

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Школа ИШНПТ
 Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология
 Отделение школы (НОЦ) Н.М. Кижнера

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Изучение взаимодействия производных карбамида и барбитуровой кислоты с GABAa рецептором

УДК 547.495.2:547.854.5:611.018.86

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Иманкулова Евгения Анатольевна		19.04.19

Руководитель ВКР

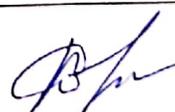
Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор НОЦ Н.М. Кижнера	Хлебников А.И.	д.х.н., профессор		20.05.19

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

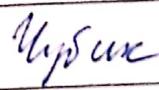
По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН, ШБИП	Креницына З.В.	к.т.н., доцент		19.04.2019

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД, ШБИП	Романова С.В.			20.05.19

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент НОЦ Н.М. Кижнера	Чубик М.В.	к.х.н., доцент		30.05.19

Перечень планируемых результатов обучения (РО)
 ООП (компетенции из ФГОС) 19.04.01 «Биотехнология» (магистр)
 профиль «Биотехнология»

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)	Требования ФГОС ВО, критериев и/или заинтересованных сторон
<i>Общекультурные компетенции</i>		
P1	Демонстрировать глубокие знания социальных, этических и правовых аспектов инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах устойчивого развития	Требования ФГОС ВО (ОК-2, ОК-6), Критерий 5 АИОР (пп. 1.4), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P2	Постоянно повышать интеллектуальный и общекультурный уровень и профессиональную квалификацию, способствовать обучению персонала	Требования ФГОС ВО (ОК-1, ОК-3, ОК-4, ОК-5, ПК-20, ПК-21, ПК-22), Критерий 5 АИОР (пп. 1.2, 1.3, 1.5, 1.6, 2.1), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
<i>Профессиональные компетенции</i>		
P3	Проводить теоретические и экспериментальные исследования в различных областях прикладной биотехнологии	Требования ФГОС ВО (ОПК-4, ОПК-5, ПК-1, ПК-19), Критерий 5 АИОР (пп. 2.4, 2.5), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P4	Ставить и решать задачи инженерного анализа для создания инновационных биотехнологических процессов и продуктов	Требования ФГОС ВО (ОПК-6, ПК-2, ПК-8, ПК-15, ПК-18), Критерий 5 АИОР (п. 1.1), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P5	Эффективно организовывать и участвовать в работе коллективов, в том числе международных, демонстрировать ответственность за результаты инженерной деятельности	Требования ФГОС ВО (ОПК-2, ОПК-3, ПК-3, ПК-7, ПК-11), Критерий 5 АИОР (п. 1.1, 1.4, 2.2, 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P6	Профессионально эксплуатировать современные биотехнологические производства, обеспечивая их высокую эффективность и безопасность	Требования ФГОС ВО (ОПК-1, ПК-9, ПК-10, ПК-12, ПК-13, ПК-16) [2], Критерий 5 АИОР (п. 1.1, 2.6), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI
P7	Разрабатывать и внедрять новые биотехнологические процессы и оборудование в рамках проектирования новых и усовершенствования действующих производств	Требования ФГОС ВО (ПК-4, ПК-5, ПК-6, ПК-14, ПК-17), Критерий 5 АИОР (пп. 2.1, 2.2, 2.3), согласованный с требованиями международных стандартов EUR-ACE и FEANI

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Школа ИШНПТ
 Направление подготовки (специальность) 19.04.01 Биотехнология
 Отделение школы (НОЦ) НОЦ Н.М. Кижнера

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП
Чубик 29.01.19 **Чубик М.В.**
 (Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Иманкуловой Евгении Анатольевны

Тема работы:

Изучение взаимодействия производных карбамида и барбитуровой кислоты с GABA _A рецептором	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	№147/с от 25.02.2019 г.

Срок сдачи студентом выполненной работы:	01.06.2019 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	Объект исследования - производные карбамида и барбитуровой кислоты – лиганды GABA _A рецептора с известными показателями активности
--------------------------	---

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	Обзор литературы; постановка задачи исследования; объект и методы исследования; расчеты и аналитика; результаты проведенного исследования; финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение; социальная ответственность; заключение по работе.
---	---

Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы

(с указанием разделов)

Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Креницына З.В., доцент ОСГН, ШБИП, к.т.н.
Социальная ответственность	Романова С.В., старший преподаватель ООД, ШБИП
Раздел на иностранном языке	Аксёнова Н.В., доцент отделения иностранных языков ШБИП, к.ф.н.

Названия разделов, которые должны быть написаны на русском и иностранном языках:

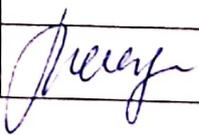
Изучение взаимодействия биологически активных веществ с биомишенями на примере GABA_A рецептора (литературный обзор)

Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику	25.02.2019 г.
---	---------------

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Хлебников А.И.	д.х.н, профессор		25.02.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Иманкулова Евгения Анатольевна		25.02.19

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Иманкуловой Евгении Анатольевны

Школа	ИШНПТ	Отделение (НОЦ)	НОЦ Н.М. Кижнера
Уровень образования	магистратура	Направление	19.04.01 Биотехнология

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	- Имеется оборудование для проведения исследования на сумму 242400 руб. - В реализации проекта задействованы 2 человека: 1 руководитель проекта, 1 исполнитель проекта.
2. <i>Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	- Федеральный закон от 24.07.2009 №212-ФЗ «О страховых взносах в Пенсионный фонд Российской Федерации, Фонд социального страхования Российской Федерации, Федеральный фонд обязательного медицинского страхования» - ГОСТ 14.322-83 «Нормирование расхода материалов» - ГОСТ 31532-2012 «Энергосбережение. Энергетическая эффективность. Состав показателей. Общие положения» - Минимальный размер оплаты труда (на 2019 год) составляет 11280 руб.
3. <i>Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ</i>	- Инициализация проекта, его технико-экономическое обоснование и потенциальные потребители результатов. - Анализ конкурентных технических решений и возможных альтернатив проведения НТИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения.
2. <i>Разработка устава научно-технического проекта</i>	Определение ограничений и допущений проекта
3. <i>Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок</i>	- Планирование работ по проекту. - Расчет бюджета затрат на проектирование, в т. ч. материальных затрат, затрат на оборудование и заработную плату.
4. <i>Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности</i>	Определение ресурсной, финансовой и экономической эффективности исследования.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

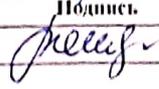
1. «Портрет» потребителя результатов НТИ
2. Сегментирование рынка
3. Оценка конкурентоспособности технических решений
4. Диаграмма Исикавы
5. График проведения и бюджет НТИ
6. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ
7. Потенциальные риски

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	13.03.2019
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН, ШБИП	Кришцына З. В.	к.т.н., доцент		13.03.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Иманкулова Евгения Анатольевна		13.03.19

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ДМ71	Иманкуловой Евгении Анатольевне

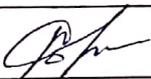
Школа	ИШНПТ	Отделение (НОЦ)	НОЦ Н.М. Кижнера
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	19.04.01 Биотехнология

Тема ВКР: Изучение взаимодействия производных карбамида и барбитуровой кислоты с GABAa рецептором

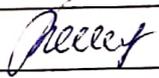
Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:	
<p>1. <i>Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</i></p>	<p>Объект исследования - производные карбамида и барбитуровой кислоты – лиганды GABAa рецептора с известными показателями активности Рабочая зона – химическая лаборатория RASA центра Национального исследовательского Томского политехнического университета. Область применения – медицинская химия</p>
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
<p>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности: 1.1 <i>специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства;</i> 1.2 <i>организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.</i></p>	<p>- Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 27.12.2018) - ГОСТ 12.2.032-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования.</p>
<p>2. Производственная безопасность: 2.1. <i>Анализ выявленных вредных и опасных факторов</i> 2.2. <i>Обоснование мероприятий по снижению воздействия</i></p>	<p>Выявление вредных факторов в химической лаборатории при разработке и проведении научного исследования: — отклонение показателей микроклимата; — превышение уровня шума; — отсутствие или недостаток естественного света; — недостаточная освещенность рабочей зоны; — повышенное значение напряжения в электрической цепи, замыкание которой может произойти через тело человека; — повышенный уровень УФ радиации.</p>
<p>3. Экологическая безопасность:</p>	<p>— загрязнение литосферы: утилизация бытовых отходов.</p>
<p>4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p>	<p>Перечень возможных ЧС - пожар, взрыв, разрушение зданий в результате разрядов атмосферного электричества; - наиболее типичная ЧС – пожар.</p>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	18.03.2019
--	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель ООД, ШБИП	Романова С.В.			18.03.19

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Иманкулова Евгения Анатольевна		18.03.19

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа _____ 94 _____ с., _____ 16 _____ рис., _____ 29 _____ табл.,
_____ 41 _____ источник, _____ 2 _____ прил.

Ключевые слова: _____ биологически активные соединения; лиганды; GABAa рецептор; нервная система, молекулярный докинг, гамк, производные мочевины, производные барбитуровой кислоты.

Объектом исследования является (ются) _____ производные карбамида и барбитуровой кислоты – лиганды GABAa рецептора.

Цель работы – _____ построение компьютерных моделей пригодных для поиска потенциальных лигандов для GABAa рецептора на основе ее молекулярной модели и SAR.

В процессе исследования проводились _____ рациональный дизайн лигандов и последующий молекулярный докинг соединений с моделями GABAa рецептора

В результате исследования _____ изучен механизм взаимодействия лигандов с GABAa рецептором при помощи молекулярного докинга. Определены дескрипторы лиганд-рецепторного взаимодействия – значение docking score и значения энергии взаимодействия между определенными аминокислотами активного центра и лигандами, в наибольшей мере определяющие противосудорожную активность.

Степень внедрения: _____ работа представлена на XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук».

Область применения: _____ фармацевтика.

Экономическая эффективность/значимость _____ работы проведенное исследование имеет коммерческий потенциал в сфере фармацевтики и может послужить основой для синтеза лекарственных препаратов.

В будущем планируется _____ провести дальнейшую функционализацию полученных соединений и исследовать их биологическую активность.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

Нормативные ссылки

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

- ГОСТ 12.2.032-78 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Рабочее место при выполнении работ сидя. Общие эргономические требования. - М.: ИПК Издательство стандартов, 2001.
- ГОСТ 12.0.003-2015 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Опасные и вредные производственные факторы. Классификация. - М.: Стандартиформ, 2016.
- ГОСТ 12.1.038-82 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Предельно допустимые значения напряжений прикосновения и токов (с Изменением N 1). М.: ИПК Издательство стандартов, 2001
- ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования (с Изменением N 1). М.: Стандартиформ, 2006

Определения

В данной работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

Молекулярный докинг - метод виртуального скрининга, когда к рецептору «подстраиваются» потенциально активные соединения - лиганды - на основе оптимального стерического расположения друг относительно друга.

Криоэлектронная микроскопия высокого разрешения

Агонист – вещество, в результате взаимодействия которого с рецептором возникает ответ. Связывание агониста эффективно, и он обладает внутренней активностью. Агонистом может быть как эндогенный нейротрансмиттер или гормон, так и синтетическое БАВ.

Антагонист – ингибитор эффекта агониста, который в отсутствие агониста связывается с рецептором, но при этом не индуцирует ответа. Его

связывание неэффективно, а внутренняя активность равна нулю. Он может занимать как те же места, с которыми связывается агонист, так и вступать в качестве аллостерического ингибитора. При аллостерическом ингибировании антагонист, связываясь с рецептором, нарушает его структуру, способную связываться с агонистом, т.е. изменяет аффинность рецептора.

ЭД₅₀ - доза вещества, которая обеспечивает требуемый результат у половины (50%) используемых в эксперименте единиц.

Обозначения и сокращения

GABA_A –рецептор γ -аминомасляной кислоты подтипа A

ГАМК - γ -аминомасляная кислота

БДЗ – бензодиазепиновый сайт GABA_A рецептора

QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) – метод, используемый для оптимизации структур базовых молекул и для предсказания активности отобранных соединений на основе строения лиганда.

