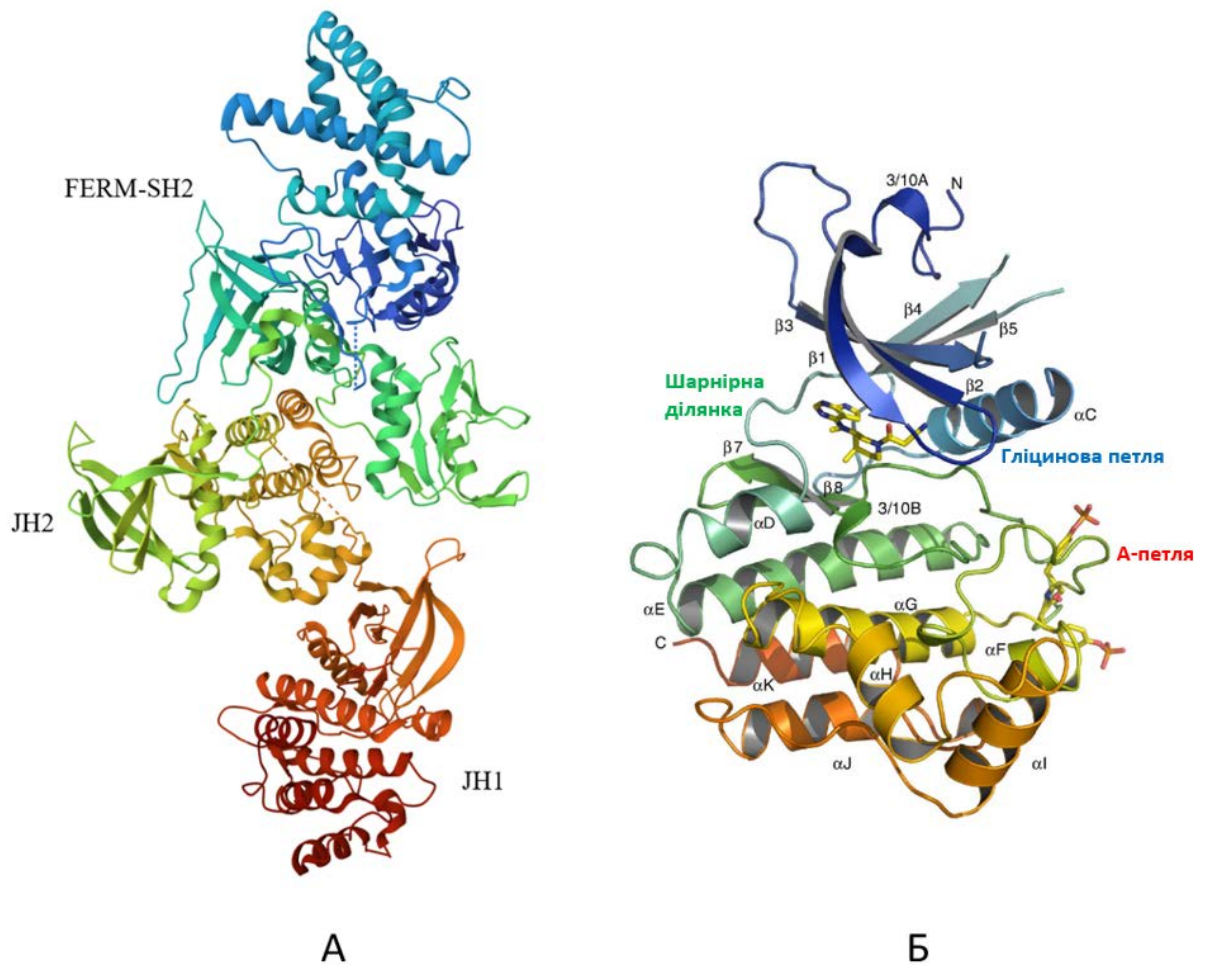


Рисунок 1.2. — А - Тривимірна структура протеїнкінази JAK1. Кристалічна структура взята з Protein Data Bank [26]. Б – тривимірна структура кіназного JH1 домену JAK1 [27].

Домен JH1 є типовим доменом еукаріотичної протеїнкінази (Рисунок 1.2Б). Складається із 278 амінокислотних залишків. Він містить сайт зв'язування АТФ та відповідає за ферментативну активність протеїнкінази. N-кінець складається з п'ятиниткового ( $\beta 1 - \beta 5$ )  $\beta$ -листа та однієї  $\alpha C$ -спіралі. Більша частина домену має спіральну будову з 8  $\alpha$ -спіралей ( $\alpha D - \alpha K$ ) та трьох 3/10 спіралей (3/10B - 3/10D) із антипаралельними  $\beta 7$  та  $\beta 8$  нитками. У кіназному домені присутні також гліцинова петля, шарнірна область і А-петля (петля активації) [27]. У 2018 році була описана фармакофорна модель для АТФ-зв'язувального сайту, що складається з гідрофобної ділянки для утримування аденіну, гідрофобної кишені та гідрофільних ділянок, де зв'язуються залишки цукру та фосфату відповідно (Рисунок 1.3) [28]. У

будові цього домену є два типових для усіх тирозинкіназ тирозини Y1038/Y1039, фосфорилування яких полегшує зв'язування JAK із субстратом шляхом зміни конформації білка. Цікаво те, що JH1 домен тісно пов'язаний з доменами кіназ факторів росту. Цей факт дає змогу припустити, що JAK походять з цього великого сімейства [29].

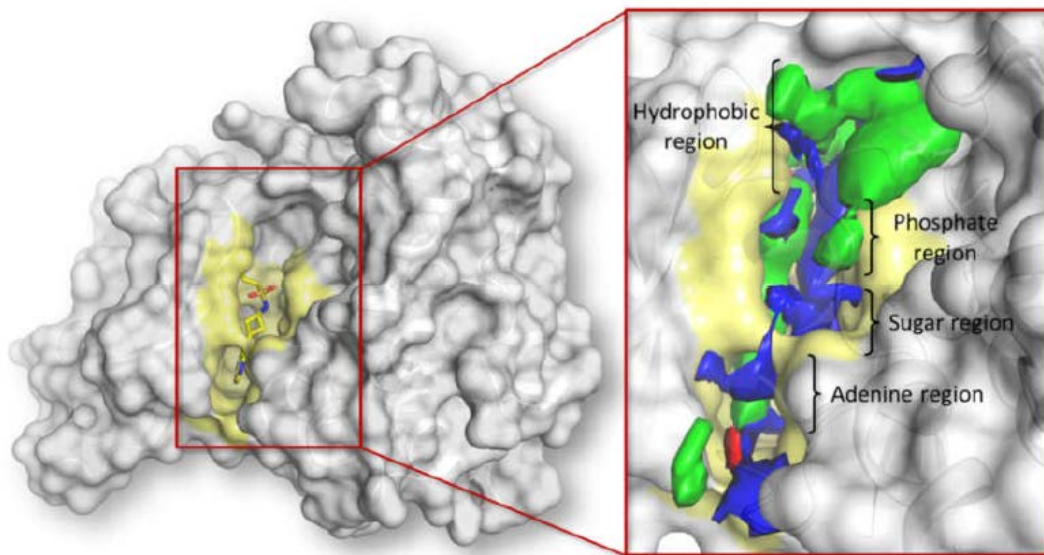


Рисунок 1.3. — Представлення будови сайту зв'язування АТФ (блідо-жовтим кольором). Фармакофорні характеристики, такі як акцепторні групи для формування водневих зв'язків, гідрофобні ділянки та донорні групи, позначені червоним, зеленим та синім кольорами відповідно [28].

Другий домен JH2 – це домен псевдокінази, що відіграє важливу роль у регуляції активності протеїнкінази JAK1. Складається із 272 амінокислотних залишків. Цей домен каталітично неактивний, оскільки не має специфічних амінокислот, що забезпечують активність. Саме наявність кіназного та псевдокіназного доменів стало характеристичною ознакою сімейства і дало їй назву «янус-кінази» (на честь дволикого римського бога Януса). Більшість мутацій, що припиняють активність протеїнкінази присутні саме в JH2, що підкреслює критичну роль цієї структурної частини [30,31].

Домени JH3 та JH4 становлять SH2-домен, що містить 105 амінокислотних залишків та складається із двох  $\alpha$ -спіралей і одного  $\beta$ -листа.

Домени зв'язуються із певними мотивами, що містять залишок тирозину [32,33]. Фосфорилування цього тирозину дає можливість зв'язування домену SH2. Ця структурна частина виконує функцію полегшення асоціації з рецепторами цитокінів [34].

Четверта область янус-кінази є доменом FERM, який складається з JH5, JH6 і JH7 доменів гомології. Він знаходиться на N-кінці та бере участь у зв'язуванні протеїнкінази JAK1 із трансмембранними білками, наприклад, цитокіновими рецепторами. FERM-домен містить 386 амінокислот у своєму складі [35].

### 1.1.2. Аналіз відомих структур протеїнкінази JAK1 та лігандів

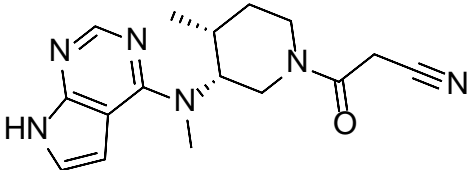
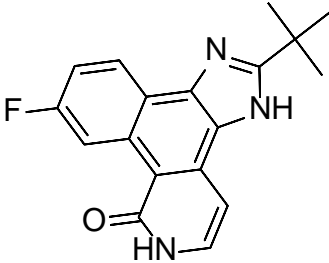
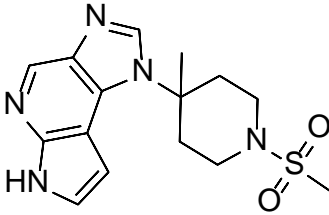
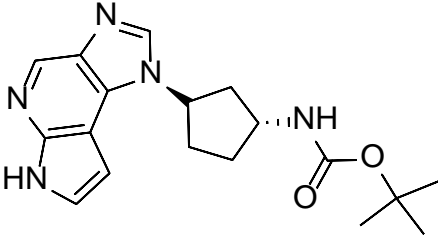
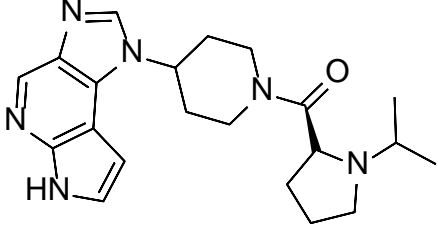
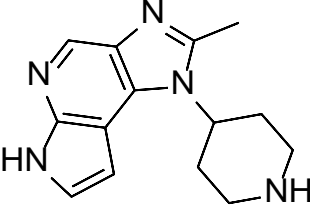
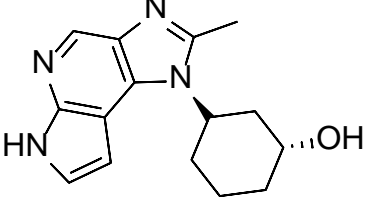
У базі Protein Data Bank описано 50 кристалічних структур протеїнкінази JAK1. Найбільш уживаним методом при дослідженні просторової структури білку є рентгеноструктурний аналіз. На результати такого експерименту впливає роздільна здатність приладу та наявність чи відсутність лігандів, які були б зв'язані з рецептором [36].

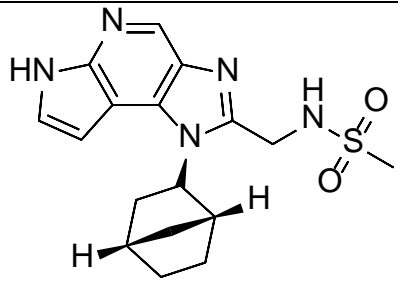
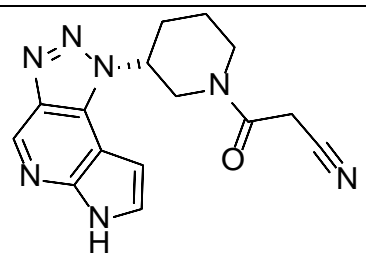
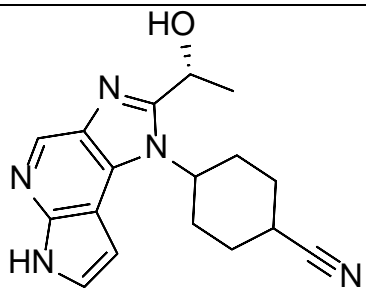
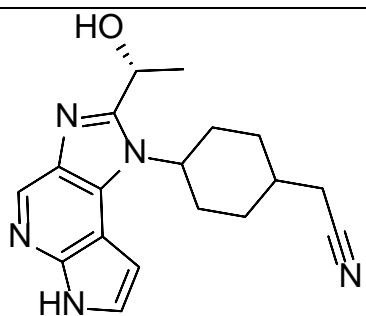
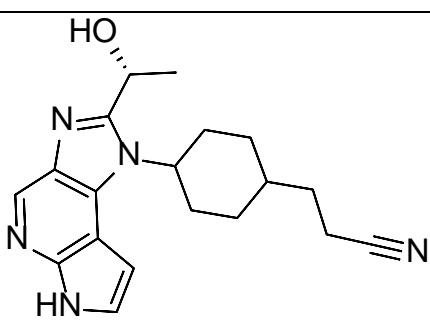
Роздільна здатність – це мінімальна відстань, розміщуючись на якій два об'єкта детектуються окремо, не зливаючись в один предмет. Відповідно, чим нижче значення  $\Delta$ , тим краща роздільна здатність приладу [37].

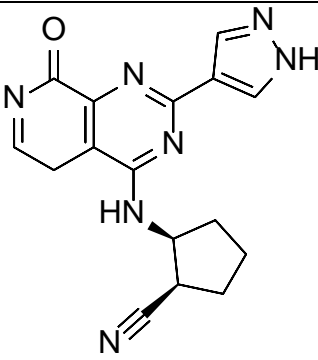
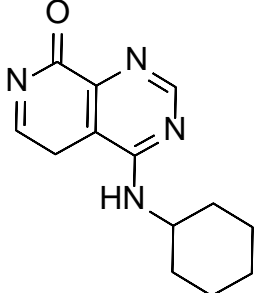
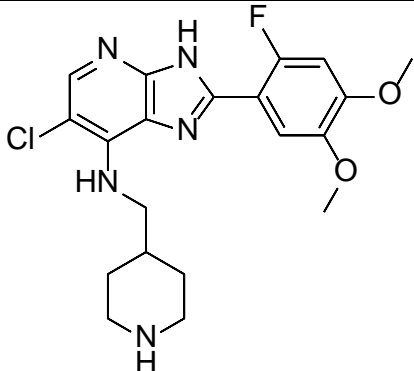
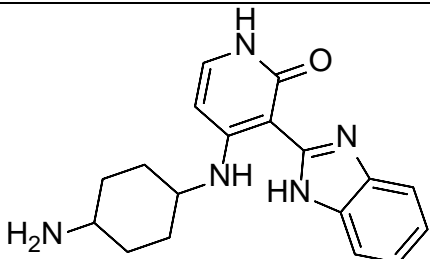
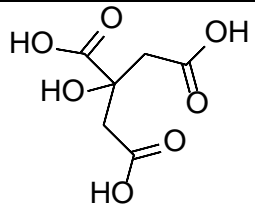
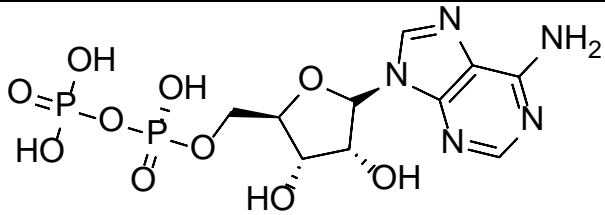
У таблиці 1.1 представлені усі описані на сьогодні структури протеїнкінази JAK1.

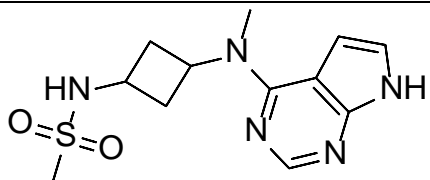
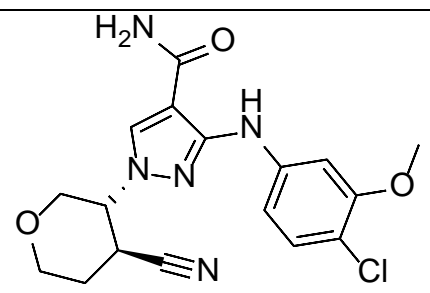
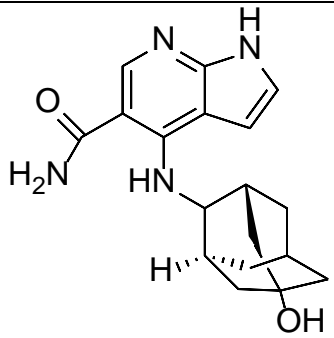
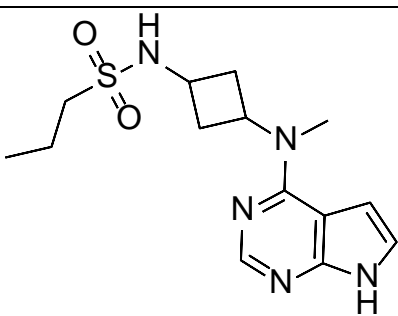
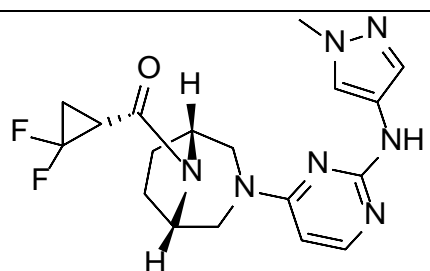
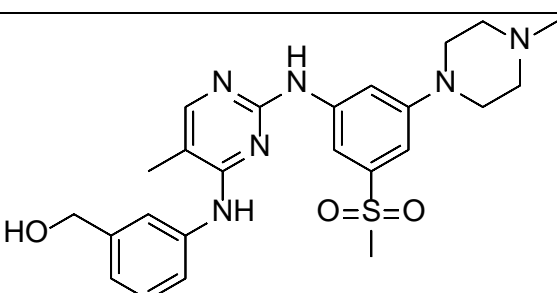
Таблиця 1.1 — Інформація про унікальні кристалічні структури протеїнкінази JAK1, що надає база даних білкових послідовностей Protein Data Bank (Колонки: порядковий номер, ідентифікатор PDB, роздільна здатність, ліганд, з яким зв'язана протеїнкіназа). Метод дослідження просторової структури: рентгеноструктурний аналіз.

