

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Андрианов Григорий Васильевич

**Разработка новых биоинформатических подходов для подбора ингибиторов
киназной активности**

1.5.8. Математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Институте фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет».

- Научный руководитель** – **Серебрянский Илья Генрихович**,
кандидат биологических наук
- Официальные оппоненты** – **Лагунин Алексей Александрович**, доктор биологических наук, профессор РАН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт биомедицины (МБФ), кафедра биоинформатики, заведующий кафедрой
- Долгих Дмитрий Александрович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория инженерии белка, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией
- Нилов Дмитрий Константинович**, кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, отдел биокинетики, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится 24 июня 2025 года в 16:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3455>

Автореферат разослан «___» мая 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.В. Шаповалова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Протеинкиназы (ПК) - крупное семейство ферментов, участвующих во внутриклеточной сигнализации (Hanks, 2003), с 538 идентифицированными киназами у человека (Manning *et al.*, 2002). Они катализируют перенос γ -фосфатной группы АТФ на тирозин, серин или треонин белка-субстрата, изменяя его конформацию и активность (Cohen, 2002). Фосфорилирование играет ключевую роль в контроле многих процессов, включая транскрипцию, клеточный цикл, апоптоз, дифференциацию, метаболизм и межклеточную коммуникацию (Rauch *et al.*, 2011; Götz and Montenarh, 2017; Lu and Hunter, 2018; Gonçalves *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2020).

Аномальная активность ПК связана со многими заболеваниями, поэтому они считаются перспективными терапевтическими мишенями (Bhullar *et al.*, 2018). На сегодняшний день в качестве лекарств одобрен 81 низкомолекулярный ингибитор ПК, и ещё более 180 находятся в стадии клинических испытаний. Существует ряд проблем, которые затрудняют разработку эффективных ингибиторов ПК. Во-первых, консервативность АТФ-связывающего сайта ПК часто приводит к нежелательным побочным эффектам из-за взаимодействия ингибиторов с другими ПК, не являющимися планируемыми мишенями (Gani *et al.*, 2015; Modi and Dunbrack, 2019). Во-вторых, наличие киназ с дублирующими функциями усложняет ингибирование патологических сигналов (Manning and Toker, 2017), поскольку это требует одновременного ингибирования нескольких ПК для достижения терапевтического эффекта. Таким образом, остается актуальной задача разработки новых методов создания ингибиторов ПК и их сравнения с существующими.

Методы виртуального скрининга широко применяются для разработки новых соединений, позволяя оценивать их перспективность с помощью вычислительных ресурсов и снижать затраты на экспериментальную проверку (Gagic *et al.*, 2019; Maia *et al.*, 2020). Они позволяют отсеять неэффективные соединения на ранних этапах и отобрать перспективные кандидаты для дальнейшей проверки *in vitro*. Однако традиционные методы виртуального скрининга, не могут решить все проблемы: например, огромное химическое пространство лекарственных соединений делает обычный перебор невозможным (Polishchuk, Madzhidov and Varnek, 2013).

Для решения этих проблем разрабатываются новые вычислительные методы. Один из них - фрагментно-ориентированная разработка лекарственных соединений (de Souza Neto *et al.*, 2020), в которой вместо скрининга готовых соединений проводится скрининг их отдельных фрагментов, с последующим комбинированием наиболее перспективных из них в большие соединения. Это сокращает количество исследуемых кандидатов благодаря меньшему структурному разнообразию фрагментов по сравнению с полноразмерными соединениями, что значительно ускоряет процесс.

Для повышения селективности потенциальных лекарств разрабатываются подходы по направленной деградации киназ с помощью низкомолекулярных соединений PROTAC (англ. proteolysis targeting chimera). Такие соединения

индуцируют взаимодействие между мишенью и убиквитинлигазой E3 (E3), что приводит к убиквитинированию мишени и ее последующей деградации в протеасоме (den Besten and Lipford, 2020; Tian and Burgess, 2021). Использование таких соединений для уменьшения активности киназ считается более селективным, чем ингибирование, поскольку E3 взаимодействует с внешней поверхностью каталитического домена киназ, которая более разнообразна, чем консервативный АТФ-связывающий сайт (Bondeson *et al.*, 2018). Однако разработка PROTAC часто ограничивается нехваткой структурных данных о взаимодействии, что усложняет задачу. Таким образом, разработка данного типа соединений является сложной задачей, которая до сих пор не решена.