Оглавление

Введение	14
1 Изучение взаимодействия биологически активных веществ с биомишениями на примере ГАВАа рецептора (литературный обзор)	16
1.1 Общие принципы получения биологически активных соединений	16
1.1.1 Принцип ключ-замок	18
1.1.2 Метод, основанный на структуре биологической мишени	20
1.1.3 Метод, основанный на структуре лиганда	22
1.2 ГАВАа рецептор и его основные характеристики	26
1.3 Характеристика агонистов ГАВАа рецептора	35
2 Объекты и методы исследования	37
2.1 Молекулярный докинг	37
2.2 Экспериментальная часть	40
2.3 Анализ лигандов с использованием SAR анализа	42
3 Результаты и обсуждение	44
4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	51
4.1 Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	51
4.2 Инициация проекта	55
4.3 Планирование управления научно-техническим проектом	57
4.4 Оценка сравнительной эффективности исследования	70
5 Социальная ответственность	74
5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	74
5.2 Производственная безопасность	76
5.3 Экологическая безопасность	84
5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	85

Список публикаций студента	89
Выводы	90
Список литературы	91
Приложение А	95
Приложение Б	106

Введение

Одной из важных фармакологических мишеней среди рецепторов центральной нервной системы (ЦНС) является рецептор γ -аминомасляной кислоты подтипа А (GABA_A-рецептор), участвующий в важнейших процессах ЦНС и психики человека: процессе быстрой передачи нервного импульса, процессах обучения и формирования памяти, бодрствования и сна. Также, известно, о важности рецепторов GABA_A в опосредованном влиянии этанола на ЦНС. Поэтому поиск селективных лигандов GABA_A рецептора и его подтипов является актуальным и направлен на создание лекарственных средств для лечения таких болезней как бессонница, тревожность и эпилепсия, для борьбы с алкогольной зависимостью и стимуляции когнитивных процессов.

GABA_A является ионотропным рецептором, принадлежащим к суперсемейству пентамерных лиганд-зависимых ионных каналов с CYS-петлей. Под действием эндогенного лиганда – γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) GABA_A селективно пропускает ионы Cl⁻, что приводит к изменению постсинаптического потенциала. [1]

Для дизайна лигандов рецепторов используются два основных метода: (а) создание библиотеки веществ с потенциальной биологической активностью для последующего биологического скрининга; (б) модификация веществ с известной биологической активностью на основе SAR и QSAR-моделей и моделей лиганд-рецепторных комплексов. Библиотеки химических веществ с заданной биологической активностью создаются с помощью виртуального скрининга на основе пространственной структуры биологической мишени или на основе лигандов данной мишени. Для использования первого метода необходимо наличие трехмерной структуры белка. Однако пространственная структура GABA_A –рецептора в силу ограничений методов молекулярной биологии пока не была получена экспериментально. Вместо этого используют пространственные модели рецепторов, построенные методом моделирования по гомологии, далее с

помощью докинга получают лиганд-рецепторные комплексы и оптимизируют их методами моделирования молекулярной динамики.

Цель работы:

Построение компьютерных моделей пригодных для поиска потенциальных лигандов для GABA_A рецептора на основе ее молекулярной модели и SAR.

Задачи:

1. Построить электронные модели молекул-лигандов, обладающих потенциальной активностью взаимодействия с GABA_A рецептором
2. Изучить механизм взаимодействия лигандов с рецептором при помощи молекулярного докинга
3. Построить SAR и QSAR-модели для лигандов GABA_A рецепторов, объясняющие активность структур на количественном уровне

Практическая значимость результатов работы состоит в том, что полученная в ходе работы модель SAR и QSAR может использоваться для предсказания активности потенциально биологически активных веществ.

1. Изучение взаимодействия биологически активных веществ с биомишениями на примере GABA_A рецептора (литературный обзор)

1.1 Общие принципы получения биологически активных соединений

Исторически обнаружение фармакологических свойств у природных и синтетических веществ основывалось на случайности, точнее на случайном обнаружении биологической активности в определенных классах соединений, в процессе их исследования. При этом биологическую активность оценивали с помощью экспериментов на животных или в лучшем случае с изолированными органами и клетками. Поэтому систематический поиск соединений, обладающих фармакологическими свойствами, сопряжен с большими объемами дорогостоящих и негуманных экспериментов на животных. В дальнейшем с развитием методов структурной химии появилась возможность определять структуру белков-рецепторов в комплексах с малыми молекулами-лигандами. С другой стороны, с расширением методологии синтетической органической химии увеличивалось количество органических соединений в виде потенциальных биологически активных веществ. Например, в настоящее время существует библиотека, которая содержит молекулы, сгенерированные *in silico*, которая насчитывает около 170 миллиардов структурных формул [1], а также библиотеки коммерчески доступных органических соединений (см., например, <http://zinc.docking.org/>), в которых представлены десятки миллионов структур. Для такого огромного количества соединений в принципе невозможно экспериментальное

исследование биологических активностей. Количество рецепторов, а точнее молекулярных мишеней в организме человека насчитывает около 2 тыс. [2]. Это число увеличивается на несколько порядков после учета факторов, которые характерны для белков: альтернативный сплайсинг, посттрансляционные модификации, белок – белковые взаимодействия и наличие нескольких сайтов связывания лиганда с белком. С учетом данных факторов возникает необходимость использования компьютерных методов для исследования биологически активных соединений. В настоящее время существуют два основных подхода к применению компьютерных методов для создания лекарств: 1) метод, основанный на структуре биологической мишени (Structure-Based Drug Design) рисунок 1; 2) метод, основанный на структуре лиганда (Ligand-Based Drug Design) рисунок 2.

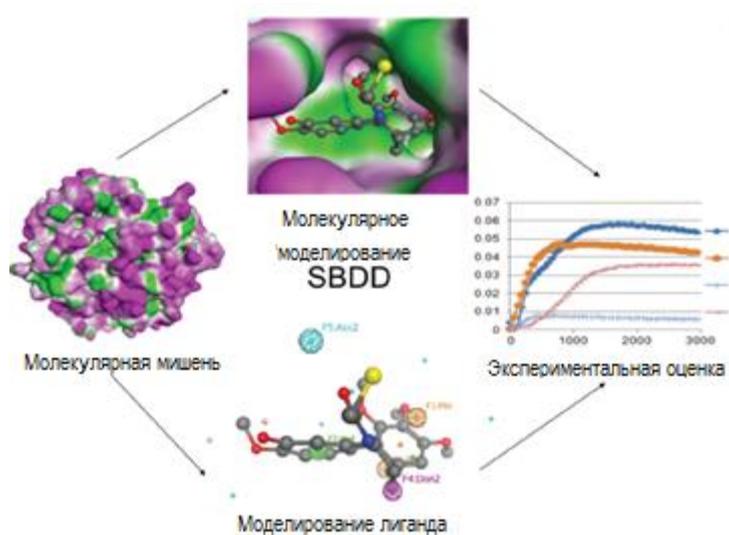


Рисунок 1 Схема применения метода, для исследования биологически активных соединений основанного на структуре биологической мишени (SBDD)

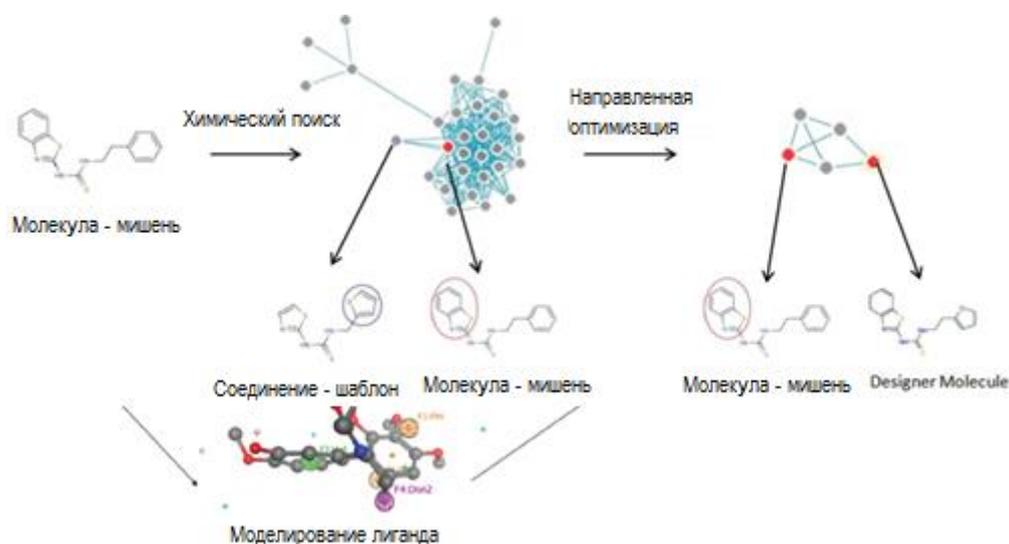


Рисунок 2 Схема применения метода, для исследования биологически активных соединений основанного на структуре лиганда (LBDD) [3].

При выборе того или иного подхода следует основываться на характеристиках лиганда и рецептора-мишени, а именно на их пространственной структуре. Первый метод базируется на знании структуры рецептора, а второй основывается только на сведениях о структуре лигандов, обладающих конкретным видом биологической активности. [4].

1.1.1 Принцип ключ-замок

С момента возникновения фармакологии как науки об изучении биологически активных веществ, воздействующих на организм человека, и по сей день большой интерес представляет изучение механизмов действия потенциальных лекарственных средств. Очень большое значение в развитии этих представлений сыграла теория рецепторов (П. Эрлих) в которой было доказано образование комплексов биологически активных веществ с определенными активными центрами в организме, которые и были названы рецепторами. В дальнейшем были введены понятия внутренней активности биологически активного вещества и его сродства к рецептору (Е. Ариенс).

Большинство биологически активных веществ по своей природе являются ферментами [5]. В связи с этим основными подходами к анализу взаимодействия рецептора и лиганда являются модель «ключ-замок» и модель индуцированного соответствия.

Модель «ключ-замок», предложенная в конце XIX в. Фишером иногда называют моделью «жесткой матрицы». [6]. Суть ее в том, что к ферменту, рецептору (замку) подходит лишь свой субстрат, лиганд (ключ), [7], что приводит к образованию короткоживущего фермент-субстратного комплекса рисунок 3.

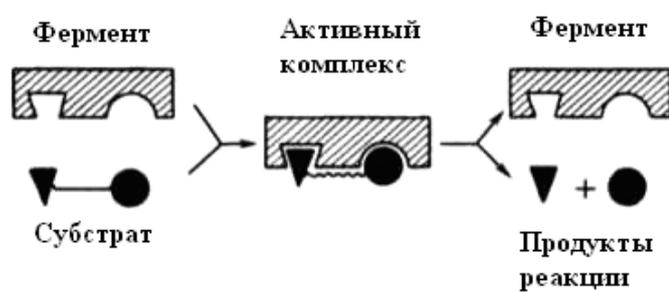


Рисунок 3 Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок» [5]

Считается, что аминокислотные остатки активного центра заранее подготовлены для связывания с лигандом. Плюсом данной модели является то, что она объясняет высокую специфичность ферментов, однако есть и существенный минус, на практике наблюдается такое явление, как стабилизация переходного состояния, что нельзя объяснить в рамках данной модели. В 1959 г. Кошландом был сформулирован метод «индуцированного соответствия». Существенным отличием является гибкость данной модели. Фермент представляет собой не статичный каркас, а гибкую модель, в которой активный центр способен изменяться и трансформироваться. В процессе связывания рецептора с лигандом индуцируется процесс конформационных изменений рисунок 4, т.е. аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, и другие группы принимают

пространственную ориентацию, необходимую для связывания лиганда. При этом аминокислотные остатки, не участвующие в образовании комплекса, могут погрузиться вглубь молекулы. [6].

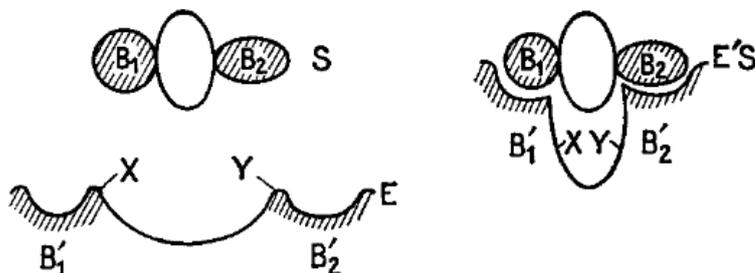


Рисунок 4 Механизм индуцированного соответствия, согласно которому связывание субстрата группами B_1 и B_2 вызывает изменение в конформации фермента, так что группы X и Y активного центра, необходимые для катализа, располагаются соответствующим образом относительно субстрата [8]

1.1.2 Метод, основанный на структуре биологической мишени

Данный метод, позволяющий оценить степень сродства рецептора и лиганда, часто в литературе также называют прямым методом. [9]. Основной процедурой для оценки комплементарности молекулярной структуры в соответствующем активном центре белка-мишени является процедура докинга рисунок 5. Молекулярный докинг является одним из методов виртуального скрининга, когда к рецептору «подстраиваются» потенциально активные соединения – лиганды – на основе оптимального стерического расположения друг относительно друга.