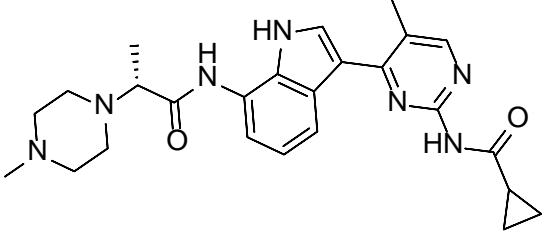
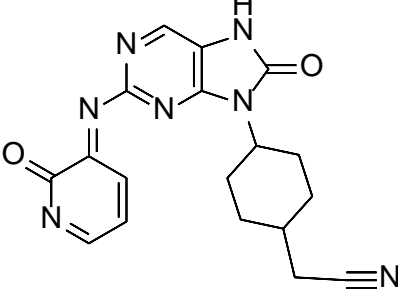
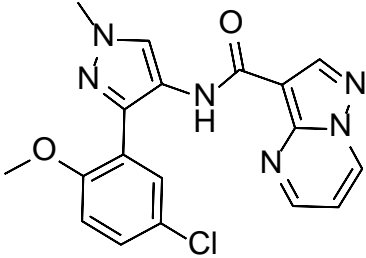
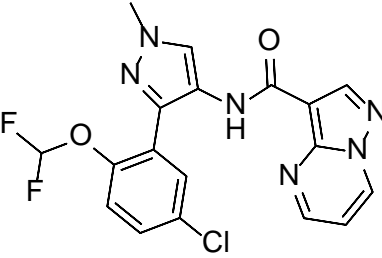
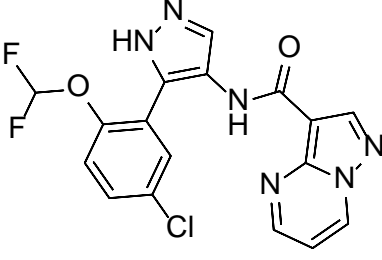
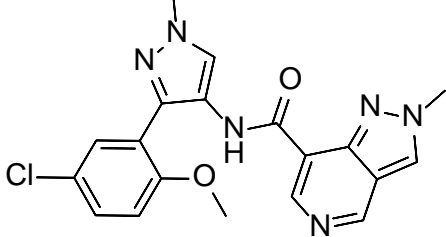
№	PDB_ID	Роздільна здатність	Ліганд
---	--------	---------------------	--------

1.	3EYG	1.90 □	
2.	3EYH	2.00 □	
3.	4E4L	2.00 □	
4.	4E4N	1.90 □	
5.	4E5W	1.86 □	
6.	4EHZ	2.17 □	
7.	4EI4	2.22 □	

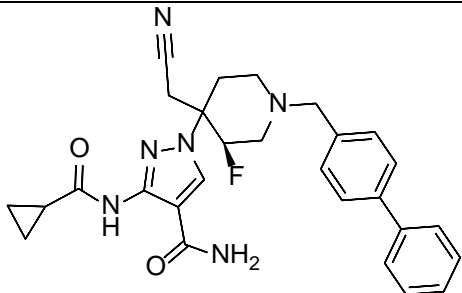
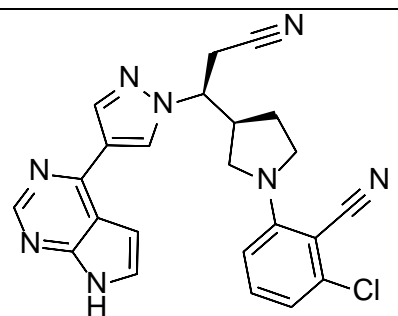
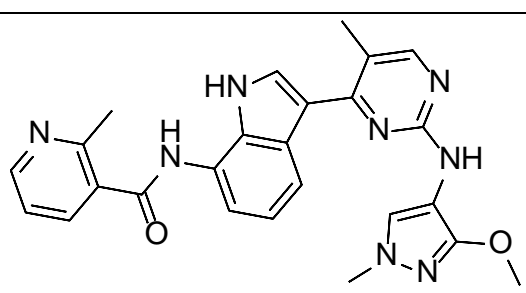
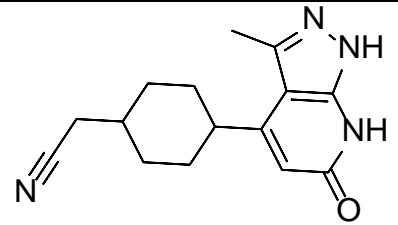
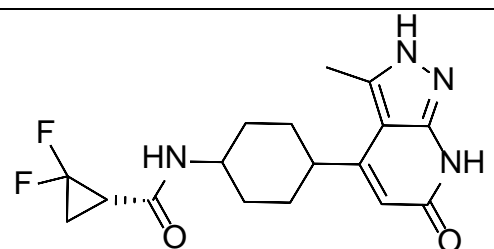
8.	4FK6	2.20 □	
9.	4GS0	1.80 □	Відсутній
10.	4I5C	2.10 □	
11.	4IVB	1.90 □	
12.	4IVC	2.35 □	
13.	4IVD	1.93 □	

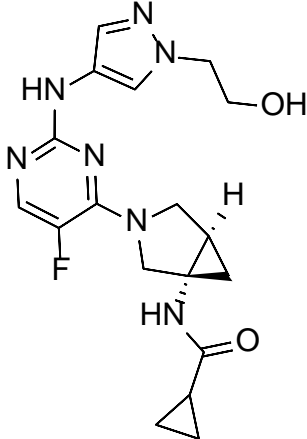
14.	4K6Z	2.73 □	
15.	4K77	2.40 □	
16.	5E1E	2.30 □	
17.	5HX8	2.20 □	
18.	5IXD	2.85 □	
19.	5KHW	2.47 □	

20.	5KHX	2.40 □	
21.	5WO4	1.84 □	
22.	6AAH	1.83 □	
23.	6BBU	2.08 □	
24.	6DBN	2.48 □	
25.	6ELR	1.80 □	

26.	6GGH	1.70 □	
27.	6HZU	2.20 □	
28.	6N77	1.64 □	
29.	6N78	1.83 □	
30.	6N79	2.27 □	
31.	6N7A	1.33 □	

32.	6N7B	1.81 □	
33.	6N7C	1.69 □	
34.	6N7D	1.78 □	
35.	6RSB	1.80 □	
36.	6RSD	1.76 □	
37.	6RSE	1.80 □	

38.	6RSH	1.71 □	
39.	6SM8	1.85 □	
40.	6SMB	2.04 □	
41.	6TPE	2.87 □	
42.	6TPF	2.31 □	

43.	6W8L	2.11 □	
-----	------	--------	--

Як видно з таблиці 1.1, найкраща роздільна здатність у структур із ідентифікатором 6N7A та 6N7C (роздільна здатність 1.33 □ та 1.69 □ відповідно). Саме їх ми обрали для нашої наукової роботи. Порівнюючи будову їх сайтів зв'язування, можна помітити різницю у розміщенні амінокислотного залишку глутамінової кислоти Glu966 (Рисунок 1.4А та 1.4Б).

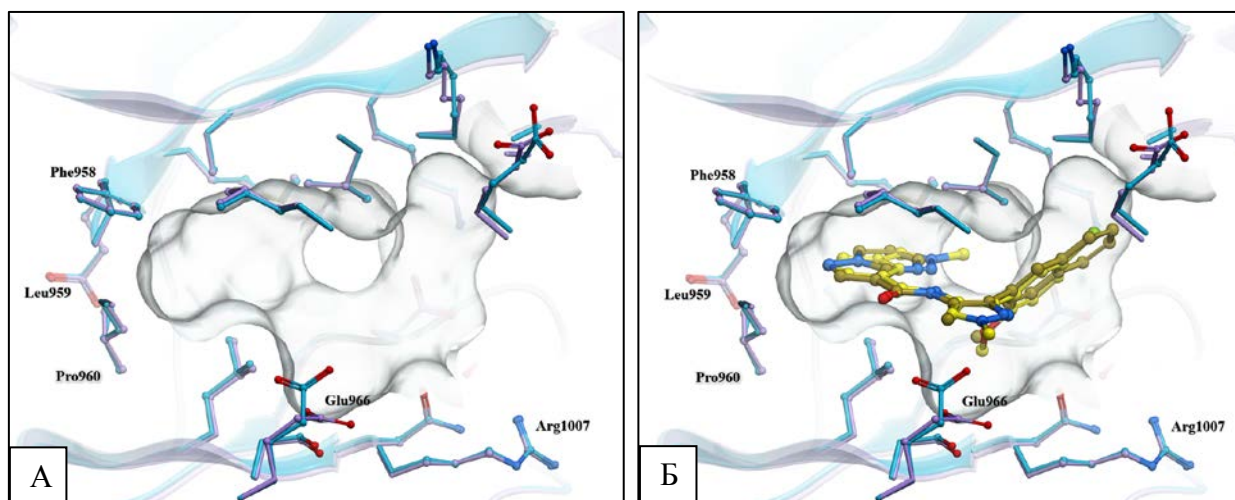


Рисунок 1.4. — Будова сайтів зв'язування протеїнкінази JAK1 (PDB ідентифікатор: 6N7A (фіолетовим кольором) та 6N7C (блакитним кольором) )

А – рецепторна кишенька без лігандів; Б – рецепторна кишенька із зв'язаними лігандами N-[3-(2-метокси-5-хлор-феніл)-1-метил-1H-піразол-4-іл]-2-метил-2H-піразоло[4,3-с]піридин-7-карбоксамідом і N-[5-(3-метоксинафтален-2-іл)-1H-піразол-4-іл]піразоло[1,5-а]піримідин-3-карбоксамідом. Зображення створені за допомогою програми Molsoft ICM-Pro 3.9-2.

### 1.1.3. Функції протеїнкінази JAK1

JAK/STAT сигнальний шлях вважається одним із центральних комунікаційних вузлів функціонування клітини. Його діяльність тісно пов'язана з процесами кровотворення, відновлення тканин, імунної відповіді, апоптозу та запалень. Тому порушення JAK/STAT сигнального шляху може призводити до широкого спектру захворювань, особливо злоякісних пухлин та аутоімунних хвороб. У цьому шляху бере участь більше 50 цитокінів і факторів росту, серед них інтерферони (IFN), гормони та інтерлейкіни (IL) [38].

Канонічний JAK/STAT сигнальний шлях починається з того, що ліганд взаємодіє зі своїм рецептором. У результаті цього даний рецептор димеризується (Рисунок 1.5, (1)). Зв'язування із малим лігандом активує протеїнкіназу JAK, яка у свою чергу ініціює фосфорилування тирозину. У результаті формується місце стикування для STAT (Рисунок 1.5, (2)), де він фосфорилується та відривається від рецептора (Рисунок 1.5, (3)). STAT утворює димери унаслідок взаємодії фосфотирозину з доменом SH2 (Рисунок 1.5, (4)). У подальшому ці димери регулюють транскрипцію генів за декількома механізмами: (1) STAT зв'язується зі своїм цільовим сайтом ДНК і це стимулює активацію транскрипції. (2) Утворюється транскрипційний комплекс з non-STAT транскрипційними факторами для запуску транскрипції; (3) Асоціація STAT з non-STAT ДНК-зв'язуючими елементами, що сприяє STAT-залежній транскрипції; (4) Зв'язування факторів транскрипції STAT і non-STAT із кластерами незалежних сайтів зв'язування ДНК (Рисунок 1.5, (5)) [39].

У негативній регуляції передачі сигналів JAK/STAT беруть участь три типи білків регуляції: сімейство PIAS (білковий інгібітор активованого STAT), CIS/SOCS (супресор цитокінового сигналу) і PTPs (протеїнтирозинфосфатаза). PIAS інгібує зв'язування STAT з ДНК шляхом взаємодії з димерами STAT, що призводить до блокування трансдукції сигналу JAK/STAT [40,41]. Сімейство CIS/SOCS має три способи негативної

регуляції JAK/STAT шляху: блокування STAT шляхом зв'язування з рецептором протеїнкінази; інгібування активності протеїнкінази JAK шляхом безпосереднього зв'язування з нею; утворення комплексу елонгін В/С-cullin5, та руйнування JAK (або STAT), що пов'язані з білком SOCS, через деградацію протеасоми та поліубіквітування [42,43]. Білки PTP взаємодіють із JAK або STAT, з метою дефосфорилювати димер STAT чи JAK та тим самим інгібувати фосфорилювання янус-кінази [44,45].

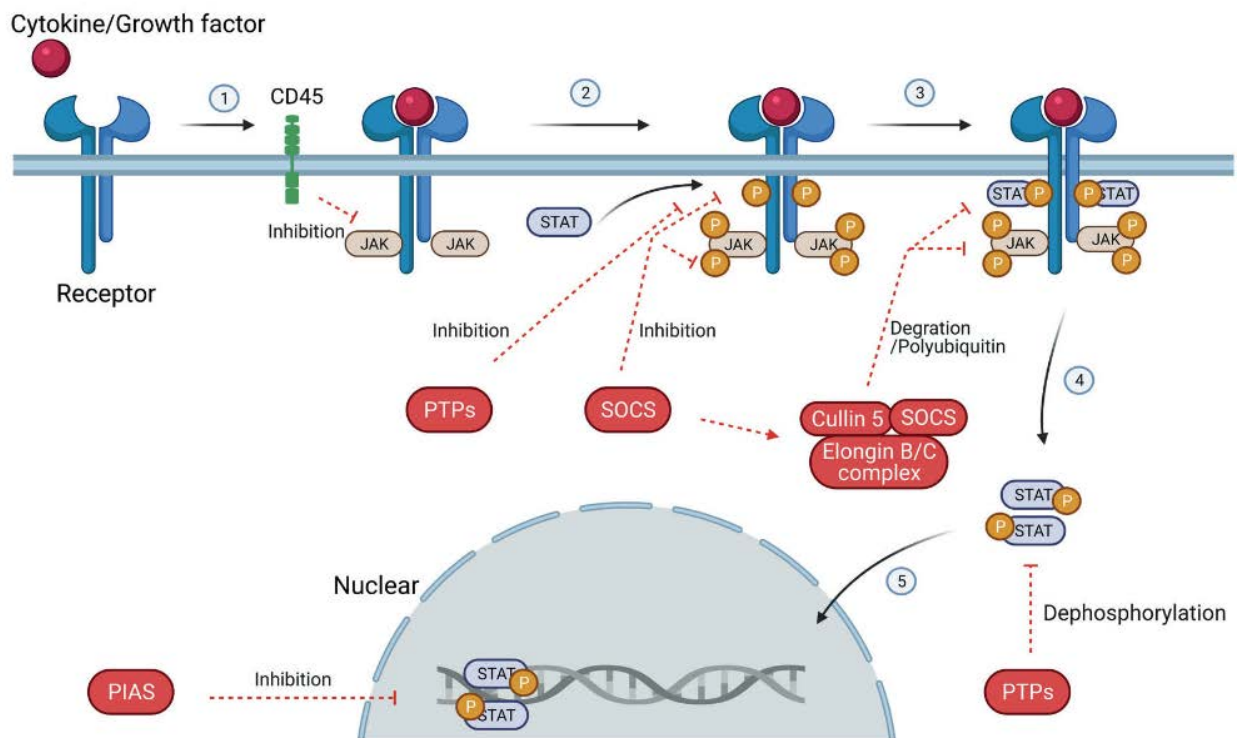


Рисунок 1.5. — Активація та негативна регуляція сигнальних шляхів JAK/STAT [46].

Протеїнкіназа JAK1 пов'язана з великою кількістю цитокінів, а також взаємодіє з фактором інгібітору лейкемії, інтерлейкінами (IL-21, IL-15, IL-11, IL-9, IL-7, IL-6, IL-4 та IL-2), онкостатином М, циліарним нейротрофічним фактором, а також гранулоцитарним колонієстимулюючим фактором [25].

Згідно зі статтею опублікованою у журналі J Exp Med у 2008 році у 3% випадків мутації JAK1 є причинами В-клітинного гострого лімфобластного лейкозу та у 27% випадків причинами Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозу [2]. Також було виявлено, що ключовим фактором у молекулярному

патогенезі системного червоного вовчака є підвищення IFN, опосередкованого шляхом JAK/STAT через протеїнкіназу JAK1 [47]. Крім того, JAK1 пов'язана з гострою фазою atopічного дерматиту шляхом активації клітин Th1 [7]. Протеїнкіназа JAK1 регулює рівень IFN- $\gamma$  та IL-6, що має вплив на протікання хвороби Паркінсона [48]. Також експресія IL-6 спричиняє пригнічення росту волосся [49]. Було доведено, що протеїнкіназа JAK1 відіграє вирішальну роль при алергічному риніті [4], астмі [5], ревматоїдному артриті [6], запальному захворюванні кишечника [9] та різних видах раку [10]. Це доказ того, що інгібітори JAK необхідні для лікування широкого спектру захворювань.

#### **1.1.4. Огляд інгібіторів протеїнкінази JAK1**

Станом на сьогодні розроблено декілька інгібіторів JAK, що вивчаються у доклінічних та клінічних дослідженнях (Рисунок 1.6).

Як видно з рисунку 1.6., більшість інгібіторів є похідними одного класу хімічних сполук – піроло-[2,3-d]піримідини. Будова цього гетероциклу схожа на будову аденіну, що входить до складу АТФ. Завдяки гідрофобним та водневим зв'язкам сполуки із такою гетероцикличесною будовою можуть утримуватися сайтом зв'язування JAK1. Також багато інгібіторів, що наведенні нижче, містять залишки циклоалканів, що встановлюють гідрофобні взаємодії з «рибозною кишенею» протеїнкінази. Сульфонілова та нітрильна групи, що часто зустрічаються у структурах на Рисунку 1.6., зв'язуються із гліциновою петлею JAK1 за допомогою водневих та Ван-дер-ваальсових взаємодій. Часто зустрічаються метилові та етилові алкільні залишки у молекулах інгібіторів, що створюють Ван-дер-ваальсові контакти з сайтом зв'язування.