Традиционные методы виртуального скрининга, такие как молекулярный докинг и поиск по молекулярному подобию, остаются важными инструментами разработки лекарств, но они часто страдают от низкой точности предсказаний (Su *et al.*, 2019). Для преодоления этих ограничений внедряются модели машинного обучения, корректирующие ошибки предсказаний (Ricci-Lopez *et al.*, 2021; Moshawih *et al.*, 2024). В этом контексте традиционные методы выступают как «генератор гипотез», создавая множество предсказаний взаимодействия лигандов с мишенью, а модель машинного обучения действует как «дискриминатор», отбирая наиболее достоверные результаты (Adeshina, Deeds and Karanicolas, 2020).

Цель и задачи работы

Целью данной диссертационной работы является разработка новых вычислительных подходов для подбора регуляторов киназной активности с помощью различных методов виртуального скрининга.

Для достижения цели работы нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать новый высокоэффективный фрагментно-ориентированный метод для поиска потенциальных ингибиторов протеинкиназ в масштабных библиотеках, полученных путем виртуального комбинаторного синтеза.
2. Разработать метод предсказания взаимного расположения членов тройного комплекса, образованного для протеолитической деградации протеинкиназ при помощи молекулы PROTAC, и проанализировать его эффективность и селективность.
3. Создать методическую основу для оценки эффективности и сравнительного анализа предсказательной способности новых разработанных вычислительных подходов по сравнению с традиционными методами виртуального скрининга.

Научная новизна работы

Было разработано два новых вычислительных метода для рационального дизайна новых эффективных и селективных ингибиторов ПК. Первый подход, совмещающий идеи фрагментно-ориентированной разработки лекарств и дизайна химических библиотек методами комбинаторной химии, позволяет анализировать многомиллионные библиотеки низкомолекулярных соединений в тысячи быстрее по сравнению с традиционными методами виртуального скрининга. Второй метод,

предназначенный для моделирования взаимного положения компонентов тройного комплекса ПК-PROTAC-E3, позволяет предсказать избирательность взаимодействия PROTAC с белковыми компонентами тройного комплекса. Последовательное применение традиционных методов виртуального скрининга, модели машинного обучения и экспериментального определения ингибирующей способности соединений создало основу для сравнительного анализа эффективности новых вычислительных методов, разработанных для дизайна ингибиторов ПК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенное исследование способствует ускорению разработки новых эффективных и селективных ингибиторов киназ. Разработанный вычислительный метод, совмещающий подходы фрагментно-ориентированной разработки лекарств и комбинаторной химии, значительно ускоряет анализ обширных специализированных библиотек низкомолекулярных соединений. Метод моделирования взаимного расположения компонентов тройного комплекса ПК-PROTAC-E3 позволяет оценить структурную совместимость компонентов комплекса на ранних этапах исследования и рационально подойти к выбору оптимальной структуры PROTAC. Таким образом, оба разработанных метода способствуют ускоренному поиску и упрощают процесс оптимизации структуры перспективных молекул-кандидатов для терапии, направленной на подавление аномальной активности ПК.

Сравнение результатов предсказаний традиционных методов виртуального скрининга и модели машинного обучения с последующим экспериментальным определением ингибирующей активности отобранных соединений позволяют объективно оценить эффективность новых вычислительных методов, что способствует их дальнейшему развитию и интеграции в научно-практическую деятельность.

Положения, выносимые на защиту

1. Вычислительный метод поиска новых ингибиторов протеинкиназ при помощи совмещения подходов фрагментно-ориентированной разработки лекарств и комбинаторной химии позволяет анализировать многомиллионные библиотеки низкомолекулярных соединений в тысячи раз быстрее по сравнению с традиционными методами виртуального скрининга.
2. Метод моделирования взаимного положения компонентов тройного комплекса, использующий разработанную нами новую метрику доли совместимых комплексов, позволяет предсказать избирательность взаимодействия PROTAC с мишенью и убиквитинлигазой E3.
3. Последовательное применение традиционных методов виртуального скрининга, модели машинного обучения vScreenML, и определение ингибирующей способности соединений позволило создать основу для сравнения эффективности различных вычислительных методов для разработки новых ингибиторов протеинкиназ.

Степень достоверности данных

В методике исследования были использованы апробированные и широко используемые алгоритмы виртуального скрининга и машинного обучения. Литературный обзор и обсуждение результатов основаны на анализе всей доступной литературы по теме. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных журналах и обсуждены на профильных научных конференциях.