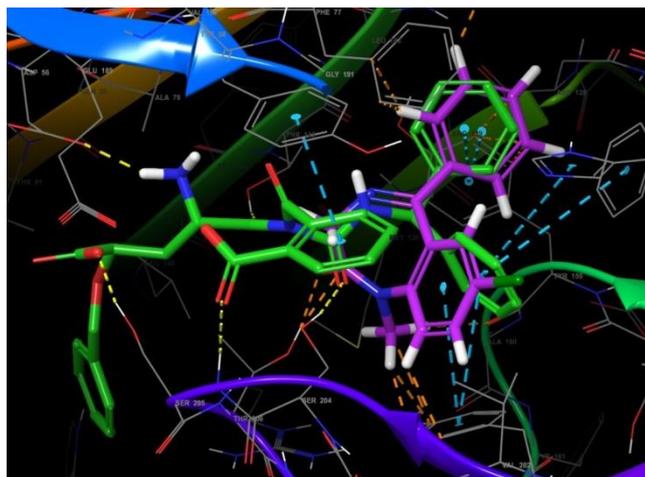


Рисунок 5 Молекулярный докинг, геометрия расположение лиганда в БЗД сайте GABA_A рецептора

Для поиска лигандов используют специальные программы, их достаточно много, и все они оптимизированы для поиска подходящих соединений в больших базах данных. Такие базы данных содержат структуры известных соединений (виртуальный скрининг). Другим подходом является анализ гипотетических структур молекул на основе литературных данных. Эти молекулы в теории могут обладать высоким сродством к определенным типам рецепторов. Это так называемые методы *de novo*. Их сущность заключается в подборе небольших фрагментов молекул с повышенной энергией связывания и минимальной энергией отталкивания в отношении активного центра рецептора. Путем постепенного присоединения фрагментов конструируется цельная молекула. Данный метод дает положительные результаты, но надежность оценки сродства не всегда высока. [10]. Несмотря на достигнутые успехи в применении методов, основанных на структуре мишени, в создании новых препаратов их использование ограничено: 1) необходимостью наличия информации о пространственной структуре макромолекул – мишени, которая доступна далеко не для всех белков, представляющих интерес в качестве фармакологических мишеней; 2) динамикой изменения пространственной структуры белков в ходе функционирования и, в частности, при образовании белок – белковых и белок – лигандных комплексов; 3) сложностями

определения биологически активной конформации для конформационно – гибких лигандов; 4) неоднозначностью выбора оценочной функции энергии связывания (scoring function). Поэтому до настоящего времени для оценки профилей (спектров) биологической активности, характеризующих комплексное действие органических соединений на биологические объекты, довольно часто используют методы, основанные на структуре лигандов. [2].

Применение метода, основанного на структуре мишени, можно разделить на несколько этапов. Для начала нужно оценить и проанализировать структуру белка – мишени и определить активные центры связывания с низкомолекулярными соединениями – лигандами. Лучшим вариантом является готовая структура мишени в комплексе с известным лигандом (конкурентный ингибитор или субстрат). При этом отсутствует необходимость определять место связывания самостоятельно, что может повлиять на точность расчетов. Существует два варианта определения активного центра, первый – это анализ всех полостей в структуре белка, причем с большей вероятностью объемная полость и будет являться активным центром. Вторым вариантом, более точным, это определение ключевых аминокислот, которые участвуют в ферментативном катализе. Необходимо также определить положение лиганда в активном центре рецептора, для этого можно выполнять докинг известных субстратов и/или ингибиторов по всей поверхности белка-мишени. [11].

1.1.3 Метод, основанный на структуре лиганда

В том случае, когда структура мишени неизвестна, применяются непрямые методы, основанные на строении лигандов. В данном случае за основу берется обучающая выборка из известных лигандов, проводится ее

анализ с учетом требуемой биологической активности. Первый этап – построение модели места связывания лиганда на основе физико-химических свойств соединений обучающей выборки. Такие модели бывают двух типов: фармакофорные модели и модели «псевдоресептора» [10]. Фармакофорная модель определяет минимально необходимые структурные характеристики, которыми должна обладать молекула для связывания с мишенью. При этом фармакофор представляет собой абстрактную концепцию, которая учитывает общие возможности молекулярного воздействия группы соединений в отношении их целевой структуры. Такая модель обладает определенными признаками, или фармакофорными центрами, которые отвечают за взаимосвязь структуры и активности. Различают следующие фармакофорные центры: гидрофобные области, ароматические циклы, доноры и акцепторы водородной связи, анионные и катионные центры. В построении фармакофорных моделей учитывается не только наличие или отсутствие определенных функциональных групп молекул, но и расстояние, на котором они расположены в пространстве друг относительно друга. Таким образом, модель биологической мишени может быть построена на основе физико – химических свойств соединения, и эта модель, в свою очередь, может быть использована для создания новых молекулярных объектов, которые взаимодействуют с мишенью [12].

Как сочетание фармакофорного моделирования и методов, основанных на структуре мишени, была введена модель «псевдоресептора», или ресепторное картирование. На основе предварительной модели фармакофора конструируют гипотетическую модель ресептора, состоящую из отдельных аминокислотных остатков, окружающих набор наложенных друг на друга структурных молекул лигандов. Расположение отдельных аминокислотных остатков определяется экспериментальными данными (например, при помощи сайт – направленного мутагенеза) [4]. Модели «псевдоресептора» описывают в основном геометрические формы и размер места связывания в мишени. Указанные модели позволяют провести поиск

новых лигандов в молекулярных базах данных. Модели «псевдоресептора» позволяют искать новые лиганды методом молекулярного докинга. Метод «псевдоресептора» предпочтителен в том случае, когда фармакофорная модель содержит относительно мало фармакофорных точек, что приводит к отбору слишком большого количества соединений для экспериментального тестирования [9].

Наиболее популярными подходами к поиску биологически активных соединений на основе строения лиганда является метод QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship). Метод QSAR используется для оптимизации структур базовых молекул и для предсказания активности отобранных соединений. В зависимости от цели исследования соответствующая биологическая активность измеряется экспериментально для ряда соединений, и эти данные служат зависимой переменной в моделировании QSAR. Как только молекулы выбраны для исследования, они моделируются *in silico*, а энергия минимизируется с помощью молекулярной механики или квантово-механических методов. Затем для массива молекул определяются соответствующие молекулярные дескрипторы, описывающие химические свойства молекул, необходимые для их биологической активности. Молекулярные дескрипторы могут быть как структурными, так и физико-химическими. Целью здесь является создание молекулярного «отпечатка» для каждой молекулы, который связан с ее активностью. Молекулярные дескрипторы затем используются для получения математического соотношения, которое может объяснить вариации биологической активности молекул [13]. Такие корреляционные уравнения дают возможность предсказывать активность новых аналогов из данного набора гомологов. Настоящее время активно применяются методы трехмерного QSAR (3D-QSAR), основанные на описании пространственного распределения свойств лигандов, например методы сравнительного анализа молекулярных полей (Comparative Molecular Field Analysis – CoMFA).[14] и сравнительного анализа подобия молекул (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis –

CoMSIA). [15]. Эти методы позволяют охарактеризовать области пространства вокруг молекул лигандов (стерические, электростатические, гидрофобные и другие свойства), определяющие взаимодействие макромолекулы-мишени с лигандами из данного набора [10].

1.2 GABA_A рецептор и его основные характеристики

Функция нервной системы регулируется балансом возбуждающих и тормозящих сигналов. ГАМК, GABA (gamma amino butyric acid, γ-аминомасляная кислота) является основным ингибирующим нейротрансмиттером в центральной нервной системе (ЦНС) и действует через рецепторы GABA_A, GABA_B и GABA_C. [16]. В организме ГАМК синтезируется из глутаминовой кислоты (он же – глутамат) с помощью фермента глутаматдекарбоксилазы (GAD) и в присутствии витамина B₆ в качестве кофактора. [17]. В качестве нейромедиатора ГАМК выполняет в первую очередь тормозящие функции. Активируя GABA_A –рецептор на поверхности клеточной мембраны, она открывает ионный канал, который пропускает ионы Cl⁻ внутрь клетки или выпускает ионы K⁺ из неё в межклеточное пространство. Оба этих действия ведут к гиперполяризации мембраны нейрона. Во время периода гиперполяризации, который длится всего несколько миллисекунд, невозможна генерация разности потенциалов между внешней и внутренней стороной мембраны нейрона, что ведёт к задержке в передаче нервного импульса. На уровне же организма это ведёт к задержке при реакции на внешние раздражители или стимулы. [18].

GABA_A относится к третьему классу рецепторов, сопряженных с G-белками, также его можно отнести к классу рецепторов, сходных по пространственному строению с никотиновым рецептором. Иногда их называют никотиноидными или цистеин-петельными. Они представляют собой интегрированные в клеточную мембрану пентамерные супермолекулярные структуры, формирующие ионный канал. Взаимодействие с молекулами агонистов приводит к изменению конформации рецептора и открытию ионного канала. Большое значение для исследования пространственной структуры представителей такого семейства рецепторов имеют результаты рентгенструктурного анализа (рисунок 6) ацетилхолин-связывающего белка и его комплексов с лигандами. С использованием этих структур в качестве шаблонов для методов

сравнительного моделирования построены молекулярные модели рецепторов GABA, осуществлен теоретический анализ взаимодействия рецепторов с молекулами агонистов, а также предложен механизм активации рецепторов.

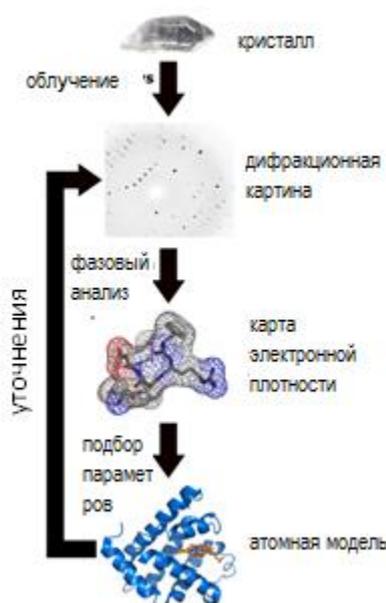


Рисунок 6 Процесс расшифровки структуры молекулы методом рентгеноструктурного анализа. [19].

GABA_A и GABA_C являются ионотропными (бикукуллин и пикротоксин – чувствительные), GABA_B – метаботропным (баклофен-чувствительный) рецептором. Стоит отметить, что GABA_A и GABA_C рецепторы иногда объединяются в одну группу. [18]

GABA_A представляет из себя сложный комплекс, состоящий из 19 субъединиц: 6 типов α -субъединиц, 3 типа β -субъединиц, 3 типа γ -субъединиц, δ , ϵ , π и θ субъединицы, а также 3 типа ρ -субъединиц (Рисунок 7). [20].

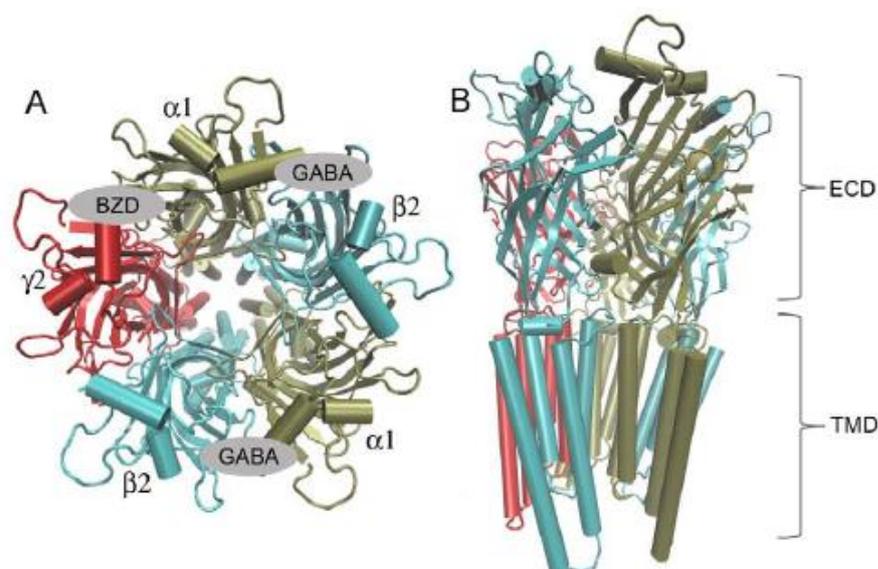


Рисунок 7 Структурная композиция GABA_A рецептора: А – вид сверху, показывающий пентамерную сборку $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$ и В – вид сбоку, иллюстрирующий внеклеточный домен (ECD), в котором связываются агонисты и бензодиазепины, и трансмембранный домен (TMD) [30]

Функции каждой субъединицы, входящей в состав рецептора, описывают благодаря возможности секвенирования. Различные ошибки и/или мутации могут повлиять на экспрессию гена и, в свою очередь, нарушить функциональность рецептора Таблица 1.