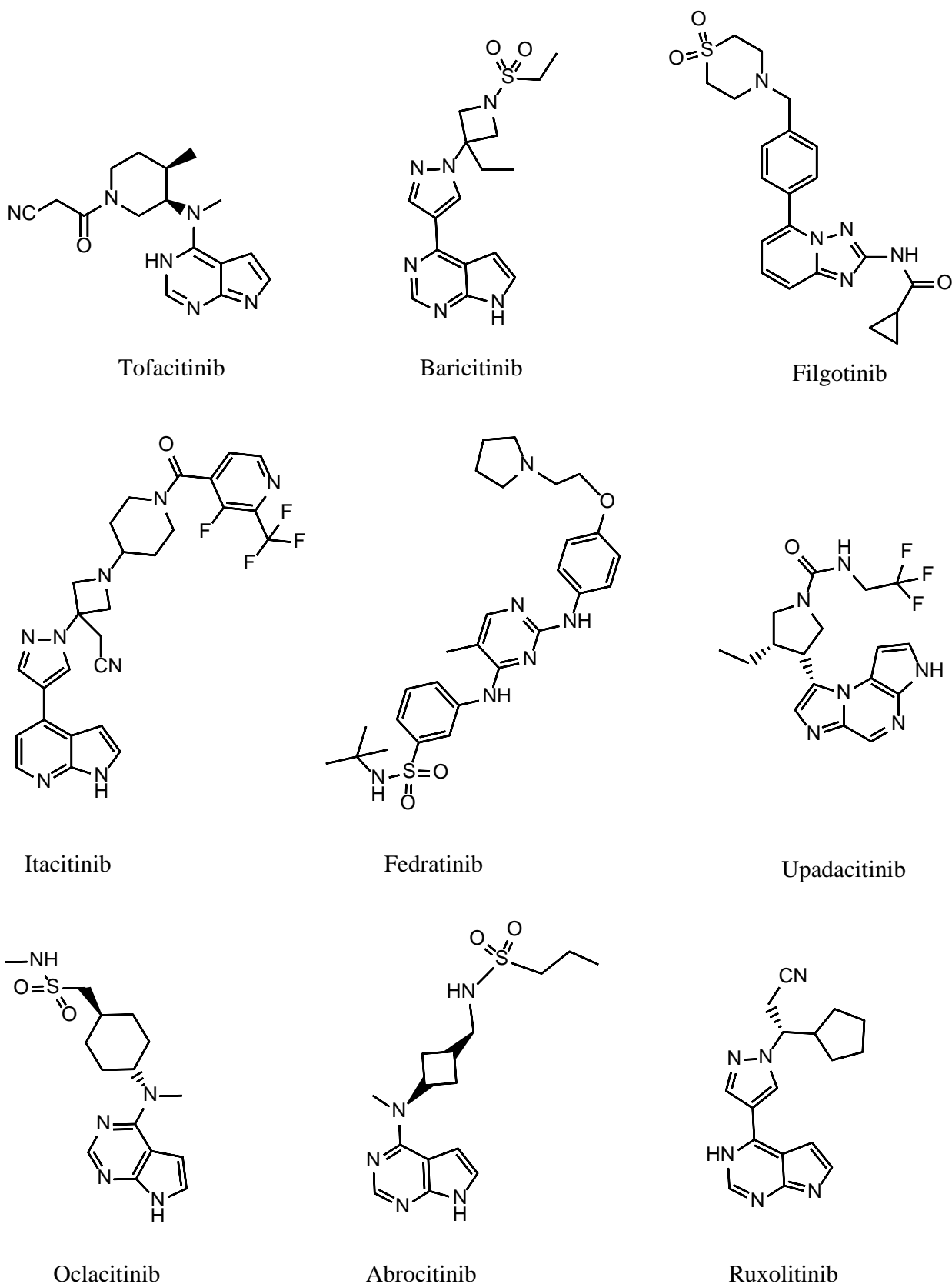


Рисунок 1.6. — Хімічні структури відомих JAK інгібіторів [46].

Інгібітори протеїнкінази JAK1 можна розділити на два покоління за селективністю. Перше покоління – це неселективні інгібітори, такі як

барицитиніб і тофацитиніб. До другого покоління можна віднести селективні інгібітори JAK1, наприклад, філготиніб і упадацитиніб [50].

Інша класифікація базується на способі зв'язування та типі взаємодії. На основі цього інгібітори поділяються на оборотні (конкурентні) та необоротні (неконкурентні) (Рисунок 1.7).

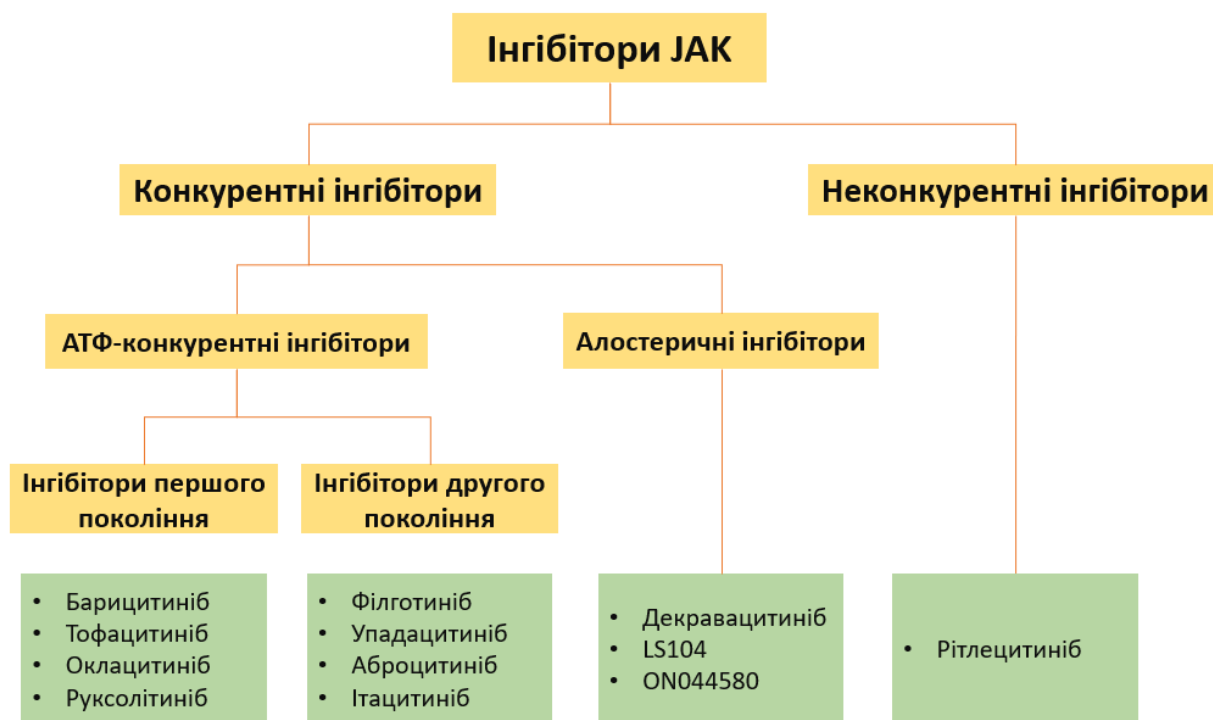


Рисунок 1.7. — Класифікація інгібіторів протеїнкінази JAK1 на основі типу зв'язування та взаємодії з типовими прикладами для кожного типу [51].

Конкурентні інгібітори – це молекули, що утворюють оборотні зв'язки з протеїнкіназою JAK, наприклад водневі чи гідрофобні взаємодії. Група конкурентних інгібіторів включає у себе клас АТФ-конкурентних інгібіторів. Механізм дії цих сполук полягає у конкуренції молекули ліганду з АТФ за АТФ-зв'язуючий сайт протеїнкінази JAK1 [52]. Існує також клас сполук, які націлені не на АТФ-зв'язуючий сайт, а на домен JH2. Прикладом таких молекул є декравацитиніб [53].

#### 1.1.4.1. Огляд інгібіторів першого покоління

Ці сполуки не є селективними щодо протеїнкінази JAK1 та зазвичай націлені на АТФ—зв'язуючий сайт. Вони можуть зв'язуватися з декількома типами янус-кіназ.

Тофацитиніб - це перший інгібітор, який був досліджений на людях та призначений для лікування аутоімунних захворювань. Зазвичай він інгібує JAK1 та JAK3, пригнічуючи утворення цитокінів  $\gamma$ -ланцюга IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23 та TNF [54]. Цей інгібітор показав свою ефективність у клінічних дослідженнях другої та третьої фази. Побічні ефекти тофацитинібу включають опортуністичні інфекції (найчастіше повідомлялось про туберкульоз), тромбоемболію, перфорацію шлунково-кишкового тракту та оперізуючий герпес [55,56]. Також задокументовано 11 летальних випадків серед пацієнтів, що приймали цей лікарський засіб. Спектр ускладнень досить обширний, тому цей препарат досі проходить перевірки на безпеку.

Барицитиніб є пероральним інгібітором протеїнкінази JAK1, який також виявляє високу активність до JAK2 та помірну активність до JAK3 і TYK2. Він є досить ефективним при лікуванні аутоімунних захворювань, наприклад, червоного вовчак, ревматоїдного артриту, дерматоміозиту, діабетичної хвороби нирок, опосередкованого IFN аутозапального захворювання та атопічного дерматиту [57–59]. Барицитиніб також випробовували на тваринах, як ліки від хвороб, що спровоковані вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) [60]. В одному з опублікованих досліджень наукової групи професора Фархада Сейфа зазначаються перспективи використання барицитинібу для лікування COVID-19 [61]. Наголошують, що цей інгібітор знизив рівень IL-6, IL1 $\beta$ , TNF та підвищив рівень антитіл у пацієнтів з тяжкою формою COVID-19, а також спричинив відновлення В-клітин і Т-клітин [62]. До побічних ефектів барицитинібу можна віднести підвищення рівню ліпопротеїнів, часті інфекції, серед них туберкульоз [63,64].

Оклацитиніб - це інгібітор, що діє на сімейство JAK, найбільшу активність виявляє до протеїнкінази JAK1. Оклацитиніб є препаратом для лікування алергій та хвороб шкіри у тварин (кішки та собаки) [65,66]. Щодо використання цього лікарського засобу на людях не опубліковано жодних досліджень.

Руксолітиніб є інгібітором протеїнкіназ JAK1 і JAK2, який застосовують зазвичай перорально. Клінічні дослідження руксолітинібу досі проходять в усьому світу, виявляючи його вплив на різні захворювання, серед яких рак, поліцитемія, опосередкована алопеція, вітиліго, aGVHD, есенціальна тромбоцитемія та COVID-19 [67–71]. Руксолітиніб був схвалений для лікування поліцитемії [72], але він не допоміг пацієнтам із злоякісними пухлинами [73]. Як і барицитиніб, руксолітиніб виявився ефективним у лікуванні COVID-19, але у пацієнтів виникали серйозні пурпурні ураження шкіри та знижувався рівень тромбоцитів [74,75]. Побічними ефектами цього препарату є анемія, тромбоцитопенія, нейтропенія, гіпокаліємія, периферичний набряк, свербіж, акне [76–78]. Також у низці досліджень зазначають, що курс лікування руксолітинібом перервали через його токсичність, синдром відміни та втрату терапевтичної користі через певний час [79]. Оскільки янус-кінази регулюють велику кількість процесів у організмі, руксолітиніб може викликати імуносупресивні захворювання, такі як смертельні важкі інфекції та саркома Капоші [80].

#### **1.1.4.2. Огляд інгібіторів наступного (другого) покоління**

Інгібітори другого покоління характеризуються вищою селективністю до певної протеїнкінази, що зменшує їх побічні дії на організм. Однак ця селективність залежить від дози ліків. У декількох клінічних дослідженнях було доведено, що збільшення концентрації інгібітора наступного покоління у крові супроводжується зниженням його селективності.

Філготиніб - це селективний інгібітор протеїнкінази JAK1. Залежно від дози філготиніб пригнічує диференціювання JAK1-залежних цитокінів (IL-2, IL-4 та IL6), Th1, Th2 і Th17 [81]. Цей лікарський засіб призначається при лікуванні аутоімунних та запальних захворювань [82]. Також філготиніб модулює сплайсинг ВІЛ та інгібує активацію Т-клітин, що може використовуватися для лікування синдрому імунодефіциту людини (СНІД) [83]. Препарат може провокувати інфекції верхніх дихальних шляхів та інші

побічні дії пов'язані з дихальною системою. Зараз філготиніб перебуває у фазі довгострокових клінічних випробувань.

Упадацитиніб відноситься до пероральних лікарських засобів, що інгібує JAK1-залежні цитокіни (IL-6, IL-2, IFN $\gamma$ ). Препарат є альтернативою метотрексата для лікування ревматоїдного артриту [84]. Також дослідники намагаються розширити коло застосування упадацитинібу, а саме, для лікування хвороби Крона [85], атопічного дерматиту [86], виразкового коліту [87], псоріазу [88]. Але суттєвим недоліком цього лікарського засобу є його серйозні побічні ефекти, які були виявлені на третій фазі клінічних досліджень. Було зафіксовано зниження кількості лімфоцитів, підвищення рівня ліпідів, інсульт, тромбоемболію та навіть смерть пацієнтів [89].

Аброцитиніб - це селективний інгібітор для лікування атопічного дерматиту. Препарат проходить третю фазу клінічних досліджень і вже було повідомлено про його клінічну ефективність. Однак було виявлено ряд побічних ефектів, таких як діарея, головний біль, нудота, назофарингіт, інфекція верхніх дихальних шляхів та гематологічні аномалії [90].

Ітацитиніб – це ще один інгібітор, який є селективним до протеїнкінази JAK1. Ученими прогнозується його ефективність при лікуванні артриту, запальних захворювань кишечника та гострої реакції «трансплантат проти хазяїна». Препарат пройшов лише фазу доклінічних випробувань і потребує подальшого дослідження [91].

Підводячи підсумок, ми бачимо, що основна проблема інгібіторів протеїнкінази JAK1 – це суттєва подібність їх хімічних каркасів, низька селективність та висока токсичність. Унаслідок цього виникають численні побічні ефекти, що впливають майже на всі системи органів людини (дихальна, травна, імунна, кровоносна, лімфатична, опорно-рухова). Незважаючи на це, ефективність більшості цих ліків є доволі високою та вже були досягнуті певні успіхи у лікуванні деяких аутоімунних та запальних захворювань. Також варто зазначити перспективи використання інгібіторів янус-кіназ для лікування COVID-19 [92].

Пошук нових інгібіторів протеїнкінази JAK1 має включати в себе розробку нових хімічно різноманітних та селективних препаратів з використанням найсучасніших методів молекулярного моделювання, такі як машинне навчання, нейромережі на базі графів, тощо. Також метою для власне нашої роботи я бачу підвищення хімічної різноманітності структур інгібіторів. Пошук таких молекул варто починати з віртуального скринінгу аби виявити нові патерни будови лігандів.

## **1.2. Методи молекулярного моделювання**

### **1.2.1. Методи RIDE з APF та USRCAT**

Просторова структура хімічних об'єктів є фундаментальною молекулярною властивістю. Зважаючи на те, що компліментарність форм ліганду і сайту зв'язування рецептора є необхідною умовою для взаємодії малої молекули з білком. RIDE з APF та USRCAT відносяться до методів розпізнавання молекулярної форми, що дозволяють встановлювати подібність молекул між собою беручи до уваги просторову структуру сполук [93].

Метод RIDE з APF був розроблений в 2008 році компанією MolSoft [94]. Суть методу APF полягає у відображенні атомних властивостей у кожній точці простору. Поле атомних властивостей є концепцією, що опирається на ідею 3D-точкових фармакофорів, але представлення у вигляді дискретних точок замінюються на представлення у вигляді розподілу властивостей. Поле атомних властивостей формувалося виходячи із семи компонентів: донори водневих зв'язків, акцептори водневих зв'язків,  $sp^2$ -гібридизовані атоми, заряджені ділянки, ліпофільність, електронегативність/електропозитивність та розмір (Рисунок 1.8).

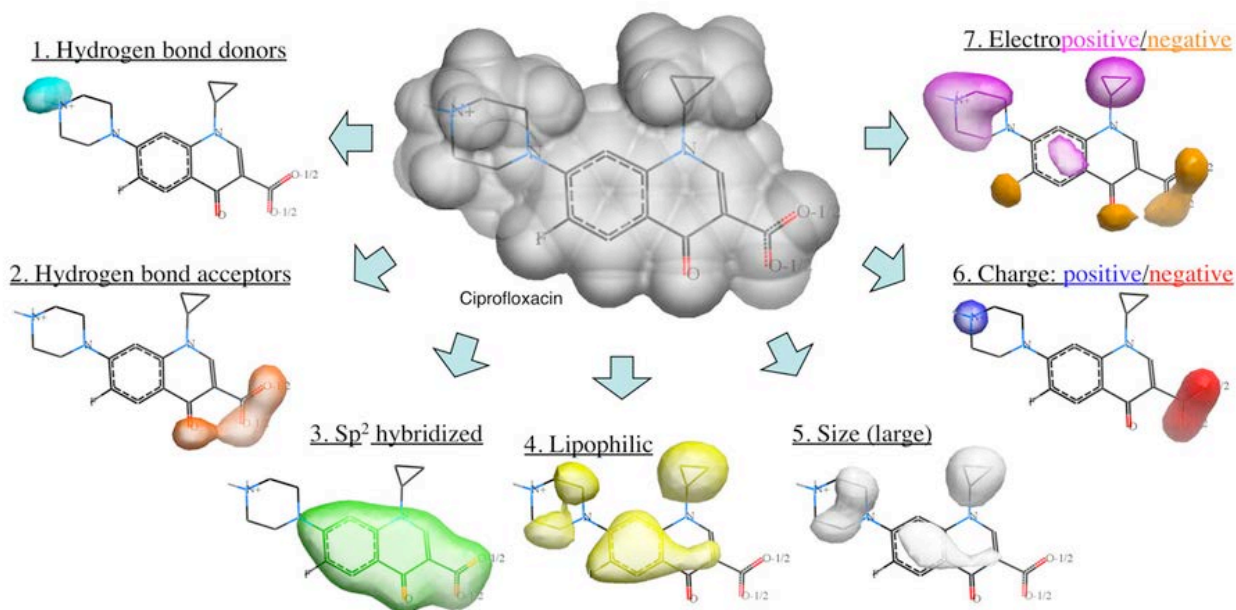


Рисунок 1.8. — Компоненти APF [95].

Алгоритм RIDE дозволяє аналізувати бібліотеку сполук та знаходити молекули, ізостеричні щодо запиту. Метод інтегрований у програмне забезпечення MolSoft ICM-Pro. Особливістю підходу RIDE з APF є можливість регулювання просторових фармакофорів.