Личный вклад автора

Основные результаты, представленные в диссертационной работе, получены лично автором. Его вклад включает анализ научной литературы, разработку новых вычислительных методов, планирование и проведение вычислительных экспериментов, обработку и интерпретацию данных, подготовку публикаций и участие в научных конференциях. В работе G.V. Andrianov et al. 2021 непосредственно автором был разработан метод дизайна новых ингибиторов ПК из отдельных фрагментов, а также проанализирована его эффективность. В исследовании N. Bai et al. 2021 им были созданы алгоритм и код для моделирования структуры PROTAC и построения тройного комплекса. В работе Г.В Андрианов и др. 2021 автор осуществил отбор новых потенциальных ингибиторов CDK2 и CDK9, синтез которых выполнялся компанией Enamine, а тестирование ингибирующей активности - компанией Reaction Biology. В работе G.V. Andrianov et al. 2024 автором был разработан код для вычисления дескрипторов, подготовлен новый тренировочный набор, обучена модель машинного обучения и оценена точность ее предсказаний.

Публикации по теме работы

По теме диссертации опубликовано пять научных работ, из которых четыре в международных и отечественных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на двух научно-практических конференциях SummerRosettaCon (Сиэтл, 2019 и 2020, США), а также на конференции для разработчиков программного обеспечения по моделированию биологических систем WinterRosettaCon (Нью-Йорк, 2020, США). Кроме того, результаты докладывались на 25-й и 26-й ежегодной конференции онкологического института Фокс Чейз (Филадельфия, США, 2020 и 2023) и на симпозиуме по компьютерному дизайну лекарств (Балтимор, США, 2023).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка, 5 таблиц и 5 приложений. Библиография включает 152 наименования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка новых киназных ингибиторов с использованием фрагментно-ориентированного дизайна.

Первый этап включает структурный анализ взаимодействия исходного ингибитора с АТФ-связывающим сайтом домена ПК для определения групп, пригодных для оптимизации (рисунок 1, шаг 1). В случае АТФ-конкурентных ингибиторов ПК чаще всего оптимизируют периферийные группы, расположенные в заднем гидрофобном, внешнем или рибозном карманах, тогда как центральный фрагмент, взаимодействующий с шарнирной петлей домена, остается нетронутым (van Linden *et al.*, 2014).

Далее проводится ретросинтетическая декомпозиция исходного ингибитора на отдельные строительные блоки для выявления шаблонов, которые затем используются для поиска доступных реагентов в базе данных PubChem (рисунок 1, шаг 2). Одновременная оптимизация всех изменяемых групп неэффективна из-за экспоненциального роста необходимых вычислений, поэтому эффективнее проверить совместимость каждого строительного блока с мишенью отдельно и затем скомбинировать лучшие из них друг с другом. В связи с этим на третьем этапе формируется библиотека отдельных фрагментов, где подходящие под шаблоны строительные блоки объединяются с центральной частью исходного ингибитора для облегчения его позиционирования относительно структуры мишени (рисунок 1, шаг 3). Затем для каждого фрагмента вычисляется энергия взаимодействия с использованием PyRosetta (Alford *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2021) (рисунок 1, шаг 4).