Таблица 1. Субъединицы GABA_A рецептора и кодирующие их гены [21]

Субъединицы ГАМКА рецептора		
Субъединица	Кодирующий ген	Функции и связанные патологии
Альфа-1 ($\alpha 1$)	GABRA1	Белок GABRA1, для того, чтобы стать активным, должен быть фосфорилирован. Интересно, что фосфорилирование в этом случае является гликолиз-зависимым, так как, помимо киназ, в этом процессе задействована глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Соответственно уровень

Продолжение таблицы 1.2.1

		<p>фосфорилирования альфа-1 субъединиц коррелирует с уровнем потребления глюкозы клеткой. Нарушения процесса фосфорилирования альфа-1 субъединицы связаны с такими заболеваниями, как ювенильная миоклоническая эпилепсия – в образцах коры головного мозга людей, страдавших этим заболеванием, этот белок являлся менее фосфорилированным, чем у здоровых.</p>
<p>Альфа-2 ($\alpha 2$)</p>	<p>GABRA2</p>	<p>Мутации в гене GABRA2 имеют положительную корреляцию с вероятностью развития алкоголизма. Также альфа-2 субъединица интересна тем, что лиганды ГАВАа рецептора, осуществляющие своё связывание преимущественно через эту субъединицу (пример- L-838,417), показали способность купировать нейропатическую боль, либо боль вследствие воспаления, не оказывая побочных эффектов в виде седации, что присуще лигандам, связывающимся через альфа-1 субъединицу.</p>
<p>Альфа-3 ($\alpha 3$)</p>	<p>GABRA3</p>	<p>Мутации гена GABRA3 связаны с развитием рака лёгких и гепатоцеллюлярной карциномы. Также альфа-3 субъединица является мишенью для ГАМК-эргических анальгетиков (таких как L- 838,417, связывающийся также и с альфа-2 субъединицей).</p>

Продолжение таблицы 1.2.1

<p>Альфа-4 ($\alpha 4$)</p>	<p>GABRA4</p>	<p>Рецепторы, содержащие альфа-4 субъединицу, являются нечувствительными к 1,4-бензодиазепинам.</p>
<p>Альфа-5 ($\alpha 5$)</p>	<p>GABRA5</p>	<p>У некоторых людей обнаруживается полная или частичная дупликация гена GABRA5. Он расположен на длинном плече 15 хромосомы, в регионе, который обычно подвергается делеции при синдромах Ангельмана и Прадера-Вилли. Антагонисты ГАМК-рецепторов, содержащих альфа-5 субъединицу, в настоящее время проходят испытание для коррекции когнитивных нарушений при синдроме Дауна. (напр. RO5186582, он же Басмисанил)</p>
<p>Альфа-6 ($\alpha 6$)</p>	<p>GABRA6</p>	<p>Как и альфа-4, эта субъединица не связывает классические 1,4- бензодиазепины. Рецепторы, содержащие альфа-6 субъединицу, находятся главным образом в мозжечке, где участвуют в процессах координации движений. Также интересно, что уровни экспрессии генов GABRA6 и GABRD (дельта субъединица) каким-то образом взаимосвязаны: при снижении экспрессии GABRA6 наблюдается и снижение экспрессии GABRAD.</p>
<p>Бета-1 ($\beta 1$)</p>	<p>GABRB1</p>	<p>При шизофрении, биполярном расстройстве и большом депрессивном расстройстве наблюдается изменение экспрессии гена GABRB1 в боковых участках мозжечка.</p>

Продолжение таблицы 1.2.1

		Также мутации этого гена связаны с большей вероятностью развития алкоголизма.
Бета-2 ($\beta 2$)	GABRB2	Мутации этого гена связаны с риском развития шизофрении и когнитивными нарушениями, при ней возникающими. Также в некоторых исследованиях установлена связь между мутациями GABRB2 и риском развития диссоциального расстройства личности.
Бета-3 ($\beta 3$)	GABRB3	Как и GABRA5, ген GABRB3 расположен на длинном плече 15 хромосомы и утрачивается при синдромах Ангельмана и Прадера-Вилли. Сниженная экспрессия гена GABRB3 наблюдается при аутизме.
Гамма-1 ($\gamma 1$)	GABRG1	Оба гена GABRG1 и GABRG2 кодируют гамма-субъединицы ГАМК-рецептора, которые ответственны (наряду с определёнными вариантами альфа-субъединиц) за связывание с бензодиазепинами.
Гамма-2 ($\gamma 2$)	GABRG2	Полиморфизмы в гене GABRG2 связаны со сниженным порогом судорожной готовности и сниженной чувствительностью к аллостерической регуляции GABA _A рецептора ионами цинка. Также гамма-2 субъединица взаимодействует с белком GABARAP (белок, связывающийся с GABA _A рецептором), который в свою очередь также регулирует процессы аутофагии.

Продолжение таблицы 1.2.1

Гамма-3 ($\gamma 3$)	GABRG3	Участвует в аллостерической регуляции активности GABA _A рецептора ионами цинка. Также мутации в нём могут быть ещё одним маркером предрасположенности к алкоголизму.
Дельта (δ)	GABRD	Мутации в этом гене играют роль в вероятности развития эпилепсии. Также GABRD связаны с ранним дебютированием психических заболеваний. Путём альтернативного сплайсинга и посттрансляционной модификации получают три типа дельта-субъединицы – 1A, 1B и 1C.
Эпсилон (ϵ)	GABRE	Во время беременности в регионах продолговатого мозга, ответственных за дыхание, наблюдается увеличение ГАМК-рецепторов с эпсилон-субъединицей. Также гиперметилирование гена GABRE наблюдается при раке простаты, и в настоящее время выдвинуто предложение по использованию этого генетического маркера для диагностики и прогноза при лечении этого типа рака.
Пи (π)	GABRP	Наибольшая экспрессия гена GABRP наблюдается в матке. ГАМК-рецепторы, содержащие пи-субъединицу, являются чувствительными к стероидным гормонам: нейростероидам (в случае ЦНС) и эстрогенам с андрогенами (ткани вне ЦНС).

Продолжение таблицы 1.2.1

Тета (θ)	GABRQ	Предположительно, мутации в GABRQ связаны с ранним паркинсонизмом. Также повышенная экспрессия GABRQ обнаруживается в клетках гепатоцеллюлярной карциномы – для опухолевых клеток, в которых присутствует данная мутация, ГАМК является стимулятором опухолевого роста. Иногда мутации GABRQ обнаруживаются при аутизме.
Ро (ρ_1)	GABRR1	Мутации в гене субъединицы связаны с риском развития.
Ро (ρ_2)	GABRR2	Так же, как и в GABRR1, мутации GABRR2 способны повышать риск развития пигментного ретинита. Имеются статистические данные, доказывающие связь между мутацией этого гена и вероятностью развития алкогольной зависимости.
Ро (ρ_3)	GABRR3	У некоторых людей присутствует SNP мутация, делающая данную субъединицу неактивной – тимин в 732 позиции гена GABRR3 заменяется на аденин, в результате чего кодон ТА(Т) превращается в ТА(А). В результате чего при трансляции происходит обрыв синтеза белка, т.к. ТАА является стоп-кодоном. Ген GABRR3, в отличие от GABRR1 и 2, которые расположены на длинном плече 6 хромосомы, располагается на длинном плече 3 хромосомы (3q11-q13).

Субъединицы рецептора имеют гомологию исходных аминокислотных последовательностей и структурную гомологию. В свою очередь каждая субъединица имеет основной домен, которая содержит более 200 аминокислотных остатков с N-концом, также 4 гидрофобных трансмембранных домена М1-М4 и короткий внеклеточный С-концевой домен. N-конец содержит консервативный мотив – цистеиновую петлю. Сайт связывания лигандов образуется на стыке двух N-концевых внеклеточных доменов соседних субъединиц. [22].

Что отличает ГАВАа рецептор от других мембранных белков с Cys – петлей это его фармакология, которую можно объяснить большим количеством «карманов» во внутримембранном пространстве. [20].

Как считалось ранее, ГАВАа рецептор имеет 5 сайтов связывания, среди которых участок, с которым связывается ГАМК и его специфические агонисты. Второй участок связывания ГАВАа –рецептора – БДЗ-сайт. Третий участок связывания ГАВАа-рецептора – Пикротоксиновый сайт, с которым соединяются конвульсанты. Четвертый участок связывания ГАВАа –рецептора – барбитуратный сайт. Пятый сайт связывания ГАВАа-рецептора – нейростероидный. [23].

Механизм связывания соединений – лигандов с рецептором во всех сайтах связывания происходит следующим путем. Первым этапом агонист связывается с сайтом связывания, затем следуют конформационные изменения, которые запирают лиганд в «кармане» рецептора. Белок изменяет конформацию и превращается в один или несколько закрытых состояний, которые были названы “flipped states”. В дальнейшем конформационные изменения приводят к открытию ионной поры. Затем открытый канал связывается с лигандом и переходит в закрытое состояние.

Как и многие другие рецепторы, ГАВАа рецептор подвергается посттрансляционным модификациям. Было показано, что несколько различных протеинкиназ фосфорилируют специфические аминокислотные

остатки на специфических рецепторных субъединицах и тем самым модулируют активность каналов. Также было показано, что эта модификация влияет на стабильность поверхности или процессинг белка. [24].

1.3 Характеристика агонистов ГАВАа рецептора

Вещество, потенциальное лекарственное средство, из-за своих особенностей может взаимодействовать не с самим рецептором, а с участком клеточной мембраны, которая к нему прилегает. В данном случае не происходит, ни возбуждения, ни блокирования рецептора, в этом случае говорят об аллостерическом воздействии. В результате чего происходит изменение как структуры прилежащей к рецептору мембраны, так и отдельных компонентов самого рецептора, что влияет на чувствительность рецептора к биологически активным веществам.

Такой механизм не влияет на передачу нервного импульса, но при этом происходит видоизменение в желаемом направлении процесса передачи под воздействием лекарственного средства. Такой механизм характерен для транквилизаторов. Транквилизаторы по химической структуре являются производными бензодиазепа, который является аллостерическим модулятором бензодиазепинового сайта связывания ГАВАа рецептора. Клинически это проявляется устранением таких расстройств, как чувство беспокойства, тревоги, страха и т.д. [25].

Характерными агонистами и антагонистами для ГАВАа являются: ГАМК, габоксадол (ТНП), изогувасцин, мусцимол и конкурентный антагонист бикикулин, изоникотическая кислота, БДЗ-агонисты: диазепам, клоназепам и его антагонисты: флумазенил [18], пентилентетразол (ПТЗ), пентобарбитал и фенобарбитал. [23].

Аллостерические модуляторы ГАВАа рецептора, проникающие через гематоэнцефалический барьер, применяются в лечении нервно-психических заболеваний. Мусцимол обладает такой способностью, недостатком его является высокая токсичность. ТНП и прогабид используется при лечении

заболеваний ЦНС. Баклофен применяется в качестве ненаркотического анальгетика.

Еще с 70 гг. XX века известна активность бензодиазепинов и то, что она реализуется через систему главного тормозного медиатора центральной нервной системы – γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Лиганды БДЗ сайта часто применяются в качестве психотропных препаратов, они обладают анксиолитическими, противосудорожными, снотворными, седативными и миорелаксантами свойствами, выраженными в различной степени в зависимости от их структуры. [26].

В 80-х годах прошлого века рецепторы GABA_A были впервые исследованы в качестве мишени для действия алкоголя. Было показано, что интоксикационные концентрации этанола усиливают функцию GABA_A рецепторов. [27]. Впоследствии была обнаружена способность некоторых препаратов, модулировать эффекты этанола. В связи с этим можно сделать вывод о потенциальной возможности их использования для купирования алкогольной зависимости. Такие препараты способны уменьшить синдром абстиненции при резком прекращении приема алкоголя. Также известны препараты миметического действия, которые имеют возможность полностью заменить алкоголь при комплексном их применении в борьбе с алкогольной зависимостью: диазепам, пентобарбитал, некоторые нейростероиды, оксипутират натрия, дизоцилпин и др. [28].

2 Объекты и методы исследования

Объектом исследования являются производные карбамида и барбитуровой кислоты – лиганды GABA_A рецептора.

Для достижения цели исследования необходимо решить следующие задачи:

1. Построить электронные модели молекул-лигандов, обладающих потенциальной активностью взаимодействия с GABA_A рецептором
2. Изучить механизм взаимодействия лигандов с рецептором при помощи молекулярного докинга
3. Построить SAR и QSAR-модели для лигандов GABA_A рецептора, объясняющие активность структур на качественном количественном уровнях

2.1 Молекулярный докинг

Для определения наиболее достоверной ориентации и конформации лиганда в центре связывания белка-мишени нами проводился молекулярный докинг лигандов. При этом учитывалась конформационная лабильность лиганда, а также подвижность боковых цепей аминокислотных остатков внутри активного центра.