У незалежному дослідженні 2008 року було показано, що метод APF є одним з найточніших підходів для аналізу лігандів під час процедури віртуального скринінгу у порівнянні з іншими академічними та комерційними ресурсами [94].

USRCAT (Ultrafast Shape Recognition with CREDO Atom Types) – це метод розпізнавання молекулярної форми на основі моментів USR, що був покращений шляхом використання CREDO атомних типів. CREDO – це база даних, де міститься інформація про міжатомні взаємодії між лігандами та макромолекулами з Protein Data Bank [96]. Включення цієї бази даних в алгоритм дозволяє аналізувати та знаходити молекули схожі до еталонних лігандів для певного типу рецепторів.

У підході USRCAT форма молекули описується через вектор геометричних дескрипторів, які кодуються на основі міжатомних відстаней. Встановлюючи додаткові розширення, можна збільшувати кількість

дескрипторів (наприклад, MACCS для додавання структурних властивостей [97], ElectroShape для кодування електростатики та ліпофільності [98,99], дескриптори оптичної ізомерії [100]). На відміну від методу USR, USRCAT враховує не лише просторову будову, але і додаткову фармакофорну інформацію [101].

### **1.2.2. Молекулярний докінг**

Молекулярний докінг – це рецепторно-орієнтований підхід комп'ютерного дизайну лікарських засобів. Метою даного методу є прогнозування тривимірної взаємодії малої молекули із сайтом зв'язування білка-рецептора. Початок застосування докінгового підходу припадає на 1980-ті роки. Швидкий розвиток комп'ютерних методів раціональної розробки ліків обумовлений зростанням обчислювальних потужностей та легкістю доступу до баз даних білкових структур та малих молекул.

Молекулярний докінг включає у себе три підходи: ліганд-білковий, білок-білковий та білок-нуклеїновий докінг. Найпоширенішим є ліганд-білковий докінг, хоча останнім часом також набуває популярність білок-білковий. Нині доступно багато програм, за допомогою яких можна провести різні типи докінгу, наприклад, FlexX [102], GOLD [103], AutoDock4 [104], Glide [105] та Molsoft ICM-Pro [106].

Поширеними є дві форми докінгу: гнучкий та жорсткий. Жорсткий докінг полягає у тому, що молекула рецептора і ліганду представляються як конформаційно жорсткі структури. Стикування відбувається методом перебору можливих тривимірних структур білка та інгібітора з пошуком найкращого збігу [107]. Головною перевагою даного методу є висока ефективність з погляду необхідних комп'ютерних потужностей, що дозволяє проводити скринінг великих бібліотек. Однак результати стикування можуть бути неточним через конформаційні зміни білка при зв'язуванні з лігандом. Гнучкий докінг розглядає молекулу білка як конформаційно гнучку та найкраще стикування знаходиться шляхом підгонки конформації білка та ліганду [108]. Суттєвою перевагою методу гнучкого стикування є

враховування динамічної природи молекул рецепторів та лігандів, що дозволяє підвищити точність результатів. Однак такий підхід потребує більше обчислювальних ресурсів та правильний підбір скорингових функцій.

У класичному алгоритмі молекулярного докінгу можна виділити наступні етапи (Рисунок 1.9):

- Вибір тривимірних структур лігандів та білка-рецептора.
- Підготовка структур лігандів та рецепторів відповідно до вимог програмного забезпечення.
- Стикування ліганду з білковою молекулою.
- Аналіз результатів та обчислення значень скорингової функції.

Успішність стикування зазвичай оцінюється за допомогою середньоквадратичного відхилення позицій атомів (RMSD).

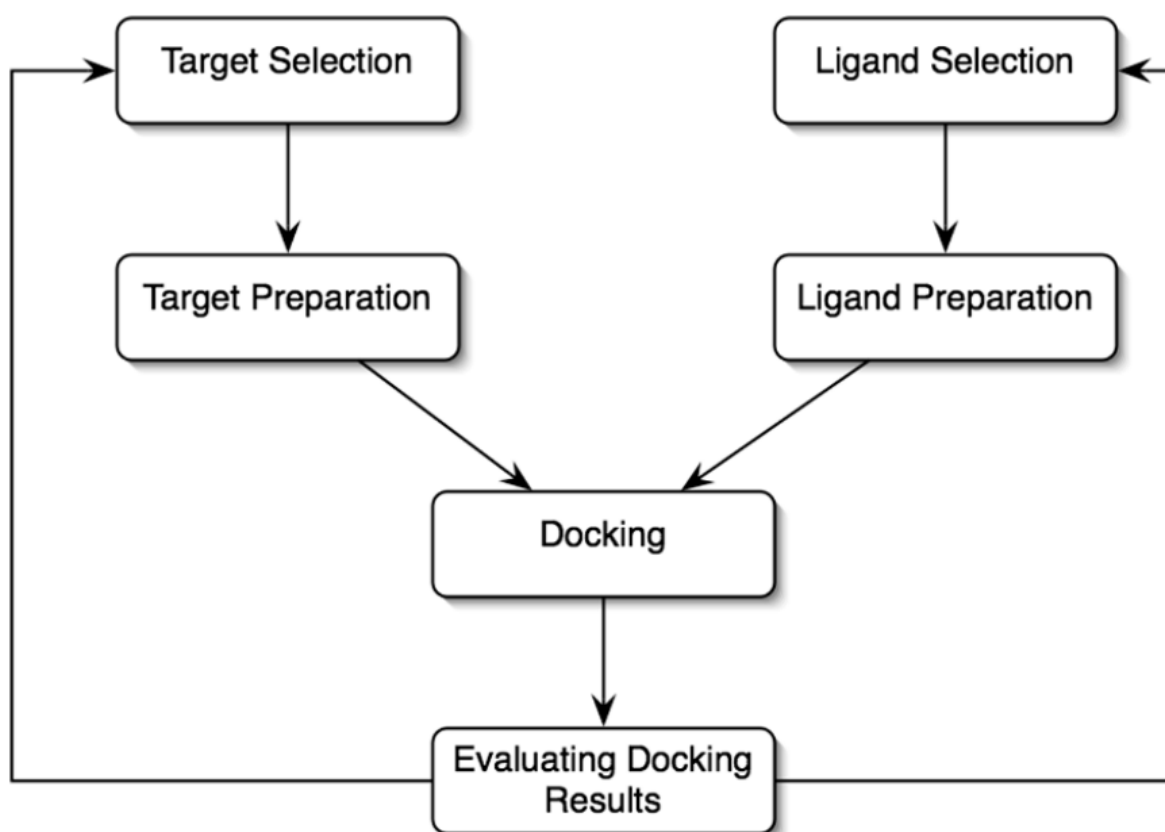


Рисунок 1.9. — Схема алгоритму класичного молекулярного докінгу [109].

### **1.2.3. Процедура молекулярного докінгу з використанням програмного пакету Molsoft ICM-Pro**

Molsoft ICM-Pro є набором інструментів для аналізу білкових структур, молекулярного моделювання та віртуального скринінгу [110]. Пакет надає прямий доступ до бібліотек білкових послідовностей, таких як Protein Data Bank, ChEMBL та інші. Програмне забезпечення дозволяє проводити аналіз та вирівнювання послідовностей, прогнозувати сайти зв'язування рецепторів, досліджувати та конструювати ліганди, обчислювати площі контакту, передбачати вплив мутацій, проводити докінг та PROTAC моделювання. Пакет включає у себе інструменти ICM-Bio, ICM-REBEL, ICM 3D та ICM Pocket Finder.

ICM-Pro надає чималий список функцій для ліганд-білкового та білок-білкового докінгу. Програма проводить гнучке стикування малих молекул ліганду з білком та надає доступ до внутрішніх методів, таких як багаторазове стикування рецепторів (4D-докінг).

У програмі ICM зв'язувальна кишеня описується за допомогою п'яти потенціалів: Ван-дер-ваальсовий потенціал для атома водню, Ван-дер-ваальсовий потенціал для важких атомів, електростатичний потенціал, гідрофобні взаємодії та потенціал, що відображає спрямованість водневих зв'язків.

ICM-Pro використовує метод Монте-Карло при формуванні конформаційної вибірки. Він полягає у тому, що спочатку програма генерує різні позиції ліганду за участі обертових, трансляційних та конформаційних змін. Потім відбувається перевірка отриманої конформації за енергетичними критеріями відбору. Перевагою підходу Монте-Карло над іншими методами є те, що цей алгоритм дозволяє молекулі долати енергетичні бар'єри на потенційній поверхні [111].

Скорингова функція ICM базується на різниці ентропій зв'язаного та незв'язаного станів ліганду, енергії внутрішнього силового поля, водневих зв'язках, різниці енергій сольватації, електростатичних зв'язках, гідрофобних

взаємодіях та десольватації [112]. Чим нижчий показник функції оцінки, тим вища вірогідність зв'язування ліганду з рецептором.

ICM Docking визнали одним з найкращих інструментів для стикування лігандів та білків ряд компаній та інститутів, серед них Astra Zeneca, Дослідницький інститут Скріппса та Wyeth. Їхня думка підкріплена рядом досліджень [106,113–117].

## Розділ 2. Дані та методи

### 2.1. Дані.

Бібліотека скринінгових сполук для проведення експерименту була надана компанією Єнамін (<https://enamine.net/>). Її розмір складав близько 3 мільйонів молекул. Отримані дані були оброблені за допомогою набору інструментів ChemAxon Chemical Structure Representation Toolkit (<https://chemaxon.com/chemical-structure-representation-toolkit>). Для стандартизації молекул із наданої бібліотеки було проведено наступні операції:

- Видалення ізотопів
- Видалення стереоізомерів
- Деароматизація
- Канонізація SMILES
- Видалення солей
- Нейтралізація атомів (окрім азоту)
- Генерація таутомерів

### 2.2. Методи розпізнавання молекулярної форми RIDE та USRCAT.

Для пошуку молекул, які можуть зв'язуватися у рецепторній кишені протеїнкінази JAK1, були використані методи, що базуються на розпізнаванні тривимірної форми молекул. Це дозволяє зосередитися на дослідженні просторових особливостей сполук, які тісно пов'язані із фармакологічною активністю та афінністю до білків. Такий прийом забезпечує впевненість у тому, що вибрані молекули можуть зв'язуватися з рецептором та діяти як інгібітори.

Одним із таких методів є підхід на основі атомних полів властивостей – APF RIDE (Atomic Property Field Rapid Isostere Discovery Engine), що був розроблений компанією MolSoft [94,118]. За допомогою цього інструменту здійснювався пошук складних конформерів, що мали подібні розподіли атомних властивостей та схожі просторові структури, тобто були

ізостеричними до запиту. Для створення досліджуваної вибірки ми обмежили значення подібності до 0.3.

Іншим методом, що був використаний у дослідженні, є підхід USRCAT (Ultrafast Shape Recognition with CREDO Atom Types) [101,119]. Його перевагою є швидкість при обробці великих баз молекул, за рахунок відсутності процесу вирівнювання, що і стало одним із вирішальних факторів при виборі інструменту. Метод був реалізований за допомогою мови програмування Python (<https://www.python.org/>) та бібліотеки функцій RDKit (<https://www.rdkit.org/>). При відборі кандидатів для подальшого молекулярного докінгу ми обмежили показник USRCAT значенням 0,3 аби відсіяти неактивні сполуки.

У результаті аналізу отриманих показників було сформовано бібліотеку з 1231 потенційних лігандів для протеїнкінази JAK1. Така кількість забезпечує достатню різноманітність скафолдів та дозволяє проводити подальші комп'ютерні розрахунки за наявних обчислювальних потужностей.

### **2.3. Молекулярний докінг.**

Із Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) було взято дві кристалічні структури рецептора: комплекс JAK1 протеїнкіназного домену з N-[3-(2-метокси-5-хлор-феніл)-1-метил-1H-піразол-4-іл]-2-метил-2H-піразоло[4,3-с]піридин-7-карбоксамідом і гліцерином (PDB ID 6N7A [120]; роздільна здатність 1,33 Å) та комплекс JAK1 протеїнкіназного домену з N-[5-(3-метоксинафтален-2-іл)-1H-піразол-4-іл]піразоло[1,5-а]піримідин-3-карбоксамідом і гліцерином (PDB ID 6N7C [120]; роздільна здатність 1,69 Å). Їх просторові структури є загальнодоступною інформацією.

Файли було експортовано до програмного середовища Molsoft ICM-Pro 3.9-2 (<https://www.molsoft.com>) та перетворено на об'єкт ICM. Із вище зазначених білкових комплексів було видалено молекули гліцерину та води, а також проведено додаткову оптимізацію атомів водню та деяких амінокислотних залишків (таких як, гістидин, пролін, аспаргін, глутамін та

цистеїн). Наступним кроком молекули рецептора та ліганду були розділені на окремі об'єкти ICM. Координати атомів ліганду були видалені із 3D-представлення білка.

Кристалічні структури рецептора 6N7A та 6N7C були накладені за допомогою внутрішнього ітераційного алгоритму накладення, що наявний у програмному пакеті Molsoft ICM-Pro. Як шаблон для накладання було обрано структуру із найкращою роздільною здатністю згідно з даними бази Protein Data Bank. Далі із використанням інструментів пакету програмного забезпечення Molsoft ICM-Pro 3.9-2 було створено стек із вищезгаданих конформерів.

Набір малих молекул для докінгу містив 1231 фрагмент. Молекули лігандів пройшли обробку та були підготовлені для подальшого процесу молекулярного докінгу за допомогою інструментів програми Molsoft ICM-Pro 3.9-2.

Параметри, за якими проводився відбір та обробка списку лігандів для молекулярного докінгу, описані в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1. — Значення параметрів при відборі та обробці лігандів для докінгу за допомогою програми Molsoft ICM-Pro 3.9-2.

Параметр	Опис параметра	Значення
i_maxHdonors	Максимальна кількість донорів водневих зв'язків, яку може мати ліганд аби брати участь у подальшій стиковці.	5
i_maxLigSize	Максимально допустимий розмір ліганду. Розраховується як $15 \cdot (\text{кількість важких атомів у молекулі})$	500
i_minLigSize	Мінімальний розмір ліганду.	100
i_maxNO	Максимальна кількість акцепторів чи донорів водневого зв'язку (атоми Нітрогену чи Оксигену).	10

i_maxTorsion	Максимальна кількість гнучких торсіонів.	10
i_ringFlexLevel	Режим, що визначає гнучкість ароматичних кілець. Може приймати значення: 1 – гнучкість кільця враховується лише на етапі попередньої вибірки, 2 – гнучкість кільця враховується протягом усієї симуляції.	2
l_buildHydrogens	Додавання воднів до ліганду.	yes
l_internalHB	Врахування внутрішньо молекулярних водневих зв'язків у ліганді.	yes
r_maxLogP	Максимальне можливе значення logP ліганду.	5
r_minLogP	Мінімальне можливе значення logP ліганду.	0
r_pH	Показник рН, що використовується при прогнозуванні logP.	7

Наступним кроком стало визначення сайту зв'язування протеїнкінази шляхом обмеження місця навколо наявного ліганду (похідного карбоксаміду) на відстань 5Å у будь-якому напрямку. Мапа рецептора була сформована для всіх обраних конформацій білка, вона була багатовимірною та окрім трьох декартових координат, містила ще четверту – індекс конформації.

Для стикування був обраний метод 4D молекулярного докінгу, аби точніше симулювати гнучкість зв'язувальної кишені рецептора за рахунок використання ансамблю конформерів. Такий підхід дозволяє успішно стикувати якомога більше різноманітних лігандів, що збільшує хімічне розмаїття інгібіторів. Суть методу 4D-докінгу полягає у здатності проводити стикування із усіма конформаціями зі стеку за одну ітерацію. Досягти таке можна завдяки створенню специфічної мапи рецепторів - 4D-сітки. У порівнянні зі звичайним гнучким докінгом, який проводить незалежні стикування для кожної окремої структури, 4D-докінг значно заощаджує час та обчислювальні ресурси, працюючи одразу із ансамблем конформерів [121].

Значення параметрів, за якими проводився молекулярний докінг у даній роботі, зазначені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2. — Значення змінних при проведенні процедури 4D молекулярного докінгу, які зазначені у файлі параметрів програми Molsoft ICM-Pro 3.9-2.

Параметр	Опис параметра	Значення
r_dockScanVersion	Версія докінгового протоколу	4.6
r_boxDim	Розмір поля, що використовується для визначення регіону зв'язування для подальшого створення карт рецептора.	-4.557 -36.001 9.24878 17.636 -5.87571 35.2771
i_mnconf	Максимальна кількість конформацій у конформаційному стеку.	50
i_dbSize	Кількість молекул лігандів, що бере участь у молекулярному докінгу.	1231
r_ligInitPosition	Координати, що визначають початкову позицію ліганду при молекулярному докінгу.	4.45062 -23.3022 21.8373 1 0 0 0 1 0
i_mnhighEnergy	Максимальна кількість пробних конформацій, що мають енергії вище за енергію конформаційного стеку. Не	9999

	змінює конформаційний стек.	
i_mnreject	Максимальна кількість послідовних відхилень пробних конформацій.	10
r_GRID_maxVw	Обмеження енергії відштовхування Ван дер ваальса.	4 ккал/моль
r_mcStep	Розмір кроку в алгоритмі Монте-Карло.	180°
r_mfScoreThreshold	Порогове значення потенціалу середньої сили.	999

Процедура стикування лігандів та рецептора була проведена за допомогою інструмента MolSoft Biased Probability Monte Carlo (алгоритм зміщеної ймовірності Монте-Карло), що призначений для генерування конформерів. Цей метод полягає у випадковому виборі підпростору та послідовному «крокуванню» до іншої позиції при врахуванні ймовірності розподілу. Кожен крок супроводжується процедурою локальної мінімізації торсійного кута. Разом із процесом мінімізації відбувається перемикання ліганду на наступну конформацію рецептора у стеку. Найкращі структури стикування із лігандом були збережені у хітлісті результатів разом із прогнозованими показниками зв'язування.

Для аналізу та оцінки комплексів ліганду із рецептором використовувалась емпірична вбудована скорингова функція ICM-VLS. Вона поєднує у собі електростатичні параметри, Ван дер ваальсову енергію, значення втрати конформаційної ентропії, інформацію про водневий зв'язок та зміну енергії сольватації [122]. Ця функція дозволяє ранжувати отримані результати докінгу за обчисленим показником стикування.

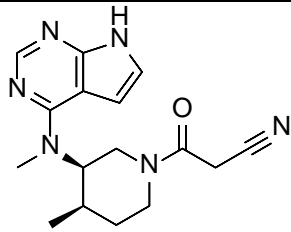
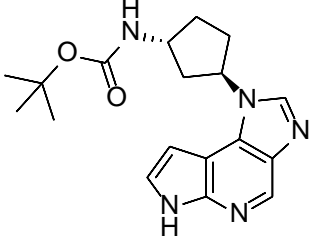
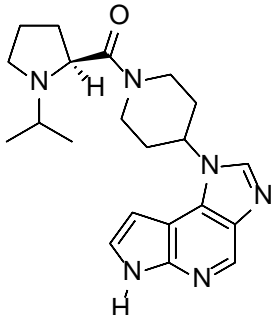
Візуальний аналіз результатів стикування рецептора з лігандами проводився за допомогою інструментів та програмних пакетів Molsoft ICM-Pro 3.9-2, PyMOL (<https://pymol.org/2/>) та Discovery Studio Visualizer 4.5 (<https://discover.3ds.com>).

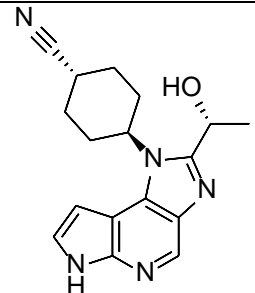
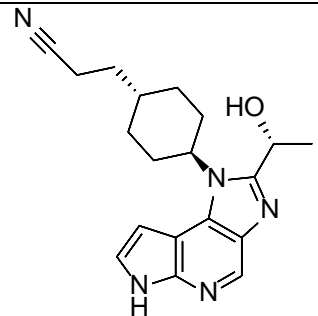
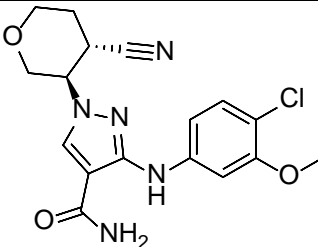
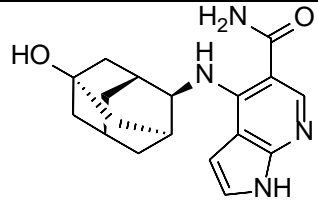
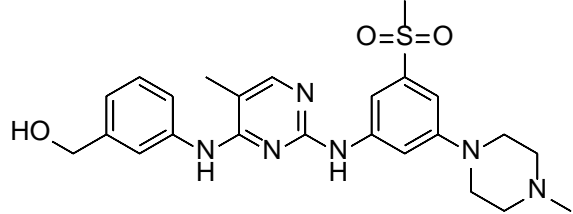
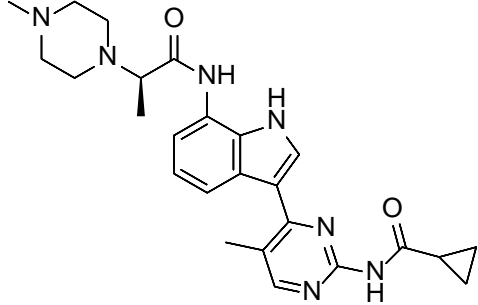
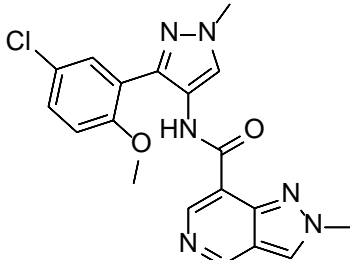
## Розділ 3. Аналіз результатів

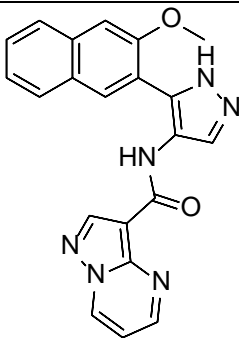
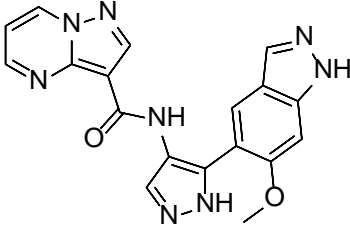
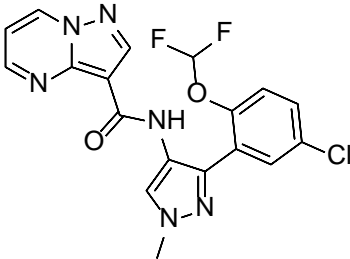
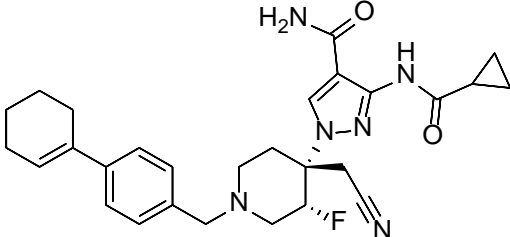
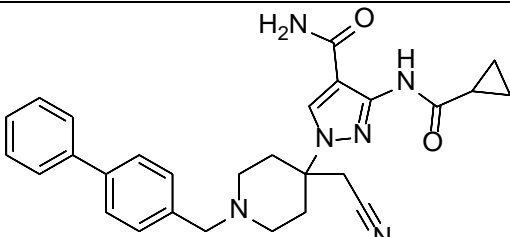
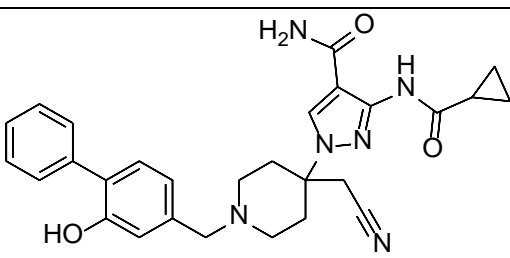
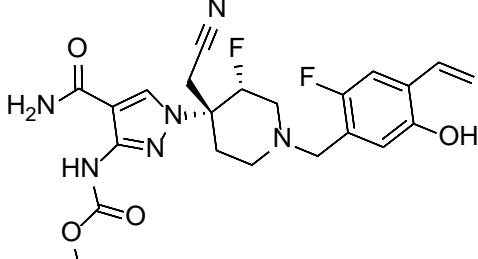
### 3.1. Молекулярне моделювання

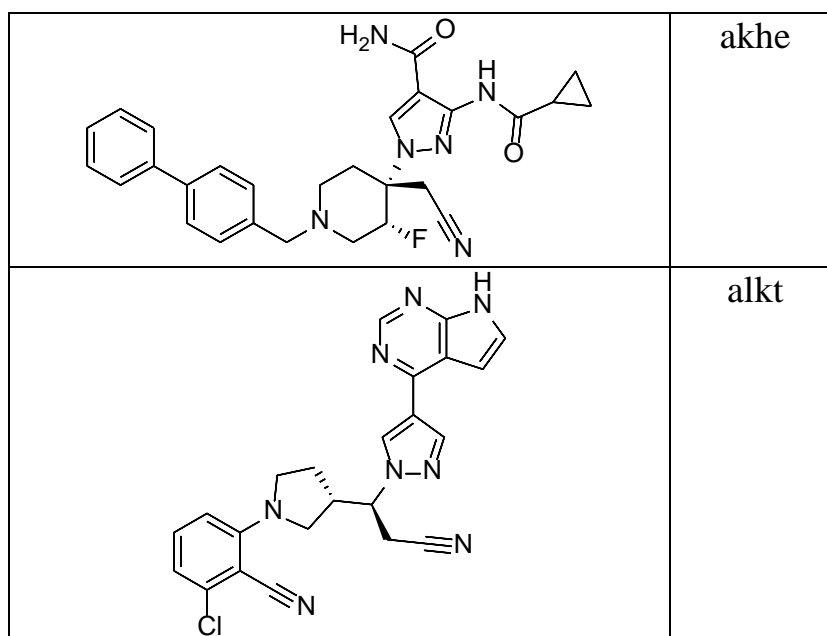
При формуванні бібліотеки лігандів ми використовували два методи розпізнавання молекулярної форми. До колекції скринінгових молекул компанії Enamine Ltd. по черзі застосували методи 3D-розпізнавання USRCAT та APF RIDE. У якості шаблонних молекул для порівняння були використані активні ліганди протеїнкінази JAK1 (Таблиця 3.1). У результаті ми відібрали сполуки, що вірогідно можуть бути інгібіторами цільової протеїнкінази. Застосовуючи алгоритм USRCAT було обрано 487 лігандів, чий значення подібності були у межах 0,34 - 0,64. Метод APF RIDE дозволив виділити ще 744 молекули. Отриману вибірку з 1231 сполук ми використали у подальшому 4D-молекулярному докінгу.

Таблиця 3.1 — Сполуки, що були використані як шаблон під час аналізу методами APF RIDE та USRCAT.

Молекула	PDB_ID ліганду
	ami1
	a0nl
	a0nt

	a1j5
	a15t
	ab7v
	a9t6
	abfk
	aeyq
	akev

	akf1
	akf4
	akep
	akgz
	akh5
	akh8
	akhh



Молекулярний докінг було проведено за допомогою програмного забезпечення Molsoft ICM-Pro 3.9-2. Мішенню дослідження стала протеїнкіназа JAK1, структури якої були взяті з Protein Data Bank (PDB ідентифікатор: 6N7A та 6N7C). Початкова позиція ліганду мала координати: [4.45062, -23.3022, 21.8373]. Процедура стикування лігандів та рецептора була проведена за допомогою алгоритму зміщеної ймовірності Монте-Карло.

Процес побудови моделі детально описано у розділі 2. Розроблену модель для докінгу було валідовано на наборі сполук з відомою активністю щодо протеїнкінази JAK1 та деякими у співвідношенні 1:100 (40:3999). Декої були згенеровані сайтом <https://dude.docking.org/>. Для оцінки ефективності моделі було побудовано ROC криву (Рисунок 3.1) та обраховано показник AUC, який становив 98.4, що є гарним результатом. Можна зробити висновок, що розроблена нами модель для докінгу в ансамбль структур протеїнкінази JAK1 здатна досить точно відрізнити активні ліганди від неактивних.

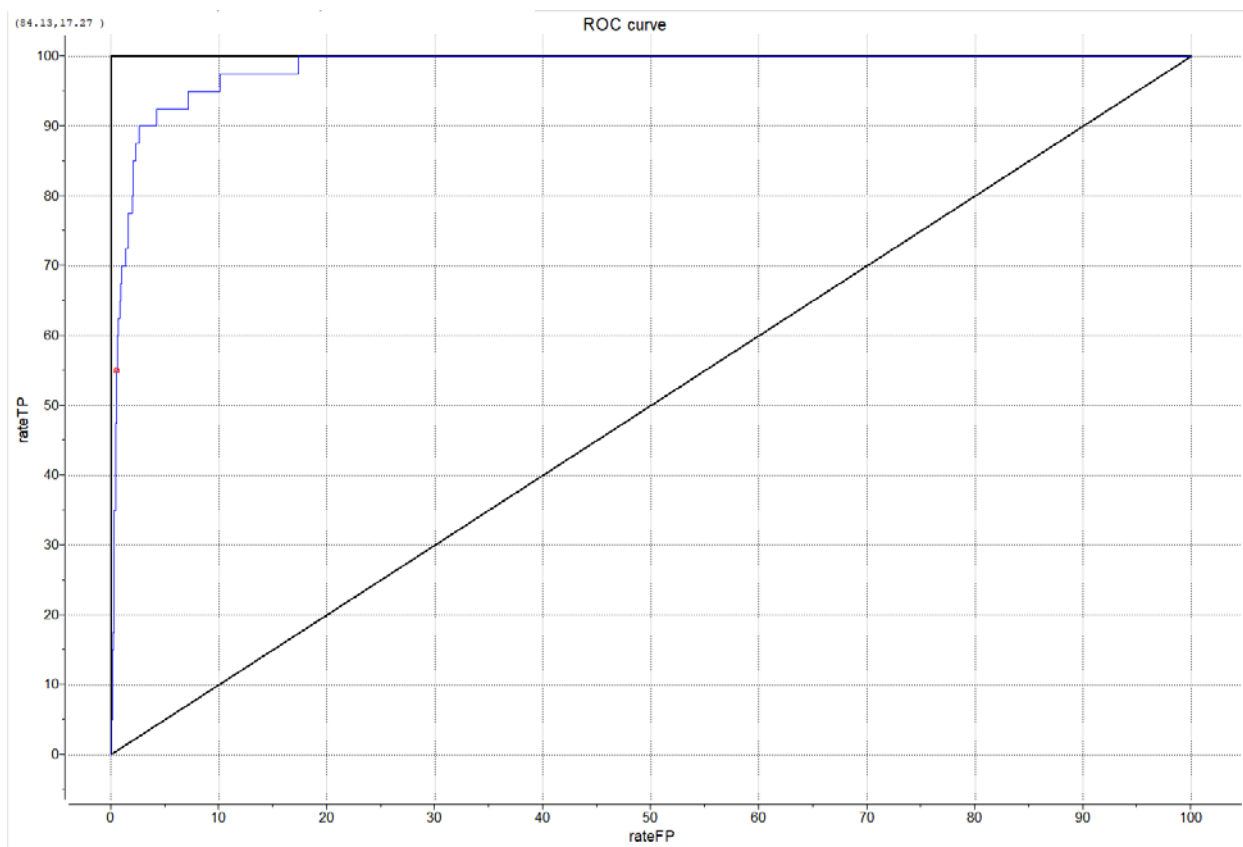


Рисунок 3.1. — ROC крива для розробленої у даній роботі моделі докінгу.

Відбір лігандів здійснювався шляхом аналізу розрахованих значень скорингових функцій та візуалізації взаємодій сполуки із АТФ-зв'язувальним сайтом протеїнкінази JAK1. Графік розподілу молекул за ICM VLS Score, та основними фізично-хімічними параметрами зображено на Рисунку 3.2А-Е. Значення оціночної функції було обмежено, аби відсіяти сполуки, що не мають взаємодій із білком. Далі ми аналізували лише молекули зі ICM VLS Score меншим за -25.

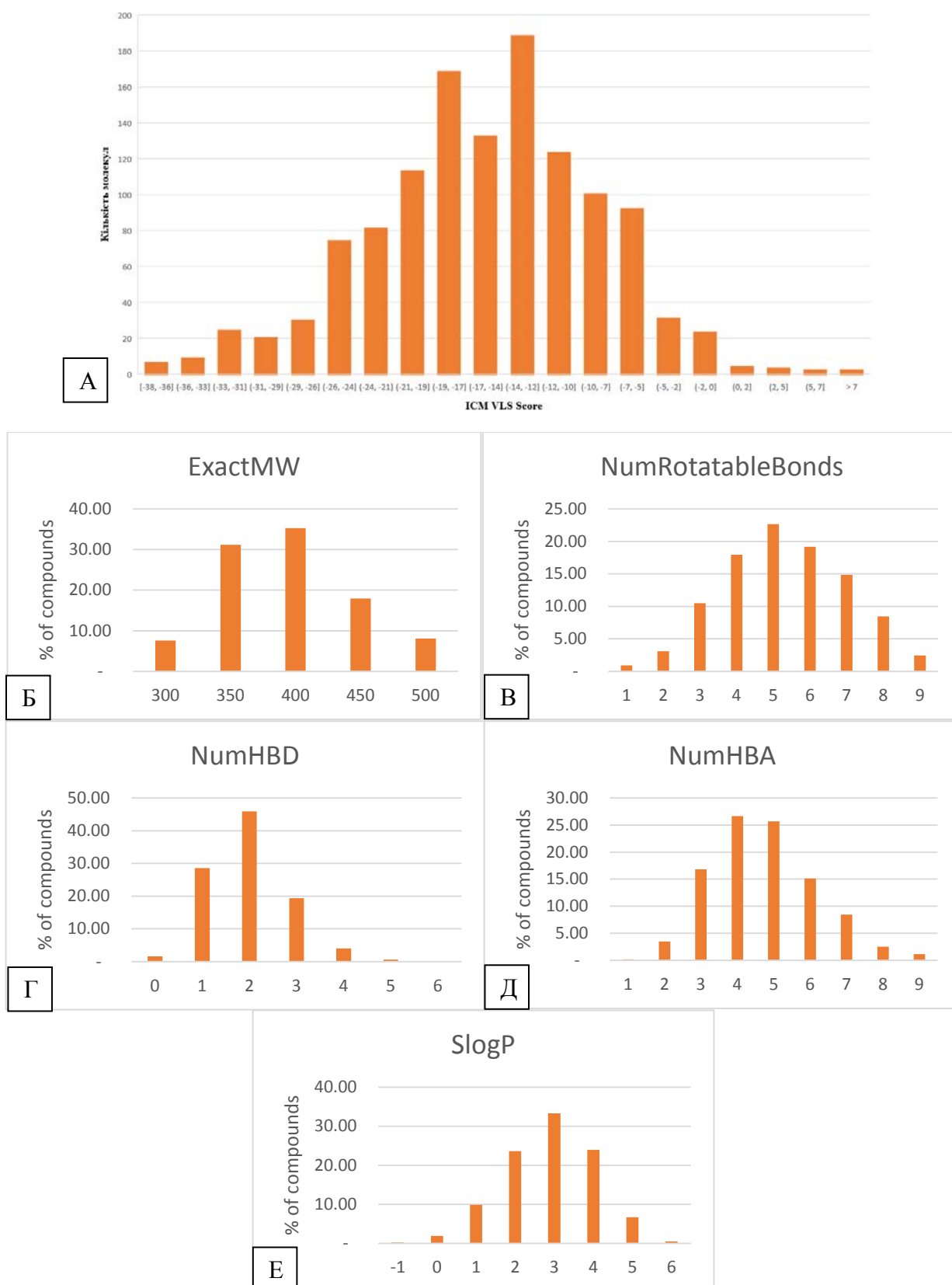


Рисунок 3.2. —Графіки розподілу докованих молекул за значеннями скорингової функції ICM VLS Score та основними фізико-хімічними параметрами (А - ICM VLS Score; Б – молярна маса; В – кількість зв'язків,

що здатні обернутися; Г – кількість атомів донорів водневого зв'язку; Д - кількість атомів акцепторів водневого зв'язку; Е – ліпофільність)

При розгляді результатів стикування молекули та білка ми опиралися на фармакофорну модель Тракслера, що описує традиційні властивості та взаємодії АТФ-конкурентних інгібіторів [123]. (Рисунок 3.3)