Для молекулярного докинга использовали модели гетеропентамера GABA_A, характеризующиеся высокой точностью и оптимизированные для оценки взаимодействия лигандов с бензодиазепиновым сайтом GABA_A [16]. Обе модели представлены в общем доступе на сайте Protein Data Bank. [29]. Модель 1 была получена на основе структуры глутамат – закрытого ионного канала (GluCl) сокристаллизованной с глутаматом (PDB ID: 3RIF). Данная модель получена методом рентгено-структурного анализа. Гомологическое моделирование проводилось при помощи программы MODELLER 9v7 с использованием «automodel class», которое не включает никаких других ограничений, кроме пространственных. Таким образом, было сгенерировано 100 моделей, окончательный выбор модели был выполнен в соответствии с консенсусным подходом, описанным Sander et al., при помощи программы

ProSA с z-оценкой. Ключевыми аминокислотами, согласно данной модели, являются: α_1 F99, α_1 H101, α_1 Y159, α_1 G200, α_1 V202, α_1 T206, α_1 G207, α_1 Y209, γ_2 F77, γ_2 M130, α_1 G157, α_1 Y159, α_1 V202, α_1 S205, α_1 S206, α_1 V211. [30].

Модель 2 получена при помощи криоэлектронной микроскопии высокого разрешения. Преимуществом данного метода перед рентгеноструктурным анализом является большее функциональное соответствие конформации образца, т.к. не требуется его кристаллизация. Структура построена на основе каждой отдельной субъединицы рецептора с использованием кристаллической модели β_3 -гомопентамерного рецептора GABA_A (PDB ID: 4COF) с помощью сервера Swiss-Model. Данная модель (PDB ID: 6dbu) находится в комплексе с известным антагонистом GABA_A флумазенилом, который позволил определить расположение и взаимодействие атомов в бензодиазепиновом кармане.

Докинг предварительно оптимизированных лигандов проводился в программе Maestro программного пакета Schrödinger (Glide) в режиме Glide Induced Fit Docking, учитывающем подвижность боковых цепей рецептора, с использованием высокоточной Extra Precision оценочной функции для энергии взаимодействия (Glide, version 6.7, Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2015). Оптимизацию структур лигандов проводили в программе Chem3D (ChemBio Office, CambridgeSoft, US), сохранили в формате Tripos MOL2 (Tripos, St. Louis, MO) и импортировали в Maestro. При этом были использованы следующие опции программы: “Use input partial charges”, “reward intramolecular hydrogen bonds”. Остальные опции программы были установлены по умолчанию. Полученные после оптимизации позы лигандов были сохранены вместе с конфигурациями подвижных боковых цепей.

Ранее на кафедре БИОХ ТПУ был исследован широкий ряд производных бензгидрилмочевины, мочевины и барбитуровой кислоты (Таблица Б.1) с известными показателями активности: ЭД50 и порог коразоловых судорог, многие из которых обладают противосудорожной

активностью. [31]. Полученный массив экспериментальных данных использовался нами для проведения молекулярного моделирования.

4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

Данный раздел представляет собой анализ финансового менеджмента, ресурсоэффективности и ресурсосбережения разработки в рамках магистерской диссертации на тему: Изучение взаимодействия производных карбамида и барбитуровой кислоты с GABA_A рецептором. Производные карбамида и барбитуровой кислоты являются агонистами GABA_A рецептора следовательно имеется потенциал производства лекарственных препаратов для лечения когнитивных дисфункций и обладающих антиалкогольным действием.

Целью раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» является определение перспективности и успешности исследования, оценка его эффективности, уровня возможных рисков, разработка механизма управления ходом исследования и сопровождения конкретных проектных решений на этапе реализации.

Для достижения обозначенной цели необходимо решить следующие задачи:

- оценить коммерческий и инновационный потенциал исследования;
- осуществить планирование этапов выполнения исследования;
- рассчитать бюджет проекта;
- произвести оценку ресурсной, финансовой и экономической эффективности исследования.

4.1 Оценка коммерческого и инновационного потенциала НИИ

Потенциальные потребители результатов исследования

Потенциальными потребителями исследования являются научные группы и компании, занимающиеся разработкой и созданием новых лекарственных препаратов.

Следовательно, рынок можно сегментировать по размеру компании-производителя и целевому направлению по фармакологическому действию производимой продукции Рисунок 12.

		Фармакологическое действие		
		Когнитивная дисфункция	Антиконвульсанты	Лекарства с антиалкогольным действием
Размер компании	Крупные			
	Средние			
	Мелкие			

Рисунок 12 Карта сегментирования рынка услуг по разработке лекарственных препаратов:

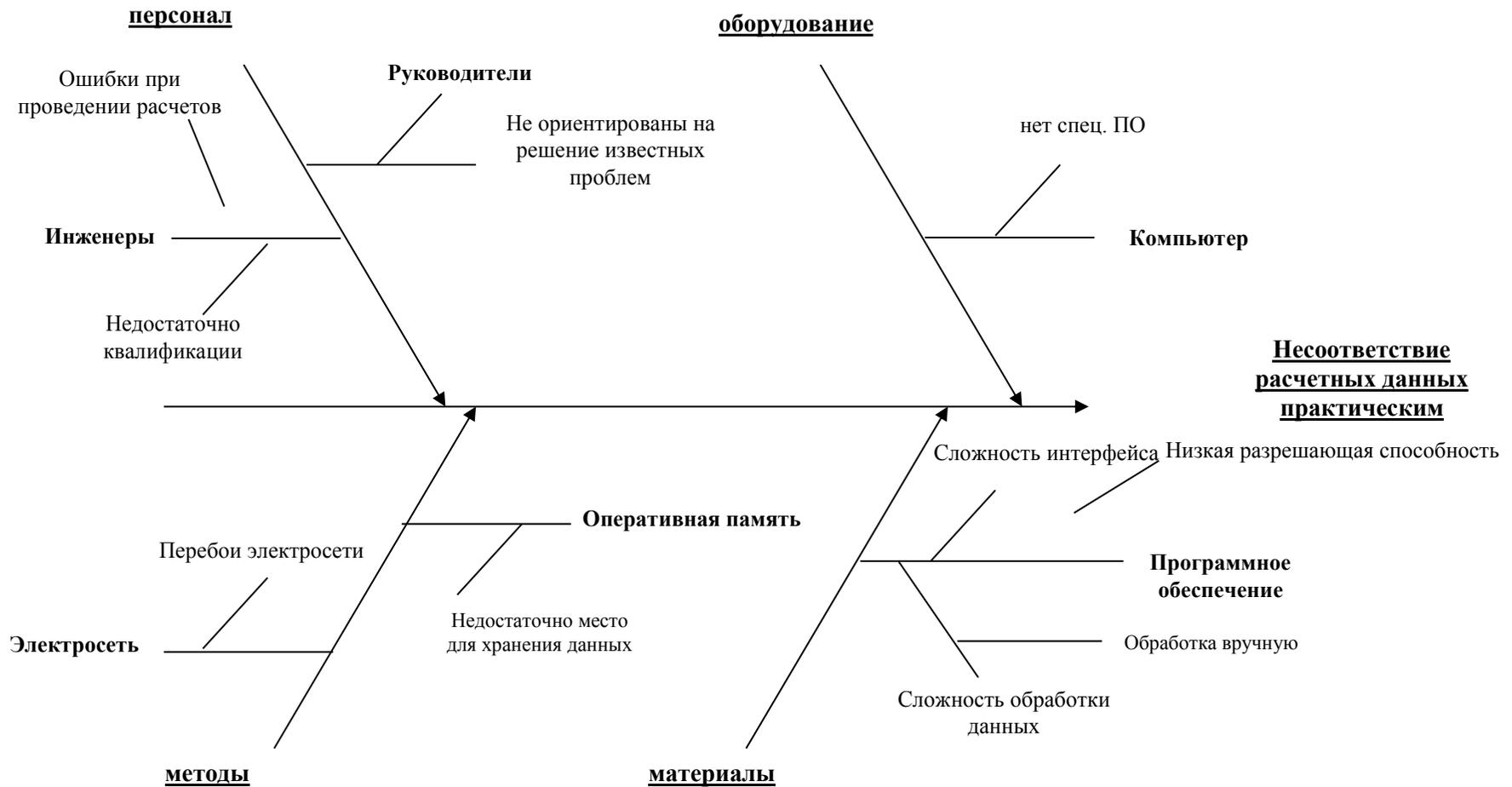
Фирма А - Фирма Б- Фирма В -

Диаграмма Исикавы

Диаграмма причины-следствия Исикавы (Cause-and-Effect-Diagram) – это графический метод анализа и формирования причинно-следственных связей, инструментальное средство для систематического определения причин проблемы и последующего графического представления.

С помощью данной диаграммы были рассмотрены все факторы исследовательской работы Рисунок 13.

Рисунок 13 Диаграмма Исикавы



Оценка готовности проекта к коммерциализации

Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации представлен в Таблице 4.

Таблица 4 Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	5	5
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	5	4
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	4	3
4.	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	5	4
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	4	3
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	5	4
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	2	2
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	5	4
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	5	4
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	3	2
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	5	5
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	4	3

Продолжение таблицы 4.1.4

14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	5
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	5	5
	ИТОГО БАЛЛОВ	65	56

Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

Для коммерциализации результатов научно-технического исследования можно использовать торговлю патентными лицензиями, то есть, это продажа разработки исследования третьим лицам.

Использование торговли патентными лицензиями, приведет нас к сотрудничеству с зарубежными странами, что повысит эффективность исследования и будет осуществляться технологический и научно-технический обмен, обмен опытом работы. При технологическом обмене происходит экономическое развитие страны и происходит развитие международных экономических отношений.

4.2 Инициация проекта

Инициация проекта определяет изначальные цели проекта или содержание работы. Также, в данном разделе определяются изначальные экономические – финансовые затраты. По данной работе также надо определить внутренние и внешние заинтересованные стороны проекта, которые влияют на общий результат научного проекта. Для этого научного проекта тоже имеются заинтересованные группы (Таблица 5). Ниже указаны, изначальные цели и результат проекта (Таблица 6), рабочая группа данного проекта (Таблица 7) приведены ниже:

Таблица 5 Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Научный руководитель	Изучить взаимодействие производных карбамида и барбитуровой кислоты с GABAa рецептором
Магистрант	

Таблица 6 Цели и результат проекта

Цели проекта:	Изучить взаимодействие производных карбамида и барбитуровой кислоты с GABAa рецептором
Ожидаемые результаты проекта:	Данные о биологической активности производных карбамида и барбитуровой кислоты на основе их связывания GABAa рецептором
Критерии приемки результата проекта:	Результаты докинга и модель QSAR
Требования к результату проекта:	Требование:
	Точность проведение анализа докинга
	Статистически достоверные результаты

Организационная структура проекта

Таблица 7 Рабочая группа проекта

№ п / п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудовые затраты, час.
1	Хлебников Андрей Иванович, д.х.н. профессор	Научный руководитель	Осуществляет детальное планирование проекта; информацию для создания и актуализации планов работ; контролирует сроки выполнения работ по проекту	168
2	Иманкулова Евгения Анатольевна, магистрант	Исполнитель	Выполняет проект	515
3	Креницына Зоя Васильевна, к.т.н., доцент	Консультант раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»	Оказание методической помощи при работе над разделом «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение» в магистерской диссертации	12
4	Романова Светлана Владимировна, старший преподаватель	Консультант раздела «Социальная ответственность»	Оказание методической помощи при работе над разделом «Социальная ответственность»	12

Продолжение таблицы 4.2.7

5	Аксёнова Наталия Валерьевна, к.ф.н. доцент	Консультант – лингвист	Оказание методической помощи при работе над переводом одной из глав магистерской диссертации на иностранный язык	13,5
ИТОГО:				720,5

Ограничения и допущения проекта.

Ограничения проекта – это все факторы, которые могут послужить ограничением степени свободы участников команды проекта, а так же «границы проекта» - параметры проекта или его продукта, которые не будут реализованных в рамках данного проекта Таблица 8.

Таблица 8 Ограничения и допущения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
3.1. Бюджет проекта	128480 руб.
3.1.1. Источник финансирования	Государственный грант
3.2. Сроки проекта:	04.02.2019-05.06.2019
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	04.02.2019
3.2.2. Дата завершения проекта	03.06.2019
3.3. Прочие ограничения и допущения*	Не имеются

Таким образом, мы определили в рамках инициации проекта изначальные цели и финансовые ресурсы, заинтересованные стороны проекта, действия которых направлены на достижение общего результата. Также провели анализ всех ограничительных факторов проекта.

4.3 Планирование управления научно-техническим проектом

Планирование научного проекта состоит из процессов определения цели работы, разработка последовательности действий и общего содержания работы требуемых для достижения определенных целей. Определены контрольные события проекта Таблица 9. Для визуализации плана проведения научных работ была составлена иерархическая структура Рисунок 14.