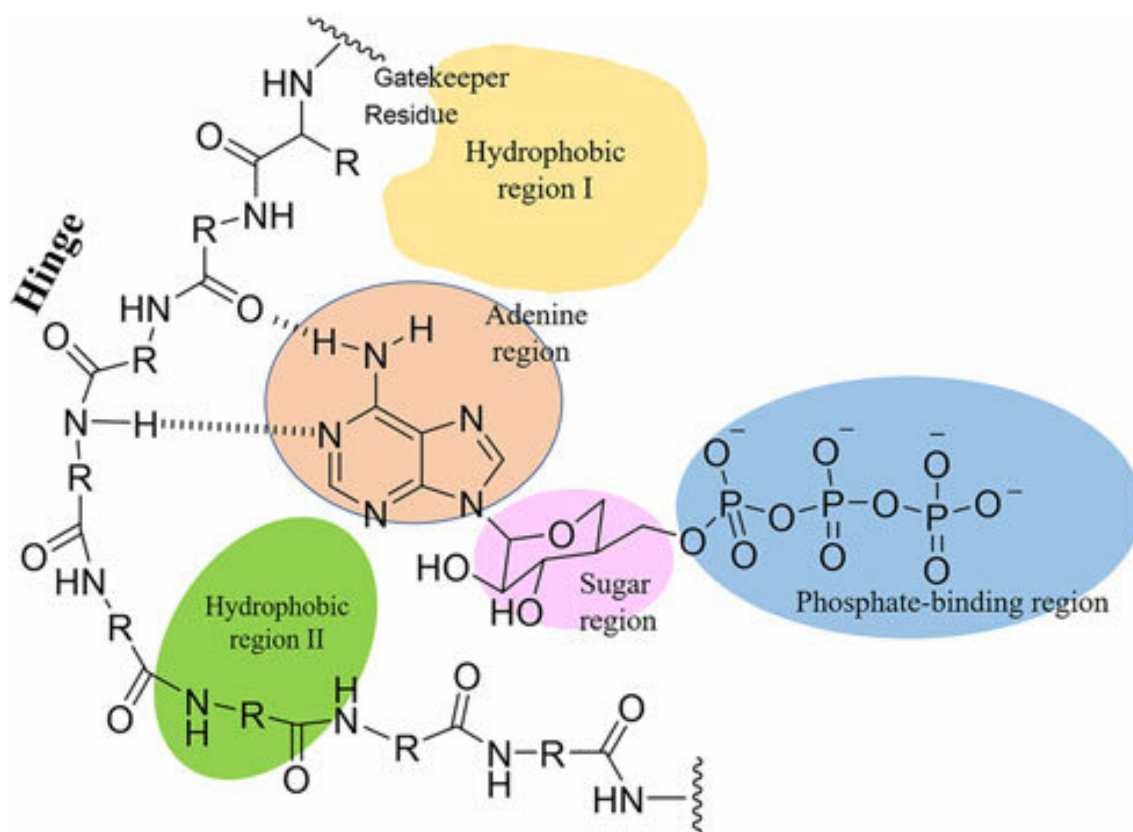


Рисунок 3.3. — Фармакофорна модель Тракслера для інгібітора, що взаємодіє із АТФ-зв'язувальним сайтом [124].

Згідно з описаною моделлю, АТФ-зв'язувальний сайт містить гідрофобну «аденінову кишеню», де за рахунок водневих зв'язків може відбуватися зв'язування із ароматичною системою ліганду, такою як хіназолін, індол, пурин, піримідин, тощо. Більшість докінгованих нами сполук відповідали цьому опису і мали такий фрагмент, що зв'язувався із залишками Phe958, Leu959 або Pro960. Окрім цього активний центр протеїнкінази містить ще дві гідрофобні області, одна з них розміщується у задній частині білка і може використовуватися для зв'язування з гідрофобними замісниками, інша ділянка часто зайнята молекулами

розчинника, але також може бути націлена на полярні чи неполярні гідрофобні групи. Сполуки KL015, KL021 утворили водневі зв'язки з Lys908 у першій гідрофобній області. Також ми відслідковували ще й інші взаємодії, наприклад зв'язки гідрофобних замісників з «рибозною кишенею», а також розміщення гідрофільних фрагментів у щілині для зв'язування фосфату АТФ. Останні присутні у сполуках KL005, KL013, KL019, KL020, KL023 та KL030, які утворюють водневі зв'язки з Arg1007. Молекули KL001, KL004 та KL006 мають взаємодії із Ser963, а KL019, KL020 та KL021 – із Gly887. Розміщення лігандів KL007, KL024, KL033 та KL034 у рецепторній кишені протеїнкінази JAK1 та ключові амінокислотні залишки, що беруть участь у взаємодіях, зображені на Рисунок 3.4.А-Г

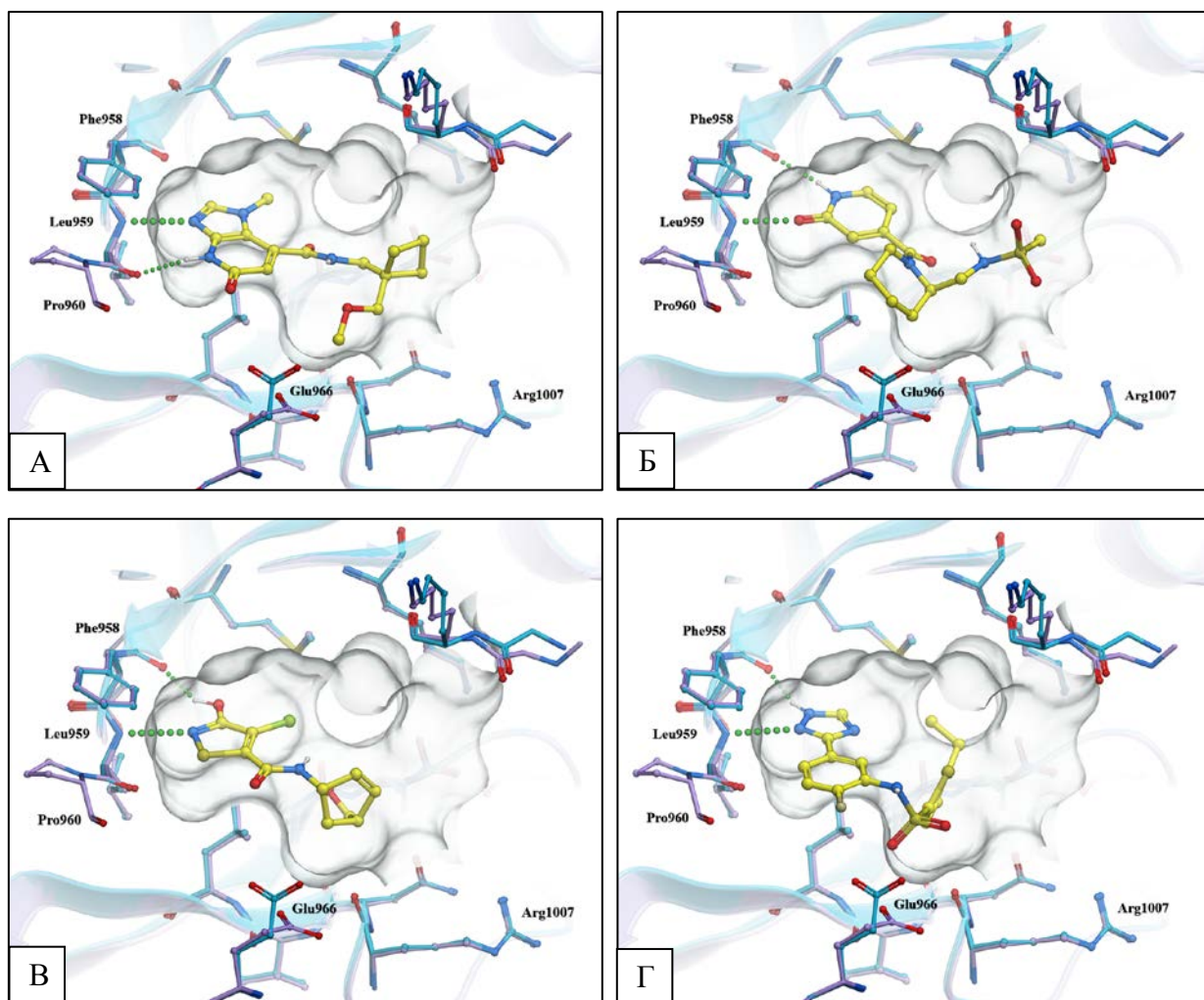


Рисунок 3.4. — Візуалізація розміщення лігандів у сайті зв'язування протеїнкінази JAK1 (PDB ідентифікатор: 6N7A (фіолетовим) та 6N7C

(блакитним) ). А – сполука KL007; Б – сполука KL024; В – сполука KL033; Г – сполука KL034. Зеленим кольором помічені водневі зв'язки, які утворюються між малою молекулою та протеїнкіназою. Зображення створені за допомогою програми Molsoft ICM-Pro 3.9-2.

Після детального розгляду та аналізу результатів проведеного 4D молекулярного докінгу було обрано 35 сполук для подальшого біохімічного тестування. (Таблиця 3.2)

Таблиця 3.2. — Характеристики та значення скорингових функцій 35 молекул, обраних для подальших біохімічних досліджень. (ICM VLS Score – значення скорингової функції ICM VLS Score; Hbond – це енергія водневого зв'язку; Hphob –гідрофобна енергія; VwInt — енергія взаємодії Ван-дер-Ваальса; Eintl — внутрішня енергія конформації ліганду; mfScore — потенціал середньої оцінки сили; RTCNNscore - оцінка нейронної мережі)

<b>ID</b>	<b>ICM VLS Score</b>	<b>Hbond</b>	<b>Hphob</b>	<b>VwInt</b>	<b>Eintl</b>	<b>mfScore</b>	<b>RTCNN score</b>
<b><i>KL001</i></b>	-38,1	-9,717	-6,146	-26,4	2,512	-95,2046	-34,0334
<b><i>KL002</i></b>	-30,2	-5,985	-6,16	-31,6	3,554	-100,818	-25,3269
<b><i>KL003</i></b>	-33	-8,269	-7,74	-35,2	4,179	-92,7334	-40,7867
<b><i>KL004</i></b>	-33	-9,363	-5,13	-23,1	1,576	-68,5189	-29,3173
<b><i>KL005</i></b>	-25,3	-7,303	-7,775	-26,8	9,101	-130,551	-27,6197
<b><i>KL006</i></b>	-37	-10,09	-5,619	-26,2	2,894	-96,4425	-30,8998
<b><i>KL007</i></b>	-29,4	-6,958	-6,289	-28,4	2,788	-82,8654	-27,6334
<b><i>KL008</i></b>	-34,4	-7,225	-7,432	-28	0	-75,5241	-28,3036
<b><i>KL009</i></b>	-25,5	-7,919	-6,634	-24,7	3,046	-91,0087	-25,3399
<b><i>KL010</i></b>	-28,4	-7,267	-6,604	-30	2,331	-53,0469	-21,9999
<b><i>KL011</i></b>	-26,8	-9,626	-6,826	-33,7	12,88	-89,4248	-27,2897
<b><i>KL012</i></b>	-25,4	-5,023	-5,921	-29,6	2,838	-102,268	-36,1406
<b><i>KL013</i></b>	-26,3	-7,631	-6,737	-28,2	6,128	-84,4202	-28,5288
<b><i>KL014</i></b>	-28,6	-6,352	-6,17	-29	2,198	-112,263	-22,2919

<b>KL015</b>	-32,7	-6,268	-8,06	-34,8	4,166	-76,2653	-33,9796
<b>KL016</b>	-29,5	-6,288	-6,202	-25,8	3,414	-66,8658	-24,8315
<b>KL017</b>	-26,7	-5,767	-7,853	-27,9	1,55	-79,2388	-28,6351
<b>KL018</b>	-27,1	-3,019	-7,594	-35,1	3,31	-132,132	-29,8604
<b>KL019</b>	-33,8	-10,68	-7,33	-31,1	3,794	-88,3198	-27,5274
<b>KL020</b>	-33,7	-6,419	-6,491	-30,9	1,653	-123,313	-31,8561
<b>KL021</b>	-25,9	-6,909	-6,177	-29,4	5,676	-116,442	-26,4467
<b>KL022</b>	-28,6	-7,889	-5,634	-29,1	1,529	-61,3849	-24,3574
<b>KL023</b>	-27,5	-6,677	-6,242	-25,3	4,45	-113,568	-26,7946
<b>KL024</b>	-28,1	-5,543	-5,276	-26,9	6,324	-54,5016	-17,5228
<b>KL025</b>	-26,5	-4,789	-6,258	-38,2	5,407	-114,174	-32,9302
<b>KL026</b>	-30,1	-7,162	-7,073	-35,2	2,838	-64,9789	-25,3641
<b>KL027</b>	-30,9	-5,278	-6,569	-30,1	3,115	-80,9884	-26,9071
<b>KL028</b>	-29,5	-6,447	-5,552	-26,4	1,773	-63,0047	-23,7974
<b>KL029</b>	-30	-7,395	-6,879	-29,3	4,479	-72,8643	-29,9735
<b>KL030</b>	-27,1	-7,559	-5,19	-30,2	9,973	-83,1078	-24,7507
<b>KL031</b>	-25,1	-4,568	-8,162	-29,6	1,931	-104,574	-22,9559
<b>KL032</b>	-29,5	-5,406	-4,696	-25,8	0,855	-49,6331	-20,5963
<b>KL033</b>	-26,3	-5,966	-4,287	-24,8	0,353	-74,7438	-26,2246
<b>KL034</b>	-30,8	-5,384	-6,025	-27,2	2,057	-96,2596	-32,7042
<b>KL035</b>	-29,5	-6,631	-6,81	-33,6	5,684	-69,6185	-28,8821

### 3.2. Біохімічне тестування *in vitro*

Наступним етапом нашого дослідження стало вимірювання інгібувальної активності ( $IC_{50}$ ) для вибраних у результаті молекулярного докінгу 35 сполук. Біохімічний експеримент був виконаний спеціалістами компанії Bienta (<https://bienta.net/>). Спочатку був проведений попередній скринінг при концентрації інгібітора 20 мкМ.

Умови проведення скринінгу були наступні:

- Буфер: 40 мМ Tris-HCl (7.5), 20мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мг/мл BSA, 50 мкМ DTT.
- JAK1: 27.8 нМ.  
IRS-1: 110 мкМ (0.2 мкг/мкл).
- АТФ: 47 мкМ.
- 1% DMSO
- Референсна сполука (Барицитиніб): 2.6 нМ
- Концентрація інгібітору (35 сполук) 20 мкМ
- Реакційний об'єм: 5 мкл (2.5 мкл JAK1 + 2.5 мкл суміш субстратів)
- Інкубація зі сполуками: 15 хв при 25°C
- Інкубація протеїнкіназної реакції: 60 хв при 25°C
- Інкубація з ADP-Glo: 40 хв при 25° C
- Інкубація з детектувальним реагентом: 30 хв при 25°C

Дослідження проводилися за використанням зчитувача BMG PHERAstar FSX та плати Greiner Bio-One # 784075.

Активність протеїнкінази JAK1 із 35 інгібіторами представлена на Рисунку 3.5. Проаналізувавши отримані дані, ми відібрали хіти, що зменшували активність протеїнкінази понад 30%. Ними стали молекули KL001 та KL003.

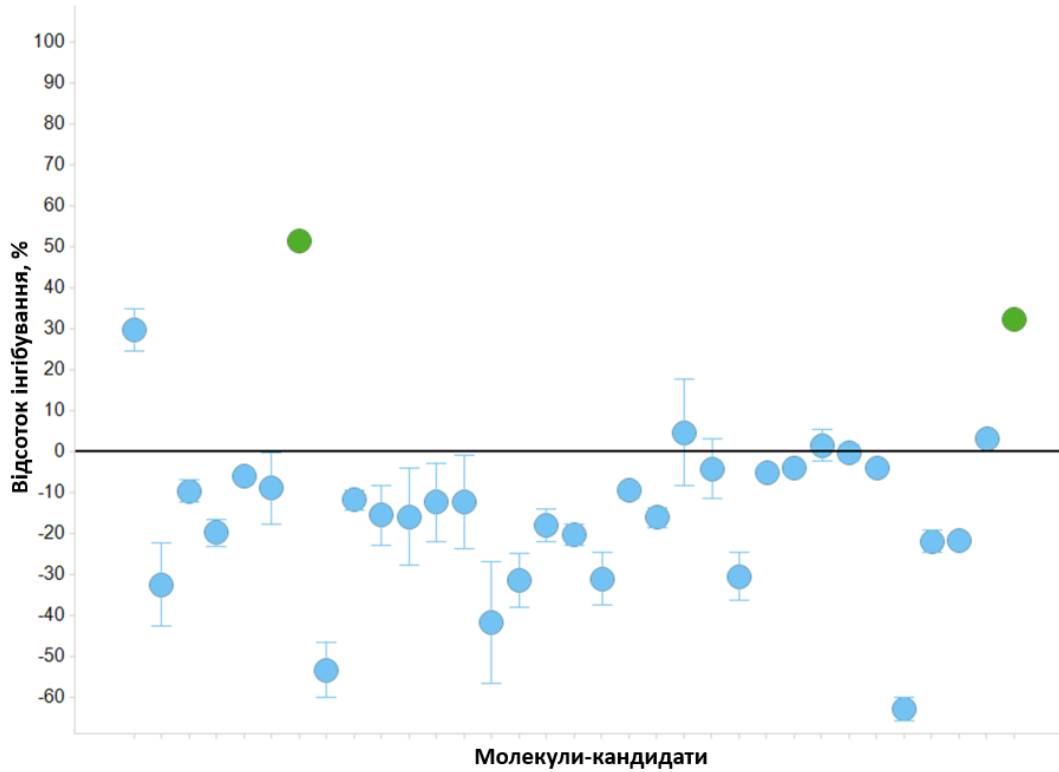


Рисунок 3.5.— Активність протеїнкінази JAK1 при взаємодії із вибіркою докованих молекул інгібіторів. Зеленим помічені сполуки, які інгібували протеїнкіназу понад 30%.

Для двох обраних сполук були виміряні значення  $IC_{50}$  при взаємодії із протеїнкіназами JAK1 і JAK2 та були побудовані графіки «доза-ефект». Із графіків, що представлені на Рисунку 3.6А-Б, видно, що обидві сполуки проявили інгібувальні властивості щодо протеїнкіназ JAK1 та JAK2.

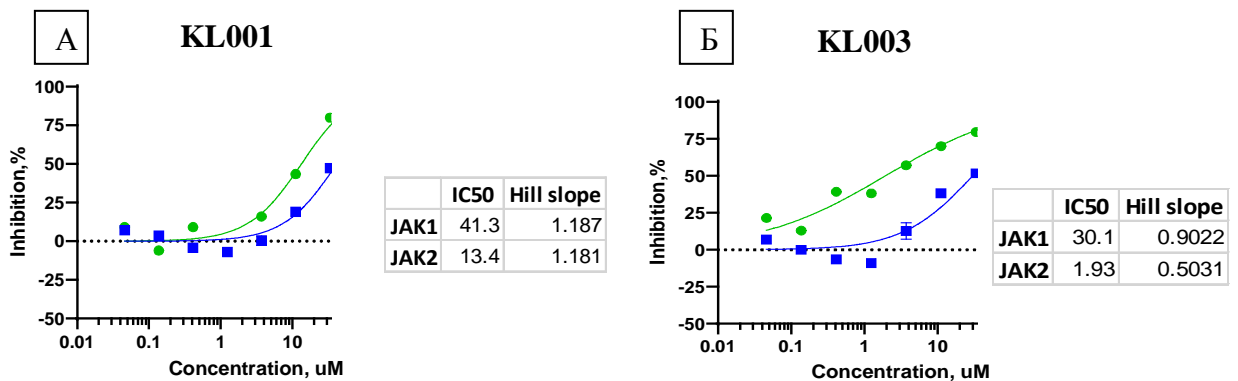


Рисунок 3.6. — Графіки «доза-ефект» інгібіторів по відношенню до протеїнкіназ JAK1 і JAK2. А – інгібітор KL001 та Б – інгібітор KL003.

Знайдені сполуки не виявили селективності до протеїнкінази JAK1, що пов'язано із сильною подібністю сайтів зв'язування JAK1 та JAK2 (Рисунок 3.7). Відмінності між структурами двох протеїнкіназ полягають у наступному:

- наявність Tyr961 у JAK2 на місці Ser961 у JAK1
- наявність Tyr958 у JAK2 на місці Phe958 у JAK1
- наявність Asp966 у JAK2 на місці Glu966 у JAK1
- наявність Glu854 у JAK2 на місці Asp880 у JAK1
- наявність Glu853 у JAK2 на місці Arg879 у JAK1

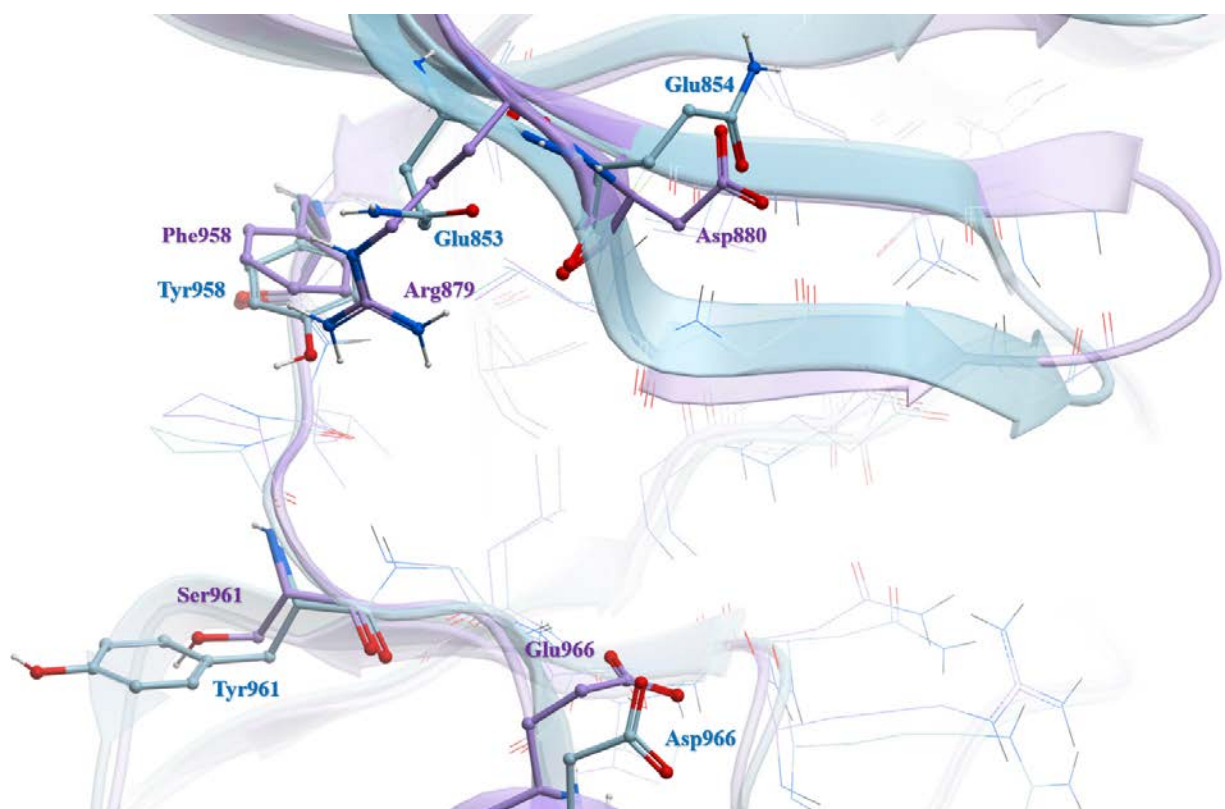


Рисунок 3.7. — Порівняння будови сайтів зв'язування протеїнкіназ JAK1 (PDB\_ID 6N7A) та JAK2 (PDB\_ID 8BPV). А — порівняння просторової будови (фіолетовим – 6N7A, блакитним - 8BPV).

Аналізуючи ці відмінності ми дійшли висновку, що структура АТФ зв'язувальної кишені дуже схожа, можна навіть сказати ідентична, тому молекулярний докінг є не найкращим методом для знаходження селективних інгібіторів протеїнкінази JAK1 чи JAK2.

Оцінюючи отримані результати, ми отримали ефективність проведеного нами молекулярного докінгу 6% (із 35 сполук було знайдено 2 інгібітора).

## ВИСНОВКИ

Було проведено ретельний аналіз відомих інгібіторів тирозин-специфічної протеїнкінази JAK1, виділено основні класи та проведений ліганд орієнтований віртуальний скринінг, на основі аналізу 3D поверхні а форми відомих сполук колекції низькомолекулярних сполук НВП Єнамін та виділено 1231 сполук для подальшого дослідження методом молекулярного докінгу.

Було проведено аналіз просторової структури тирозинової протеїнкінази JAK1 та встановлено значну лабільність амінокислотного залишку Glu966, що може бути важливим для розпізнавання більш широкого спектру хімічних сполук потенційних інгібіторів даної протеїнкінази.

Побудовано та валідовано модель для докінгу в ансамбль структур протеїнкінази JAK1. Модель показала високу здатність до розпізнавання інгібіторів протеїнкінази JAK1, AUC становив 98.4.

За допомогою молекулярного докінгу було вибрано 35 сполук для подальшого біохімічного тестування. З 35 сполук 2 проявило інгібувальні властивості щодо протеїнкінази JAK1. Значення IC50 становили 41,3 та 30,1 мкМ.

Відібрані сполуки проявили також інгібувальні властивості щодо протеїнкінази JAK2, що свідчить про не специфічний характер інгібування розробленими сполуками протеїнкіназ родини Janus kinase (JAK).

### Список використаних джерел

- [1] O'Shea J J, Schwartz D M, Villarino A V, Gadina M, McInnes I B and Laurence A 2015 The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention *Annu. Rev. Med.* **66** 311–28
- [2] Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, Ariola C, Fodale V, Clappier E, Paoloni F, Martinelli S, Fragale A, Sanchez M, Tavolaro S, Messina M, Cazzaniga G, Camera A, Pizzolo G, Tornesello A, Vignetti M, Battistini A, Cavé H, Gelb B D, Renauld J-C, Biondi A, Constantinescu S N, Foà R and Tartaglia M 2008 Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia *J. Exp. Med.* **205** 751–8
- [3] Kuhn A, Wenzel J and Weyd H 2014 Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **47** 148–62
- [4] Shen Y, Liu Y, Ke X, Kang H-Y, Hu G-H and Hong S-L 2016 Association between JAK1 gene polymorphisms and susceptibility to allergic rhinitis *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **34** 124–9
- [5] Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben T Y, Karp C L and Donaldson D D 1998 Interleukin-13: central mediator of allergic asthma *Science* **282** 2258–61
- [6] Schwartz D M, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M and O'Shea J J 2017 JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases *Nat. Rev. Drug Discov.* **17** 78
- [7] Ferreira S, Guttman-Yassky E and Torres T 2020 Selective JAK1 Inhibitors for the Treatment of Atopic Dermatitis: Focus on Upadacitinib and Abrocitinib *Am. J. Clin. Dermatol.* **21** 783–98

- [8] Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller D S, Wu X, Block M L, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong J-S and Zhang J 2005 Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19** 533–42
- [9] Harris C and Cummings J R F 2021 JAK1 inhibition and inflammatory bowel disease *Rheumatol. Oxf. Engl.* **60** ii45–51
- [10] Buchert M, Burns C J and Ernst M 2016 Targeting JAK kinase in solid tumors: emerging opportunities and challenges *Oncogene* **35** 939–51
- [11] Wood H, Chandler A, Nezamololama N, Papp K and Gooderham M J 2022 Safety of Janus kinase (JAK) inhibitors in the short-term treatment of atopic dermatitis *Int. J. Dermatol.* **61** 746–54
- [12] O'Shea J J and Gadina M 2019 Selective Janus kinase inhibitors come of age *Nat. Rev. Rheumatol.* **15** 74–5
- [13] Menet C J, Rompaey L V and Geney R 2013 Advances in the discovery of selective JAK inhibitors *Prog. Med. Chem.* **52** 153–223
- [14] Thompson J E 2005 JAK protein kinase inhibitors *Drug News Perspect.* **18** 305–10
- [15] Wilks A F, Harpur A G, Kurban R R, Ralph S J, Zürcher G and Ziemiecki A 1991 Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase *Mol. Cell. Biol.* **11** 2057–65
- [16] Gurniak C B and Berg L J 1996 Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells *Blood* **87** 3151–60

- [17] Harpur A G, Andres A C, Ziemiecki A, Aston R R and Wilks A F 1992 JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases *Oncogene* **7** 1347–53
- [18] Kawamura M, McVicar D W, Johnston J A, Blake T B, Chen Y Q, Lal B K, Lloyd A R, Kelvin D J, Staples J E and Ortaldo J R 1994 Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** 6374–8
- [19] Rane S G and Reddy E P 1994 JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells *Oncogene* **9** 2415–23
- [20] Takahashi T and Shirasawa T 1994 Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases *FEBS Lett.* **342** 124–8
- [21] Lai K S, Jin Y, Graham D K, Witthuhn B A, Ihle J N and Liu E T 1995 A kinase-deficient splice variant of the human JAK3 is expressed in hematopoietic and epithelial cancer cells *J. Biol. Chem.* **270** 25028–36
- [22] Aaronson D S and Horvath C M 2002 A Road Map for Those Who Don't Know JAK-STAT *Science* **296** 1653–5
- [23] Aittomäki S and Pesu M 2014 Therapeutic targeting of the Jak/STAT pathway *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **114** 18–23
- [24] Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F and Rahim F 2015 STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing *Cell J.* **17** 395–411
- [25] Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt V E, Silvennoinen O and O'Shea J J 2004 The Janus kinases (Jaks) *Genome Biol.* **5** 253
- [26] Glassman C R, Tsutsumi N, Saxton R A, Lupardus P J, Jude K M and Garcia K C 2022 Structure of a Janus kinase cytokine receptor complex reveals the basis for dimeric activation *Science* **376** 163–9

- [27] Williams N K, Bamert R S, Patel O, Wang C, Walden P M, Wilks A F, Fantino E, Rossjohn J and Lucet I S 2009 Dissecting Specificity in the Janus Kinases: The Structures of JAK-Specific Inhibitors Complexed to the JAK1 and JAK2 Protein Tyrosine Kinase Domains *J. Mol. Biol.* **387** 219–32
- [28] Dellafiora L, Galaverna G, Cruciani G, Dall’Asta C and Bruni R 2018 On the Mechanism of Action of Anti-Inflammatory Activity of Hypericin: An In Silico Study Pointing to the Relevance of Janus Kinases Inhibition *Molecules* **23**
- [29] Manning G, Whyte D B, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S 2002 The protein kinase complement of the human genome *Science* **298** 1912–34
- [30] Fernández-Clotet A, Castro-Poceiro J and Panés J 2019 JAK Inhibition: The Most Promising Agents in the IBD Pipeline? *Curr. Pharm. Des.* **25** 32–40
- [31] Sandborn W J, Ghosh S, Panes J, Vranic I, Su C, Rousell S, Niezychowski W, and Study A3921063 Investigators 2012 Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis *N. Engl. J. Med.* **367** 616–24
- [32] Stoica B, DeBell K E, Graham L, Rellahan B L, Alava M A, Laborda J and Bonvini E 1998 The amino-terminal Src homology 2 domain of phospholipase C gamma 1 is essential for TCR-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 1 *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **160** 1059–66
- [33] Sakaguchi K, Okabayashi Y, Kido Y, Kimura S, Matsumura Y, Inushima K and Kasuga M 1998 Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **12** 536–43

- [34] Garrido-Trigo A and Salas A 2020 Molecular Structure and Function of Janus Kinases: Implications for the Development of Inhibitors *J. Crohns Colitis* **14** S713–24
- [35] Toms A, Deshpande A, McNally R, Jeong Y, Rogers J, Kim C, Gruner S, Ficarro S, Marto J, Sattler M, Griffin J and Eck M 2013 Structure of a pseudokinase domain switch that controls oncogenic activation of Jak kinases *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**
- [36] Smyth M S and Martin J H J 2000 x Ray crystallography *Mol. Pathol.* **53** 8–14
- [37] Dubach V R A and Guskov A 2020 The Resolution in X-ray Crystallography and Single-Particle Cryogenic Electron Microscopy *Crystals* **10** 580
- [38] Imada K and Leonard W J 2000 The Jak-STAT pathway *Mol. Immunol.* **37** 1–11
- [39] Durham G A, Williams J J L, Nasim M T and Palmer T M 2019 Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease *Trends Pharmacol. Sci.* **40** 298–308
- [40] Rogers R S, Horvath C M and Matunis M J 2003 SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation *J. Biol. Chem.* **278** 30091–7
- [41] Sonnenblick A, Levy C and Razin E 2004 Interplay between MITF, PIAS3, and STAT3 in mast cells and melanocytes *Mol. Cell. Biol.* **24** 10584–92
- [42] Kershaw N J, Murphy J M, Liao N P D, Varghese L N, Laktyushin A, Whitlock E L, Lucet I S, Nicola N A and Babon J J 2013 SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20** 469–76

- [43] Okumura F, Joo-Okumura A, Nakatsukasa K and Kamura T 2016 The role of cullin 5-containing ubiquitin ligases *Cell Div.* **11** 1
- [44] ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M and Shuai K 2002 Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase *Mol. Cell. Biol.* **22** 5662–8
- [45] Ram P A and Waxman D J 1997 Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase *J. Biol. Chem.* **272** 17694–702
- [46] Hu X, Li J, Fu M, Zhao X and Wang W 2021 The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic *Signal Transduct. Target. Ther.* **6** 1–33
- [47] Lettre G and Rioux J D 2008 Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies *Hum. Mol. Genet.* **17** R116-121
- [48] Béraud D and Maguire-Zeiss K A 2012 Misfolded  $\alpha$ -synuclein and Toll-like receptors: therapeutic targets for Parkinson's disease *Parkinsonism Relat. Disord.* **18 Suppl 1** S17-20
- [49] Turksen K, Kupper T, Degenstein L, Williams I and Fuchs E 1992 Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** 5068–72
- [50] Taylor P C, Laedermann C, Alten R, Feist E, Choy E, Haladyj E, De La Torre I, Richette P, Finckh A and Tanaka Y 2023 A JAK Inhibitor for Treatment of Rheumatoid Arthritis: The Baricitinib Experience *J. Clin. Med.* **12** 4527
- [51] Shawky A M, Almalki F A, Abdalla A N, Abdelazeem A H and Gouda A M 2022 A Comprehensive Overview of Globally Approved JAK Inhibitors *Pharmaceutics* **14**

- [52] Vainchenker W, Leroy E, Gilles L, Marty C, Plo I and Constantinescu S N 2018 JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders *F1000Research* **7** 82
- [53] Burke J R, Cheng L, Gillooly K M, Strnad J, Zupa-Fernandez A, Catlett I M, Zhang Y, Heimrich E M, McIntyre K W, Cunningham M D, Carman J A, Zhou X, Banas D, Chaudhry C, Li S, D'Arienzo C, Chimalakonda A, Yang X, Xie J H, Pang J, Zhao Q, Rose S M, Huang J, Moslin R M, Wroblewski S T, Weinstein D S and Salter-Cid L M 2019 Autoimmune pathways in mice and humans are blocked by pharmacological stabilization of the TYK2 pseudokinase domain *Sci. Transl. Med.* **11** eaaw1736
- [54] Li Y, Yuan L, Yang J, Lei Y, Zhang H, Xia L, Shen H and Lu J 2019 Changes in Serum Cytokines May Predict Therapeutic Efficacy of Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis *Mediators Inflamm.* **2019** 5617431
- [55] Curtis J R, Xie F, Yun H, Bernatsky S and Winthrop K L 2016 Real-World Comparative Risks of Herpes Virus Infections in Tofacitinib and Biologic-Treated Rheumatoid Arthritis Patients *Ann. Rheum. Dis.* **75** 1843–7
- [56] Xie F, Yun H, Bernatsky S and Curtis J R 2016 Risk for Gastrointestinal Perforation among Rheumatoid Arthritis Patients receiving Tofacitinib, Tocilizumab, or other Biologics *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68** 2612–7
- [57] Fautrel B, Kirkham B, Pope J E, Takeuchi T, Gaich C, Quebe A, Zhu B, de la Torre I, De Leonadis F and Taylor P C 2019 Effect of Baricitinib and Adalimumab in Reducing Pain and Improving Function in Patients with Rheumatoid Arthritis in Low Disease Activity: Exploratory Analyses from RA-BEAM *J. Clin. Med.* **8** 1394
- [58] Guttman-Yassky E, Silverberg J I, Nemoto O, Forman S B, Wilke A, Prescilla R, de la Peña A, Nunes F P, Janes J, Gamalo M, Donley D, Paik J, DeLozier A M, Nickoloff B J and Simpson E L 2019 Baricitinib in adult