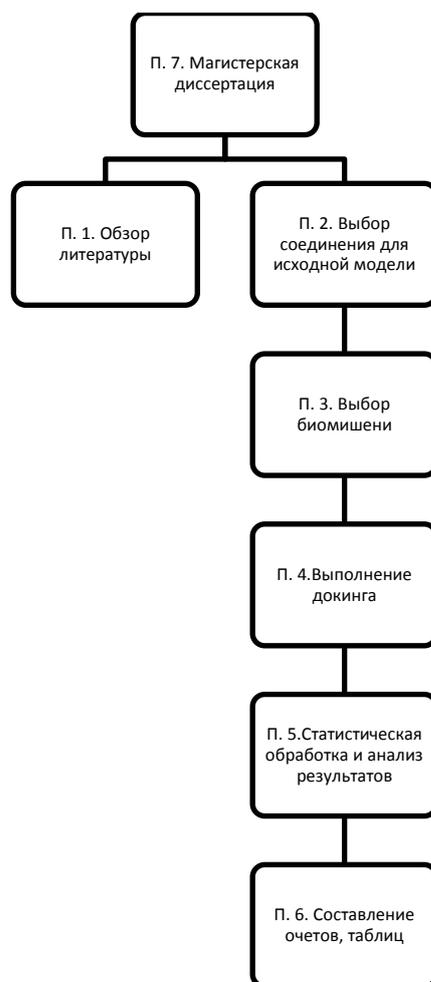


Рисунок 14 Иерархическая структура работ проекта

Таблица 9 Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Изучение литературных источников	04.02.2019 – 04.03.2019	Литературный обзор
2	Проведение подготовительных работ	05.03.2019 – 20.04.2019	Выбор и оптимизация моделей лигандов. Поиск биомишени. Составление QSAR. Проведение докинга, результатом которого являются сводные таблицы.
3	Написание магистерской диссертации	21.04.2019 – 03.06.2019	Магистерская диссертация

Для планирования научного проекта необходимо построить календарный план проекта. Календарный план данного проекта отображен в таблице 10, на основе таблицы 10 строится диаграмма Ганта Таблица 11. Она используется для иллюстрации календарного плана проекта, на котором работы по теме

представляются протяженными во времени отрезками, характеризующимися датами начала и окончания выполнения данных работ.

План проекта

Таблица 10 Календарный план проекта

Код работ ы (из ИСП)	Название	Длитель ность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников (ФИО ответственны х исполнителей)
П. 1	Обзор литературы	24	04.02.2019	04.03.2019	Иманкулова Е. А.
П. 2	Выбор и оптимизация соединений для модели	14	05.03.2019	10.03.2019	Иманкулова Е. А., Хлебников А. И.
П. 3	Выбор биомишени	14	11.03.2019	24.03.2019	Хлебников А. И.
П. 4	Выполнение процедуры докинга	14	25.03.2019	07.04.2019	Иманкулова Е. А.
П. 5	Статистическа я обработка и анализ результатов	14	08.04.2019	21.04.2019	Иманкулова Е. А., Хлебников А. И.
П. 6	Составление отчетов и таблиц	42	22.04.2019	03.06.2019	Иманкулова Е. А.
П. 7	Защита магистерской диссертации	1	14.06.2019	14.06.2019	Иманкулова Е. А.
И т о г о:		120			

Таблица 11 Календарный план-график проведения НИОКР по теме

Код работы (из ИСР)	Вид работ	Исполнители	Т _к , кал, дн.	Продолжительность выполнения работ														
				февр.			Март			апрель			май			июнь		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	
П. 1	Обзор литературы	Инженер (магистрант)	24	■														
П. 2	Выбор и оптимизация соединений для модели	Руководитель, инженер (магистрант)	14				▨											
П. 3	Выбор биомишени	Руководитель	14				▨											
П. 4	Выполнение процедуры докинга	Инженер (магистрант)	14					■	■									
П. 5	Статистическая обработка и анализ результатов	Руководитель, инженер (магистрант)	14						■	■	■	▨						
П. 6	Составление отчетов и таблиц	Инженер (магистрант)	42								■	■						
П. 7	Защита магистерской диссертации	Инженер (магистрант)	1										■					

▨ – руководитель

■ – инженер

Составление сетевого план-графика основывается на методе критического пути. Критический путь представляет собой полный путь, имеющий наибольшую продолжительность. Метод критического пути дает возможность варьировать сроками выполнения работ, не лежащими на критическом пути.

Сетевой график строится в виде диаграммы предшествования, которая представлена на рисунке 15, основанной на параметрах сетевого графика Таблица 11.

Расчет сетевого графика ведется в двух направлениях: прямом и обратном.

Прямой проход по сети

Раннее начало каждой работы:

$$t_{\text{рн}}(j) = \max[t_{\text{рн}}(i) + T(i)]$$

где $t_{\text{рн}}(j)$ – раннее начало последующей работы;

$t_{\text{рн}}(i)$ – раннее начало предшествующей работы;

$T(i)$ – продолжительность выполнения i -ой работы в календарных.

5. Раннее окончание каждой работы:

$$t_{\text{ро}}(i) = t_{\text{рн}}(i) + T(i)$$

Обратный проход по сети

Позднее начало каждой работы можно определить, двигаясь по графику справа налево.

$$t_{\text{пн}}(i) = \min t_{\text{пн}}(j) - T(i)$$

где $t_{\text{пн}}(i)$ – позднее начало i -ой работы;

$\min t_{\text{пн}}(j)$ – минимальная величина позднего начала j -ой работы;

$T(i)$ – продолжительность выполнения i -ой работы в календарных днях.

Позднее окончание работы рассчитывается с учетом точки «схождения» нескольких работ по следующей формуле:

$$t_{\text{по}}(i) = \min t_{\text{пн}}(j)$$

где $t_{по}(i)$ – позднее окончание i -ой работы;

$\min t_{пн}(j)$ – минимальная величина позднего начала работ, приходящихся на точку «схождения» i -ой работе.

Таблица 11 Параметры сетевого графика

Название работы	№ раб.	$T_{\text{кал}}$	$t_{\text{рн}}$	$t_{\text{ро}}$	$t_{\text{пн}}$	$t_{\text{по}}$	$R_{\text{п}}$	$R_{\text{с}}$
Обзор литературы	1	24	0	24	0	24	0	0
Выбор и оптимизация соединений для модели	2	14	24	38	24	38	0	0
Выбор биомишени	3	14	38	52	38	52	0	0
Выполнение процедуры докинга	4	14	52	66	52	66	0	0
Статистическая обработка и анализ результатов	5	14	66	80	66	80	0	0
Составление отчетов и таблиц	6	42	80	122	80	122	0	0
Защита магистерской диссертации	7	1	122	123	122	123	0	0
	i	120	123					

Резерв времени полного пути $R(L_{\text{п}})$ 0

Критический путь $T_{\text{кр}}$ 123

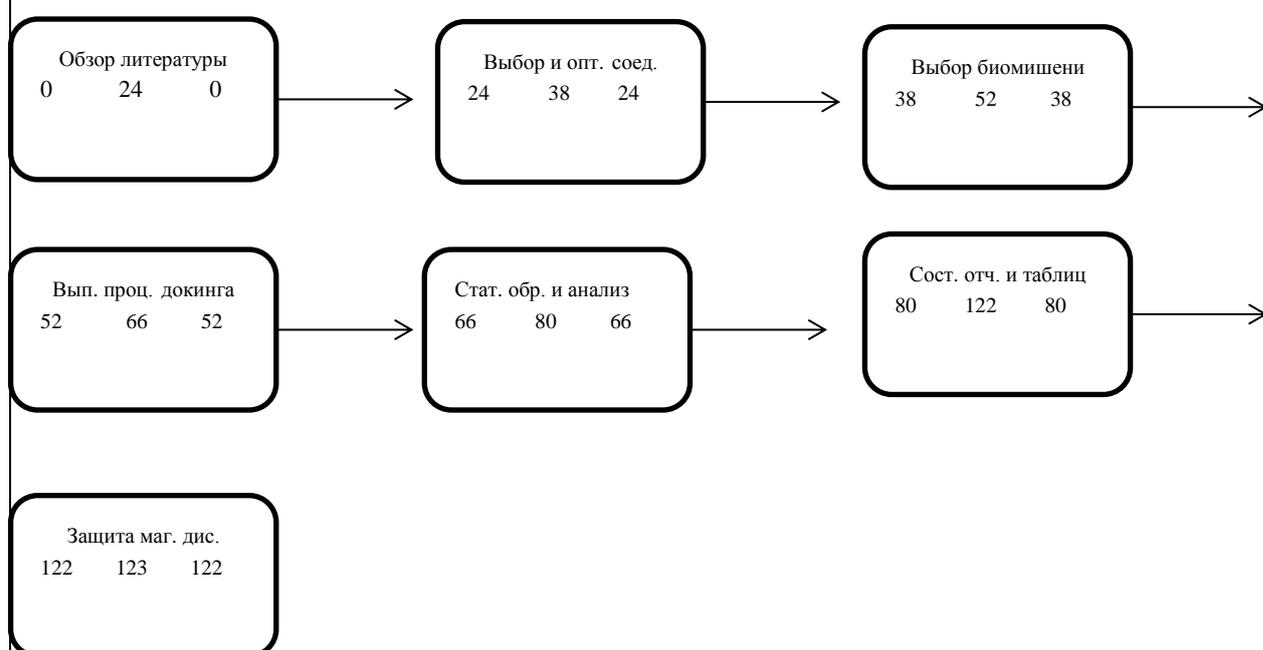


Рисунок 15 Сетевой план-график выполнения НИР

Бюджет научного исследования

При планировании бюджета научного исследования должно быть обеспечено полное и достоверное отражение всех видов планируемых расходов, необходимых для его выполнения. Таблица 12.

Таблица 12 Группировка затрат по статьям в рублях

Вид работ	Статьи						
	Сырье, материалы (за вычетом возвратных отходов), покупные изделия и полуфабрикаты	Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	Основная заработная плата	Дополнительная заработная плата	Отчисления на социальные нужды	Накладные расходы	Итого плановая себестоимость
1.	908,3	242400	190903,2	28635,5	59495	130821,4	653263,4

Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов)

В этом разделе включаются затраты на материалы, комплектующих и изделий, необходимых для выполнения работы Таблица 12.

Таблица 13 Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

Наименование	Кол-во	Цена за единицу, руб.	Сумма, руб.
Ручка шариковая	5	25	125
Бумага для принтера (формата А4 500 листов)	1	190	190
Краска для принтера (сменный картридж)	1	550	550
Всего за материалы			865
Транспортно-заготовительные расходы (3-5%)			43,3
Итого по статье C_m			908,3

Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

В данную статью включают все затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, контрольно-измерительной аппаратуры, стендов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по конкретной теме Таблица 14.

Таблица 14 Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, тыс.руб.	Срок службы, лет	АО за период проведения НИР, тыс. руб	Затраты на доставку и монтаж, тыс.руб	Общая стоимость оборудования, тыс.руб.
1.	Персональный компьютер	1	38,721	7	2,49	44,53	85,5
2.	Принтер	1	4,358	5	0,39	5,01	9,8
3.	Программное обеспечение Schrodinger	1	127,900	-	-	19,19	147,1

Основная заработная плата

В данном заголовке включены основная заработная плата (Таблица 15) научных и инженерно-технических работников, которые участвуют в выполнении работы по магистерской теме. Расходы по заработной плате определяется исходя из трудоемкости выполняемых работ и действующей системы оплаты труда.

Таблица 15 Расчет основной заработной платы

№ п/п	Наименование этапов	Исполнители по категориям	Трудоемкость, чел.-дн.	Заработная плата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс.руб.	Всего заработная плата по тарифу (окладам), тыс. руб.
1	Выбор соединений для модели	Хлебников А.И	12	2,0412	84,5057
2	Выбор биомишени	Хлебников А.И	12		
3	Статистическая обработка и анализ результатов	Хлебников А.И	12		

Продолжение таблицы 4.3.15

1	Обзор литературы	Иманкулова Е. А.	30	1,14	135,033
2	Выбор соединений для модели	Иманкулова Е. А.	12		
3	Статистическая обработка и анализ результатов	Иманкулова Е. А.	12		
4	Выполнение процедуры докинга	Иманкулова Е. А.	12		
5	Составление отчетов и таблиц	Иманкулова Е. А.	36		
6	Защита магистерской диссертации	Иманкулова Е. А.	1		
Итого: 134,6558					

Месячный должностной оклад работника

$$З_m = З_б * k_p$$

где $З_б$ – базовый оклад, руб.;

k_p – районный коэффициент, равный 1,3.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$З_{дн} = \frac{З_m \cdot M}{F_d},$$

где $З_m$ – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. Дн. (таблица 14).