- patients with moderate-to-severe atopic dermatitis: A phase 2 parallel, double-blinded, randomized placebo-controlled multiple-dose study *J. Am. Acad. Dermatol.* **80** 913-921.e9
- [59] Tuttle K R, Brosius F C, Adler S G, Kretzler M, Mehta R L, Tumlin J A, Tanaka Y, Haneda M, Liu J, Silk M E, Cardillo T E, Duffin K L, Haas J V, Macias W L, Nunes F P and Janes J M 2018 JAK1/JAK2 inhibition by baricitinib in diabetic kidney disease: results from a Phase 2 randomized controlled clinical trial *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **33** 1950–9
- [60] Gavegnano C, Haile W B, Hurwitz S, Tao S, Jiang Y, Schinazi R F and Tyor W R 2019 Baricitinib reverses HIV-associated neurocognitive disorders in a SCID mouse model and reservoir seeding in vitro *J. Neuroinflammation* **16** 182
- [61] Seif F, Aazami H, Khoshmirsafa M, Kamali M, Mohsenzadegan M, Pornour M and Mansouri D 2020 JAK Inhibition as a New Treatment Strategy for Patients with COVID-19 *Int. Arch. Allergy Immunol.* **181** 467–75
- [62] Bronte V, Ugel S, Tinazzi E, Vella A, De Sanctis F, Canè S, Batani V, Trovato R, Fiore A, Petrova V, Hofer F, Barouni R M, Musiu C, Caligola S, Pinton L, Torroni L, Polati E, Donadello K, Friso S, Pizzolo F, Iezzi M, Facciotti F, Pelicci P G, Righetti D, Bazzoni P, Rampudda M, Comel A, Mosaner W, Lunardi C and Olivieri O 2020 Baricitinib restrains the immune dysregulation in patients with severe COVID-19 *J. Clin. Invest.* **130** 6409–16
- [63] Honda S and Harigai M 2020 The safety of baricitinib in patients with rheumatoid arthritis *Expert Opin. Drug Saf.* **19** 545–51
- [64] Smolen J S, Genovese M C, Takeuchi T, Hyslop D L, Macias W L, Rooney T, Chen L, Dickson C L, Riddle Camp J, Cardillo T E, Ishii T and Winthrop

- K L 2019 Safety Profile of Baricitinib in Patients with Active Rheumatoid Arthritis with over 2 Years Median Time in Treatment *J. Rheumatol.* **46** 7–18
- [65] Gonzales A J, Bowman J W, Fici G J, Zhang M, Mann D W and Mitton-Fry M 2014 Oclacitinib (APOQUEL(®)) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **37** 317–24
- [66] Lopes N L, Campos D R, Machado M A, Alves M S R, de Souza M S G, da Veiga C C P, Merlo A, Scott F B and Fernandes J I 2019 A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of oclacitinib in cats *BMC Vet. Res.* **15** 137
- [67] Jagasia M, Perales M-A, Schroeder M A, Ali H, Shah N N, Chen Y-B, Fazal S, Dawkins F W, Arbushites M C, Tian C, Connelly-Smith L, Howell M D and Khoury H J 2020 Ruxolitinib for the treatment of steroid-refractory acute GVHD (REACH1): a multicenter, open-label phase 2 trial *Blood* **135** 1739–49
- [68] Cervantes F and Pereira A 2017 Does ruxolitinib prolong the survival of patients with myelofibrosis? *Blood* **129** 832–7
- [69] Olsen E A, Kornacki D, Sun K and Hordinsky M K 2020 Ruxolitinib cream for the treatment of patients with alopecia areata: A 2-part, double-blind, randomized, vehicle-controlled phase 2 study *J. Am. Acad. Dermatol.* **82** 412–9
- [70] McKeage K 2015 Ruxolitinib: A Review in Polycythaemia Vera *Drugs* **75** 1773–81
- [71] Harrison C N, Mead A J, Panchal A, Fox S, Yap C, Gbandi E, Houlton A, Alimam S, Ewing J, Wood M, Chen F, Coppel J, Panoskaltsis N, Knapper S, Ali S, Hamblin A, Scherber R, Dueck A C, Cross N C P, Mesa R and

- McMullin M F 2017 Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide *Blood* **130** 1889–97
- [72] Ajayi S, Becker H, Reinhardt H, Engelhardt M, Zeiser R, von Bubnoff N and Wäsch R 2018 Ruxolitinib *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **212** 119–32
- [73] Fogelman D, Cubillo A, García-Alfonso P, Mirón M L L, Nemunaitis J, Flora D, Borg C, Mineur L, Vieitez J M, Cohn A, Saylor G, Assad A, Switzky J, Zhou L and Bendell J 2018 Randomized, double-blind, phase two study of ruxolitinib plus regorafenib in patients with relapsed/refractory metastatic colorectal cancer *Cancer Med.* **7** 5382–93
- [74] Cao Y, Wei J, Zou L, Jiang T, Wang G, Chen L, Huang L, Meng F, Huang L, Wang N, Zhou X, Luo H, Mao Z, Chen X, Xie J, Liu J, Cheng H, Zhao J, Huang G, Wang W and Zhou J 2020 Ruxolitinib in treatment of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter, single-blind, randomized controlled trial *J. Allergy Clin. Immunol.* **146** 137-146.e3
- [75] Gaspari V, Zengarini C, Greco S, Vangeli V and Mastroianni A 2020 Side effects of ruxolitinib in patients with SARS-CoV-2 infection: Two case reports *Int. J. Antimicrob. Agents* **56** 106023
- [76] Tefferi A and Pardanani A 2011 Serious Adverse Events During Ruxolitinib Treatment Discontinuation in Patients With Myelofibrosis *Mayo Clin. Proc.* **86** 1188–91
- [77] Rosmarin D, Pandya A G, Lebwohl M, Grimes P, Hamzavi I, Gottlieb A B, Butler K, Kuo F, Sun K, Ji T, Howell M D and Harris J E 2020 Ruxolitinib cream for treatment of vitiligo: a randomised, controlled, phase 2 trial *Lancet Lond. Engl.* **396** 110–20

- [78] Sant'Antonio E, Bonifacio M, Breccia M and Rumi E 2019 A journey through infectious risk associated with ruxolitinib *Br. J. Haematol.* **187** 286–95
- [79] Palandri F, Palumbo G A, Elli E M, Polverelli N, Benevolo G, Martino B, Abruzzese E, Tiribelli M, Tieghi A, Latagliata R, Cavazzini F, Bergamaschi M, Binotto G, Crugnola M, Isidori A, Caocci G, Heidel F, Pugliese N, Bosi C, Bartoletti D, Auteri G, Cattaneo D, Scaffidi L, Trawinska M M, Stella R, Ciantia F, Pane F, Cuneo A, Krampera M, Semenzato G, Lemoli R M, Iurlo A, Vianelli N, Cavo M, Breccia M and Bonifacio M 2021 Ruxolitinib discontinuation syndrome: incidence, risk factors, and management in 251 patients with myelofibrosis *Blood Cancer J.* **11** 1–4
- [80] Loscocco G G, Vannucchi M, Paoli C, Franci A, Pieri L, Annunziato F, Massi D and Vannucchi A M 2017 Kaposi sarcoma in a patient treated with ruxolitinib *Ann. Oncol.* **28** 1670–1
- [81] Van Rompaey L, Galien R, van der Aar E M, Clement-Lacroix P, Nelles L, Smets B, Lepescheux L, Christophe T, Conrath K, Vandeghinste N, Vayssiere B, De Vos S, Fletcher S, Brys R, van 't Klooster G, Feyen J H M and Menet C 2013 Preclinical characterization of GLPG0634, a selective inhibitor of JAK1, for the treatment of inflammatory diseases *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191** 3568–77
- [82] Orbai A-M, Ogdie A, Gossec L, Tillett W, Leung Y Y, Gao J, Trivedi M, Tasset C, Meuleners L, Besuyen R, Hendrikx T and Coates L C 2020 Effect of filgotinib on health-related quality of life in active psoriatic arthritis: a randomized phase 2 trial (EQUATOR) *Rheumatol. Oxf. Engl.* **59** 1495–504
- [83] Yeh Y-H J, Jenike K M, Calvi R M, Chiarella J, Hoh R, Deeks S G and Ho Y-C Filgotinib suppresses HIV-1-driven gene transcription by inhibiting HIV-1 splicing and T cell activation *J. Clin. Invest.* **130** 4969–84

- [84] Edwards C J, Sawant R, Garg V, Du E X, Friedman A and Betts K A 2021 A Matching-Adjusted Indirect Comparison of Upadacitinib Versus Tofacitinib in Adults with Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis *Rheumatol. Ther.* **8** 167–81
- [85] Sandborn W J, Feagan B G, Loftus E V, Peyrin-Biroulet L, Van Assche G, D’Haens G, Schreiber S, Colombel J-F, Lewis J D, Ghosh S, Armuzzi A, Scherl E, Herfarth H, Vitale L, Mohamed M-E F, Othman A A, Zhou Q, Huang B, Thakkar R B, Pangan A L, Lacerda A P and Panes J 2020 Efficacy and Safety of Upadacitinib in a Randomized Trial of Patients With Crohn’s Disease *Gastroenterology* **158** 2123-2138.e8
- [86] Guttman-Yassky E, Thaçi D, Pangan A L, Hong H C-H, Papp K A, Reich K, Beck L A, Mohamed M-E F, Othman A A, Anderson J K, Gu Y, Teixeira H D and Silverberg J I 2020 Upadacitinib in adults with moderate to severe atopic dermatitis: 16-week results from a randomized, placebo-controlled trial *J. Allergy Clin. Immunol.* **145** 877–84
- [87] Sandborn W J, Ghosh S, Panes J, Schreiber S, D’Haens G, Tanida S, Siffledeen J, Enejosa J, Zhou W, Othman A A, Huang B and Higgins P D R 2020 Efficacy of Upadacitinib in a Randomized Trial of Patients With Active Ulcerative Colitis *Gastroenterology* **158** 2139-2149.e14
- [88] Mease P J, Lertratanakul A, Anderson J K, Papp K, Van den Bosch F, Tsuji S, Dokoupilova E, Keiserman M, Wang X, Zhong S, McCaskill R M, Zueger P, Pangan A L and Tillett W 2021 Upadacitinib for psoriatic arthritis refractory to biologics: SELECT-PsA 2 *Ann. Rheum. Dis.* **80** 312–20
- [89] Rubbert-Roth A, Enejosa J, Pangan A L, Haraoui B, Rischmueller M, Khan N, Zhang Y, Martin N and Xavier R M 2020 Trial of Upadacitinib or Abatacept in Rheumatoid Arthritis *N. Engl. J. Med.* **383** 1511–21

- [90] Crowley E L, Nezamololama N, Papp K and Gooderham M J 2020 Abrocitinib for the treatment of atopic dermatitis *Expert Rev. Clin. Immunol.* **16** 955–62
- [91] Covington M, He X, Scuron M, Li J, Collins R, Juvekar A, Shin N, Favata M, Gallagher K, Sarah S, Xue C-B, Peel M, Burke K, Oliver J, Fay B, Yao W, Huang T, Scherle P, Diamond S, Newton R, Zhang Y and Smith P 2020 Preclinical characterization of itacitinib (INCB039110), a novel selective inhibitor of JAK1, for the treatment of inflammatory diseases *Eur. J. Pharmacol.* **885** 173505
- [92] Seror R, Camus M, Salmon J-H, Roux C, Dernis E, Basch A, Germain V, Leske C, Brousseau S, Truchetet M-E, Ramon A, Gottenberg J-E, Felten R, Coury F, Colombey A, Prati C, Mariette X and Avouac J 2022 Do JAK inhibitors affect immune response to COVID-19 vaccination? Data from the MAJIK-SFR Registry *Lancet Rheumatol.* **4** e8–11
- [93] Ballester P J 2011 Ultrafast shape recognition: method and applications *Future Med. Chem.* **3** 65–78
- [94] Totrov M 2008 Atomic property fields: generalized 3D pharmacophoric potential for automated ligand superposition, pharmacophore elucidation and 3D QSAR *Chem. Biol. Drug Des.* **71** 15–27
- [95] Anon Molsoft L.L.C.: Atomic Property Fields
- [96] Schreyer A and Blundell T 2009 CREDO: a protein-ligand interaction database for drug discovery *Chem. Biol. Drug Des.* **73** 157–67
- [97] Cannon E O, Nigsch F and Mitchell J B 2008 A novel hybrid ultrafast shape descriptor method for use in virtual screening *Chem. Cent. J.* **2** 3
- [98] Armstrong M S, Morris G M, Finn P W, Sharma R, Moretti L, Cooper R I and Richards W G 2010 ElectroShape: fast molecular similarity calculations

- incorporating shape, chirality and electrostatics *J. Comput. Aided Mol. Des.* **24** 789–801
- [99] Armstrong M S, Finn P W, Morris G M and Richards W G 2011 Improving the accuracy of ultrafast ligand-based screening: incorporating lipophilicity into ElectroShape as an extra dimension *J. Comput. Aided Mol. Des.* **25** 785–90
- [100] Zhou T, Lafleur K and Caflisch A 2010 Complementing ultrafast shape recognition with an optical isomerism descriptor *J. Mol. Graph. Model.* **29** 443–9
- [101] Schreyer A M and Blundell T 2012 USRCAT: real-time ultrafast shape recognition with pharmacophoric constraints *J. Cheminformatics* **4** 27
- [102] Kramer B, Rarey M and Lengauer T 1999 Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking *Proteins* **37** 228–41
- [103] Jones G, Willett P, Glen R C, Leach A R and Taylor R 1997 Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking<sup>11</sup> Edited by F. E. Cohen *J. Mol. Biol.* **267** 727–48
- [104] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, Sanner M F, Belew R K, Goodsell D S and Olson A J 2009 AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility *J. Comput. Chem.* **30** 2785–91
- [105] Halgren T A, Murphy R B, Friesner R A, Beard H S, Frye L L, Pollard W T and Banks J L 2004 Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening *J. Med. Chem.* **47** 1750–9

- [106] Neves M A C, Totrov M and Abagyan R 2012 Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement *J. Comput. Aided Mol. Des.* **26** 675–86
- [107] Matsuzaki Y, Uchikoga N, Ohue M and Akiyama Y 2017 Rigid-Docking Approaches to Explore Protein-Protein Interaction Space *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **160** 33–55
- [108] Andrusier N, Mashiach E, Nussinov R and Wolfson H J 2008 Principles of Flexible Protein-Protein Docking *Proteins* **73** 271–89
- [109] Morris G M and Lim-Wilby M 2008 Molecular docking *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **443** 365–82
- [110] Anon Molsoft L.L.C.: ICM Docking and Screening
- [111] Hart T N and Read R J 1992 A multiple-start Monte Carlo docking method *Proteins* **13** 206–22
- [112] Totrov M and Abagyan R 1999 Derivation of sensitive discrimination potential for virtual ligand screening *Proceedings of the third annual international conference on Computational molecular biology RECOMB '99* (New York, NY, USA: Association for Computing Machinery) pp 312–20
- [113] Bursulaya B D, Totrov M, Abagyan R and Brooks C L 2003 Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking *J. Comput. Aided Mol. Des.* **17** 755–63
- [114] Chen H, Lyne P D, Giordanetto F, Lovell T and Li J 2006 On evaluating molecular-docking methods for pose prediction and enrichment factors *J. Chem. Inf. Model.* **46** 401–15

- [115] Cross J B, Thompson D C, Rai B K, Baber J C, Fan K Y, Hu Y and Humblet C 2009 Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy *J. Chem. Inf. Model.* **49** 1455–74
- [116] Katritch V, Jaakola V-P, Lane J R, Lin J, Ijzerman A P, Yeager M, Kufareva I, Stevens R C and Abagyan R 2010 Structure-based discovery of novel chemotypes for adenosine A(2A) receptor antagonists *J. Med. Chem.* **53** 1799–809
- [117] Lam P C-H, Abagyan R and Totrov M 2019 Hybrid receptor structure/ligand-based docking and activity prediction in ICM: development and evaluation in D3R Grand Challenge 3 *J. Comput. Aided Mol. Des.* **33** 35–46
- [118] Totrov M 2011 Ligand binding site superposition and comparison based on Atomic Property Fields: identification of distant homologues, convergent evolution and PDB-wide clustering of binding sites *BMC Bioinformatics* **12** S35
- [119] Ballester P J and Richards W G 2007 Ultrafast shape recognition to search compound databases for similar molecular shapes *J. Comput. Chem.* **28** 1711–23
- [120] Zak M, Hanan E J, Lupardus P, Brown D G, Robinson C, Siu M, Lyssikatos J P, Romero F A, Zhao G, Kellar T, Mendonca R, Ray N C, Goodacre S C, Crackett P H, McLean N, Hurley C A, Yuen P-W, Cheng Y-X, Liu X, Liimatta M, Kohli P B, Nonomiya J, Salmon G, Buckley G, Lloyd J, Gibbons P, Ghilardi N, Kenny J R and Johnson A 2019 Discovery of a class of highly potent Janus Kinase 1/2 (JAK1/2) inhibitors demonstrating effective cell-based blockade of IL-13 signaling *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29** 1522–31

- [121] Bottegoni G, Kufareva I, Totrov M and Abagyan R 2009 Four-dimensional docking: A fast and accurate account of discrete receptor flexibility in ligand docking *J. Med. Chem.* **52** 397–406
- [122] Abagyan R, Totrov M and Kuznetsov D 1994 ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation *J. Comput. Chem.* **15** 488–506
- [123] Traxler P and Furet P 1999 Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors *Pharmacol. Ther.* **82** 195–206
- [124] Su Y, Peilu S, Wang H, Hu B, Wang J and Cheng M 2019 Precise design of highly isoform-selective p21-activated kinase 4 (PAK4) inhibitors: Computational insights into the selectivity mechanism through molecular dynamics simulation and binding free energy calculation *J. Biomol. Struct. Dyn.* **38** 1–18