Базовый оклад $З_б$ такого руководителя, как д.х.н. профессор, составляет 33162,87 руб. Рассчитываем месячный должностной оклад руководителя:

$$З_m = 33162,87 * 1,3 = 43111,73 \text{ руб.}$$

Среднедневная ЗП руководителя:

$$Z_{\text{дн.}} = 43111,73 \cdot 10,4 / 251 = 1786,3 \text{ руб.}$$

Базовый оклад Z_b инженера, как 4 ур. ПКГ специалистов составляет 12684,03 руб. Рассчитываем месячный должностной оклад инженера:

$$Z_{\text{м.}} = 12684,03 \cdot 1,3 = 16489,239 \text{ руб.}$$

Среднедневная ЗП инженера:

$$Z_{\text{дн.}} = 16489,239 \cdot 10,4 / 188 = 683,3 \text{ руб.}$$

Расчёт основной заработной платы приведён в таблице 16.

Таблица 16 Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Магистрант
Число дней (календарное)	365	365
Число дней(нерабочих)		
- выходные	44	48
- праздничные дни	14	14
Потери рабочего времени		
- отпуск или невыходы по болезни	56	28
Действительный годовой фонд рабочего времени	251	275

Таблица 15 Расчёт основной заработной платы

Исполнители	Z_b , руб.	$k_{\text{пр}}$	$k_{\text{д}}$	$k_{\text{р}}$	$Z_{\text{м.}}$, руб	$Z_{\text{дн.}}$, руб.	$T_{\text{р.}}$, раб. Дн.	$Z_{\text{осн.}}$, руб.
Руководитель	47104	0	0	1,3	61235,2	2041,2	36	73483,2
Инженер	26300	0	0	1,3	34190	1140	103	117420

Дополнительная заработная плата рассчитывается исходя из 10-15% от основной заработной платы, работников, непосредственно участвующих в выполнении темы:

$$Z_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot Z_{\text{осн}}$$

где $Z_{\text{доп}}$ – дополнительная заработная плата, руб.;

$k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной зарплаты;

$Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата, руб.

В таблице 17 приведена форма расчёта основной и дополнительной заработной платы.

Таблица 17 Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Инженер
Основная зарплата	73483,2	117420
Дополнительная зарплата	11022,5	17613
Итого по статье $C_{зп}$	84505,7	135033

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}})$$

где, $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

Отчисления на социальные нужды составляет 27,1%.

$$C_{\text{внеб}} = 0,271 \times (190903,2 + 28635,5) = 59495 \text{ руб.}$$

Накладные расходы

В эту статью включаются затраты на управление и хозяйственное обслуживание, которые могут быть отнесены непосредственно на конкретную тему.

Расход электроэнергии для персонального компьютера равен 0,16 кВт/ч

Длительность использования: 4 месяца (компьютер работал в среднем 22 дня в месяц по 6 часов).

$$E = 4 \text{ мес} * 22 \text{ дня} * 6 \text{ часов} * 0,16 = 84,48 \text{ кВт.}$$

Освещение (4 лампы по 100 Вт) 4 месяца * 22 дня * 8 часов

$$E = (7 * 22 * 8) * 0,4 = 492,8 \text{ кВт.}$$

Общая сумма затрат на электроэнергию составляет, согласно действующему тарифу (5,10 руб. за 1 кВт/ч):

$$C_{\text{эл}} = (84,48 + 492,8) * 5,10 = 2944,1 \text{ руб.}$$

Расчет накладных расходов ведется по следующей формуле:

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}),$$

где $k_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов.

$$C_{\text{накл}} = 0,9 * (134655,8 + 10701,255) = 130821,4 \text{ руб.}$$

Организационная структура проекта отражена на Рисунке 16



Рисунок 16 Организационная структура проекта

Таблица 18 Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель	Магистрант
Обзор литературы		И
Выбор и оптимизация соединений для модели	О	
Выбор биомишени	О	
Выполнение процедуры докинга	У	И
Статистическая обработка и анализ результатов	О	И
Составление отчетов и таблиц	О	И
Защита магистерской диссертации		И

План управления коммуникациями проекта

План управления коммуникациями отражает требования к коммуникациям со стороны участников проекта. План управления коммуникациями приведен в таблице 19.

Таблица 19 План управления коммуникациями

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Еженедельно
2.	Документы и информация по проекту	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже сроков графиков и к. точек
3.	О выполнении контрольной точки	Исполнитель проекта	Руководителю проекта	Не позже дня контрольного события по плану управления

На пути реализации проекта могут возникнуть разного рода риски, представляющие опасность того, что поставленные цели проекта могут быть не достигнуты полностью или частично. Полностью избежать риска практически невозможно, но снизить их угрозу можно, уменьшая действие неблагоприятных факторов. Возможные риски представлены в Таблице 20.

Для начала работы был сформирован план закупок проекта (Таблица 21).

Таблица 20 Возможные риски

№	Риск	Потенциальное воздействие	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска *	Способы смягчения риска	Условия наступления
1	Некорректные входные данные	Неверные результаты расчета	3	5	Высокий	Увеличить количество повторностей	Невнимательность
2	Некорректные выходные данные	Неверный анализ результатов	3	5	Высокий	Внимательность при выборе параметров	Ложные умозаключения

Таблица 21 План закупок проекта

№	Закупаемые материалы/услуги	Количество	Поставщик
1	Программный пакет Schrodinger	1	Schrödinger, LLC

4.4 Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности

Интегральный показатель финансовой эффективности научного исследования получают в ходе оценки бюджета затрат трех (или более) вариантов исполнения научного исследования. Для этого наибольший интегральный показатель реализации технической задачи принимается за базу расчета (как знаменатель), с которым соотносятся финансовые значения по всем вариантам исполнения

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}$$

где I_{ϕ}^p - интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i-го варианта исполнения;

Φ_{\max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов исполнения объекта исследования можно определить следующим образом:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i b_i^a, \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i b_i^p,$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i – весовой коэффициент i -го параметра;

b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания;

n – число параметров сравнения.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности приведен в форме Таблицы 22.

Таблица 22 Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

ПО Критерии	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект	Аналог 1	Аналог 2
1. Экономичность	0,15	5	3	4
2. Воспроизводимость	0,25	4	2	3
3. Доступность материалов	0,15	5	3	3
4. Энергосбережение	0,20	4	3	3
5. Надежность	0,25	4	4	4
ИТОГО	1	22	15	17

$$I_m^p = 5*0,15 + 4*0,25 + 5*0,15 + 4*0,2 + 4*0,25 = 4,3$$

$$I_1^a = 3*0,15 + 2*0,25 + 3*0,15 + 3*0,2 + 4*0,25 = 3,0$$

$$I_2^a = 4*0,15 + 3*0,25 + 3*0,15 + 3*0,2 + 4*0,25 = 3,4$$

Интегральный показатель эффективности разработки ($I_{финр}^p$) и аналога ($I_{финр}^a$) определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{финр}^p = \frac{I_m^p}{I_{ф}^p}, \quad I_{финр}^a = \frac{I_m^a}{I_{ф}^a}$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта (Таблица 23). Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{cp} = \frac{I_{финр}^p}{I_{финр}^a}$$

где \mathcal{E}_{cp} – сравнительная эффективность проекта; $I_{мэ}^p$ – интегральный показатель разработки; $I_{мэ}^a$ – интегральный технико-экономический показатель аналога.

Таблица 23 Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Аналог 1	Аналог 2	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	1	0,29	0,64
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	3	3,4	4,3
3	Интегральный показатель эффективности	3	11,72	6,72
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	2,24	0,57	

Заключение

Сравнение значений интегральных показателей эффективности показало, что аналог наиболее эффективен с точки зрения финансовой и ресурсной эффективности. Но при этом методы, применяемые в нашей разработке являются более точными, что необходимо для лучшего достижения результата.

В ходе разработки данной главы магистерской диссертации были решены следующие задачи:

1. Составлен план научного исследования, разработан календарный план-график. Согласно разработанному плану, объем запланированных работ является реализуемым за указанные сроки.

2. Определена целесообразность проведения научного исследования с точки зрения ресурсоэффективности, а также проведен расчет экономической эффективности и ресурсоэффективности.

Таким образом, задачи, поставленные для осуществления цели раздела «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение», выполнены. Показано, что проведенное исследование является эффективным с точки зрения ресурсоэффективности и ресурсосбережения.

Список публикаций студента

1. Иманкулова Е.А., Станкевич К.С. молекулярное моделирование биологически активных соединений - лигандов для ГАМК_A рецепторов // Сборник научных трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Томск, 24–27 апреля 2018 г.). - Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2018. – С. 57-59.

Приложение А
(справочное)

«The study of the interaction biologically active substances with biotargets on the example of the GABA_A receptor» (literature review)

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ71	Иманкулова Евгения Анатольевна	<i>Иманкулова</i>	24.05.19

Консультант школы, отделения (НОЦ): ИШНПТ, НОЦ Н.М. Кижнера

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор НОЦ Н.М. Кижнера	Хлебников А.И.	д.х.н, профессор	<i>Хлебников</i>	24.05.19

Консультант – лингвист отделения (НОЦ) школы: ШБИП

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент отделения иностранных языков ШБИП	Аксёнова Н.В.	к.ф.н	<i>Аксёнова</i>	24.05.19

«The study of the interaction biologically active substances with biotargets on the example of the GABA_A receptor» (literature review)

General principles of obtaining biologically active compounds

Historically, pharmacological properties of natural and synthetic substances were revealed accidentally, more precisely, biological activity in certain chemical classes was revealed during the research at random. At the same time, biological activity was evaluated using animal experiments or those involving isolated organs and cells. Therefore, a systematic search for compounds with pharmacological properties is associated with a large amount of expensive and inhuman animal experiments. Later, with chemical structure methods development, it became possible to determine the structure of protein receptors in complexes with small ligand molecules. On the other hand, with the expansion of synthetic organic chemistry methodology, the amount of organic compounds in the form of potential biologically active substances has increased. For example, currently, there is a library that contains *in silico* generated molecules, and this library has about 170 billion structural formulas [41], as well as database of commercially available organic compounds (see, for example, <http://zinc.docking.org/>) in which tens of millions structures are presented. For such a huge number of compounds, an experimental study of biological activities is impossible. The number of receptors, more precisely, molecular targets in the human body is about 2 thousand. [41]. This number is increased by several orders of magnitude after taking into account factors that are typical of proteins: alternative splicing, post-translational modifications, protein-protein interactions and the presence of several ligand-binding sites with the protein. Taken these factors into account, there is a necessity to use computer methods for the study of biologically active compounds. Currently, there are two main approaches to the application of computer methods to create drugs: 1) a method based on a biological target structure (Structure-Based Drug Design); 2) a method based on a ligand structure (Ligand-Based Drug

Design). When choosing one approach or another, it should be based on the characteristics of the ligand and receptor-target, namely, on their spatial structure. The first method is based on receptor structure knowledge, and the second is based only on information about the structure of ligands with a specific type of biological activity. [41]

The lock-and-key model

Since pharmacology as a science about the study of biologically active substances that affect the human body appears, to this day it is of great interest to study potential drugs activity mechanisms. The theory of receptors (P. Ehrlich) played a very important role in the development of these representations, in which the formation of biologically active substances with certain active centers in the body complexes, which were called receptors, was proved. Subsequently, the definitions of the internal activity of a biologically active substance and its binding to the receptor (E. Ariens) were introduced. Most biologically active substances are enzymes themselves [41]. In this regard, the main approaches to the interaction analysis of receptor and ligand are the lock-and-key model and an induced fit model. The lock-and-key model, proposed at the end of the XIX century by Fisher, sometimes is called the “rigid matrix” model. [41]. The main idea is that only one substrate (key) is suitable for one enzyme (lock) [41], which leads to a short-lived enzyme-substrate complex formation. It is believed that the amino acid residues of the active site are prepared in advance for binding to the ligand. The advantage of this model is that it explains the high specificity of enzymes, however, there is a significant minus, in practice there is such a phenomenon as stabilization of the transition condition, which cannot be explained in this model. In 1959, Koshland formulated the method of “Induced fit model”. A significant difference is the flexibility of this model. The enzyme is not a static carcass, it`s a flexible model which active center is able to change and transform. In the process of binding the receptor with a ligand, a process of conformational changes is induced, i.e. amino

acid residues that are part of the active center, and other groups accept the spatial orientation needed to bind ligand. At the same time, amino acid residues that are not involved in the formation of a complex can sink deep into the molecule. [5].

Structure-Based Drug Design

The method, allowing to assess receptor and ligand binding affinities, is often named in the literature as a direct method [41]. The basic procedure for assessing the complementarity of the molecular structure in a suitable active center of the protein-target is the docking procedure. Molecular docking is one of the methods of virtual screening, when potentially active compounds — ligands — are “adjusted” to the receptor based on the optimal steric position according to each other. Special programs are used to search for ligands, there are quite a few of them, and all of them are optimized for finding suitable compounds in large databases. Such databases contain structures of known compounds (virtual screening). Another approach is the analysis of hypothetical structures of molecules based on literature data. These molecules in theory may have high affinity for certain types of receptors. These methods called *de novo* methods. Their essence lies in the selection of small molecules fragments with increased binding energy and minimal repulsion energy in relation to the active center of the receptor. By gradually joining the fragments, the whole molecule is constructed. This method gives positive results, but the reliability of the affinity is not always high. [41]. Despite the progress achieved in methods application based on target structure in creating new drugs used with the following limitations: 1) information on target spatial structure is required, which is far from being accessible to all proteins of interest as pharmacological targets; 2) time history in the spatial structure of proteins during the operation and, in particular, during the formation of protein-protein and protein-ligand complexes is necessary to be taken into account; 3) the difficulties of determining the biologically active conformation for conformationally flexible ligands; 4) choice ambiguity of the evaluation function

of the binding energy (scoring function). Therefore, until now, methods based on ligands structure are often used to assess the profiles (spectra) of biological activity characterizing the complex effect of organic compounds on biological objects. [2].

The application of the Structure-Based Drug Design method can be divided into several stages. Firstly, you need to evaluate and analyze target protein structure and determine the active binding sites with low molecular weight compounds - ligands. The best option is a target end structure in combination with a known ligand (competitive inhibitor or substrate). At the same time, there is no need to determine the place of binding independently, which may affect the accuracy of the calculations. There are two options for determining the active center, the first is the analysis of all cavities in the protein structure, and the bulk cavity is more likely to be the active center. The second option, more accurate, is the definition of key amino acids that are involved in enzymatic catalysis. It is also necessary to determine the position of the ligand in the active center of the receptor; for this, docking of known substrates and / or inhibitors can be performed over the entire surface of the target protein. [41].

Ligand-Based Drug Design

In the case where the target structure is unknown, indirect methods based on the structure of the ligands are used. In this case, the training sample from known ligands is taken as a basis, and its analysis is carried out taking into account the required biological activity. The first stage is the construction of a model of the ligand binding site based on the physicochemical properties of the training sample compounds. Such models are of two types: pharmacophoric models and pseudoreceptor models [8]. The pharmacophoric model determines the minimum necessary structural characteristics that a molecule must possess in order to bind to a target. At the same time, the pharmacophore is an abstract concept that takes into account the general possibilities of the molecular effects of a group of compounds with respect to their target structure. This model has certain characteristics, or

pharmacophoric centers, which are responsible for the interrelation of structure and activity. The following pharmacophore centers are distinguished: hydrophobic regions, aromatic cycles, hydrogen bond donors and acceptors, and anionic and cationic centers. The construction of pharmacophoric models takes into account not only the presence or absence of certain functional groups of molecules, but also the distance at which they are located in space relative to each other. Thus, the model of a biological target can be built on the basis of the physicochemical properties of the compound, and this model, in turn, can be used to create new molecular objects that interact with the target. [41].

As a combination of pharmacophore modeling and methods based on target structure, a pseudoreceptor model, as known as a receptor mapping. Based on a preliminary model of the pharmacophore, a hypothetical model of the receptor is constructed, consisting of individual amino acid residues surrounding a set of structural molecules of ligands superimposed on each other. The location of individual amino acid residues is determined by experimental data (for example, using the site - directed mutagenesis) [3]. Pseudoreceptor models describe mainly the geometric shapes and the size of the binding site in the target. These models allow to search for new ligands in molecular databases. Pseudoreceptor models allow searching for new ligands by molecular docking. The “pseudoreceptor” method is preferable when the pharmacophoric model contains relatively few pharmacophoric points, which leads to the selection of too many compounds for experimental testing [7].

The most popular approaches to the search for biologically active compounds based on the structure of the ligand is the QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) method. The QSAR method is used to optimize the structures of the base molecules and predict selected compounds activity. Depending on the purpose of the study, the corresponding biological activity is measured experimentally for a number of compounds, and this data serves as a dependent variable in the QSAR simulation. Once the molecules are selected for

research, they are modeled *in silico*, and energy is minimized using molecular mechanics or quantum mechanical methods. Then, for the array of molecules, the corresponding molecular descriptors are determined, which describe the chemical properties of molecules necessary for their biological activity. Molecular descriptors can be both structural and physicochemical. The goal here is to create a molecular "fingerprint" for each molecule, which is associated with its activity. Molecular descriptors are then used to obtain a mathematical relationship that can explain variations in molecules biological activity [41]. Such correlation equations make it possible to predict the activity of new analogues from this set of homologues. Currently, three-dimensional QSAR (3D-QSAR) methods are actively used, based on the description of the spatial distribution of ligand properties, such as the Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) [41] and the comparative molecular similarity (CoMSIA) methods.) [41]. These methods allow us to characterize the regions of space around the ligand molecules (steric, electrostatic, hydrophobic, and other properties) that determine the interaction of the target macromolecule with the ligands from this set [8].

GABA receptor and its main characteristics

The function of the nervous system is regulated by the balance of excitatory and inhibitory signals. GABA (γ -aminobutyric acid) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) and acts through the GABA_A, GABA_B and GABA_C receptors. [41]. In the body, GABA is synthesized from glutamic acid (glutamate) using the enzyme glutamate decarboxylase (GAD) and with vitamin B6 as a cofactor. [41] As a neurotransmitter, GABA performs primarily inhibitory functions. By activating the GABA receptor on the surface of the cell membrane, it opens the ion channel, which passes Cl⁻ ions into the cell or releases K⁺ from it into the extracellular space. Both of these actions lead to hyperpolarization of the neuron membrane. During the period of hyperpolarization, which lasts only a few milliseconds, it is

not possible to generate a potential difference between the outer and inner side of the neuron membrane, which leads to a delay in the transmission of nerve impulses. At the level of the organism, this leads to a delay of reaction to external irritant or stimulus. [41].

GABA_A belongs to the third class of receptors associated with G-proteins, it can also be attributed to the class of receptors similar in spatial structure to the nicotinic receptor. Sometimes they are called nicotinoid or Cys-looped. They are integrated into the cell membrane pentamer supermolecular structures that form the ion channel. Interaction with agonist molecules leads to a change in the conformation of the receptor and the opening of the ion channel. The results of x-ray analysis of acetylcholine binding protein and its complexes with ligands are of great importance for the study of the spatial structure of representatives of such a family of receptors. Using these structures as templates for comparative modeling methods, molecular models of GABA receptors were constructed, a theoretical analysis of the interaction of receptors with agonist molecules was carried out, and the mechanism of receptor activation was proposed.

GABA_A and GABA_C are ionotropic (bicuculline and picrotoxin - sensitive), GABA_B is a metabotropic (baclofen-sensitive) receptor. It is worth noting that GABA_A and GABA_C receptors are sometimes combined into one group. [16]

GABA_A is a complex subunit assembly consisting of 19 subunits: 6 types of α -subunits, 3 types of β -subunits, 3 types of γ -subunits, δ , ϵ , π and θ subunits, and 3 types of ρ -subunits (Figure 1) . [41].

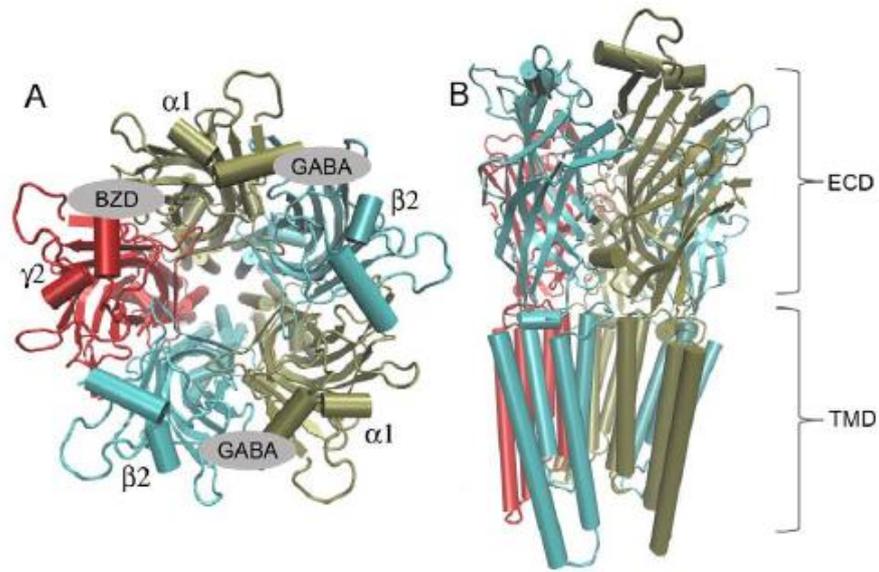


Figure 1 Illustration of the GABAaR structural composition: A - Top view showing the pentameric assembly of $\alpha 1$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ subunits and the location of binding sites for GABA and BZDs; and B Side view illustrating the extracellular domain (ECD) where agonists and benzodiazepines bind and the transmembrane domain (TMD) [27]

The receptor subunits have homology of the original amino acid sequences and structural homology. In turn, each subunit has a main domain that contains more than 200 amino acid residues with an N-terminus, also 4 hydrophobic transmembrane domains M1-M4 and a short extracellular C-terminal domain. The N-terminus contains a conservative motif, the Cys - loop. The ligand binding site is formed at the junction of two N-terminal extracellular domains of neighboring subunits. [41].

What distinguishes the GABAa receptor from other membrane proteins with Cys - loop is its pharmacology, which can be explained by a large number of "pockets" in the intramembrane space. [17].

As previously thought, the GABAa receptor has 5 binding sites, among which is the site to which GABA and its specific agonists bind. The second binding site of the GABAa receptor is the BZD site. The third GABAa receptor binding site is the Picrotoxin site to which convulsants bind. The fourth GABAa

receptor binding site is a barbiturate site. The fifth GABA_A receptor binding site is neurosteroid. [41].

The mechanism of binding of compounds - ligands to the receptor in all binding sites is as follows. The first step is that the agonist binds to the binding site, followed by conformational changes that lock the ligand into the receptor's pocket. A protein changes its conformation and turns into one or more closed states, which were called “flipped states”. Further conformational changes lead to ion pore opening. Then the open channel binds to the ligand and enters the closed state.

Like many other receptors, the GABA_A receptor undergoes posttranslational modifications. Several different protein kinases have been shown to phosphorylate specific amino acid residues at specific receptor subunits and thereby modulate the activity of the channels. It has also been shown that this modification affects surface stability or protein processing. [41].

Characterization of GABA_A receptor agonists

A substance, a potential drug, due to its peculiarities, can interact not with the receptor itself, but with the section of the cell membrane that adjoins it. In this case, neither excitation nor blocking of the receptor occurs, that is called allosteric effect. As a result, both the structure of the membrane adjacent to the receptor and the individual components of the receptor itself change, which affects the sensitivity of the receptor to biologically active substances.

Such a mechanism does not affect the transmission of nerve impulses, but in this case there is a modification in the desired direction of the transmission process under the influence of the drug. Such a mechanism is typical of tranquilizers. Chemical structure tranquilizers are derived from benzodiazepine, which is an allosteric modulator of the benzodiazepine GABA_A receptor binding site. Clinically, this is showed by the elimination of disorders such as anxiety, anxiety, fear, etc. [41].

Typical agonists and antagonists for GABA_A are GABA, THIP, Isoguvacine, Muscimol and competitive antagonist Bicuculline, Isonipectic acid, BDZ agonists: Diazepam, Clonazepam and its antagonists: Flumazenil [16], Pentylentetrazol (PTZ), Pentobarbital and Phenobarbital. [20].

The allosteric modulators of the GABA_A receptor, penetrating the blood-brain barrier, are used in the treatment of neuropsychiatric diseases. Mustsimol has this ability, the disadvantage of it is high toxicity. THIP and Prohabide is used in the treatment of diseases of the central nervous system. Baclofen is used as a non-narcotic analgesic.

Since 1970s, the activity of Benzodiazepines and the fact that it is realized through the system of the main inhibitory mediator of the central nervous system, γ -aminobutyric acid (GABA), is known in the 20th century. BZD ligands of the site are often used as psychotropic drugs, they have anxiolytic, anticonvulsant, hypnotic, sedative and muscle relaxant properties, expressed in varying degrees depending on their structure. [41].

In the 80s of the last century, GABA_A receptors were first investigated as a target for alcohol activity. It has been shown that intoxication concentrations of ethanol enhance the function of the GABA_A receptors. [41]. Subsequently, the ability of some drugs to modulate the effects of ethanol was discovered. In this regard, we can conclude about the potential possibility of their use for stopping alcohol dependence. Such drugs can reduce withdrawal syndrome with a sharp cessation of alcohol intake. Also known drugs mimetic action, which have the ability to completely replace alcohol with their complex application in the fight against alcohol dependence: Diazepam, Pentobarbital, some neurosteroids, Sodium Hydroxybutyrate, Dizocilpine, etc. [41].