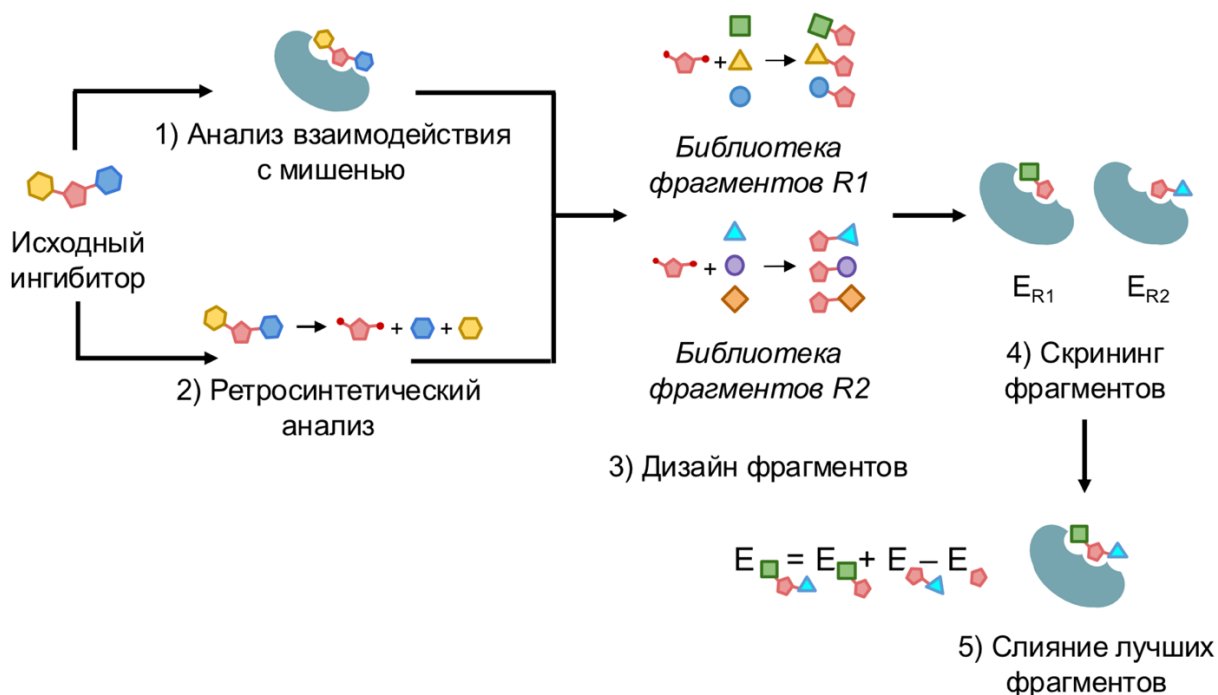


Рисунок 1 - Схематичное представление разработанного метода фрагментно-ориентированного дизайна новых киназных ингибиторов.

Отбор лучших сочетаний фрагментов для слияния в полноразмерные соединения основан на аддитивности энергий взаимодействия (рисунок 1, шаг 5), то есть энергия взаимодействия полного соединения может быть аппроксимирована как сумма энергий его фрагментов. Это позволяет идентифицировать лучшие соединения без явной проверки объединенных фрагментов.

Программный код разработанного метода опубликован на GitHub - <https://github.com/karanicolaslab/combichem>.

Моделирование пространственного положения ПК-PROTAC-E3 и предсказание совместимости его компонентов.

Структура PROTAC состоит из трех частей: двух функциональных фрагментов, взаимодействующих с мишенью и E3, и подвижного линкера, объединяющего их (рисунок 2, шаг 1). В этой связи на первом этапе необходимо подобрать двухмерную структуру линкера, а также модели взаимодействия функциональных лигандов с мишенью и E3.

На втором этапе при помощи программы стыковки в PyRosetta генерируются 50 000 моделей взаимодействия мишени и E3 (рисунок 2, шаг 2). Также определяется медианное значение энергии взаимодействия для отбора совместимых комплексов на последнем шаге метода. С помощью ПО OMEGA (Hawkins *et al.*, 2010; Hawkins and Nicholls, 2012) создаются до 1 000 разнообразных низкоэнергетические конформаций линкера (рисунок 2, шаг 3). Чтобы облегчить выравнивание линкера относительно предсказанных моделей, к его концам добавляются «заглушки» - несколько атомов из функциональных фрагментов.

Затем комбинации 10% лучших по энергии взаимодействия моделей и всех конформаций линкера проверяются на совместимость путем наложения «заглушек» линкера на соответствующие атомы функциональных фрагментов. Если среднеквадратичное отклонение (англ. root mean square deviation, RMSD) между ними составляет менее 0,4 Å, модель считается совместимой. Затем вычисляется энергия взаимодействия в полной модели тройного комплекса. Если это значение лучше медианного значения, вычисленного на втором шаге, то модель используется для дальнейшего анализа (рисунок 2, шаг 4).

На заключительном этапе вычисляется доля полностью совместимых тройных комплексов (ДСК), показывающая, насколько PROTAC совместима с мишенью и E3 для образования тройного комплекса (рисунок 2, шаг 5). Это значение определяется как отношение количества образованных совместимых комплексов (# СК) к числу сгенерированных белок-белковых моделей (# ME3), и нормализованное на реально использованное количество конформеров линкера (# Л поделенное на тысячу).

Программный код разработанного метода опубликован на GitHub - https://github.com/karanicolaslab/PROTAC_ternary.

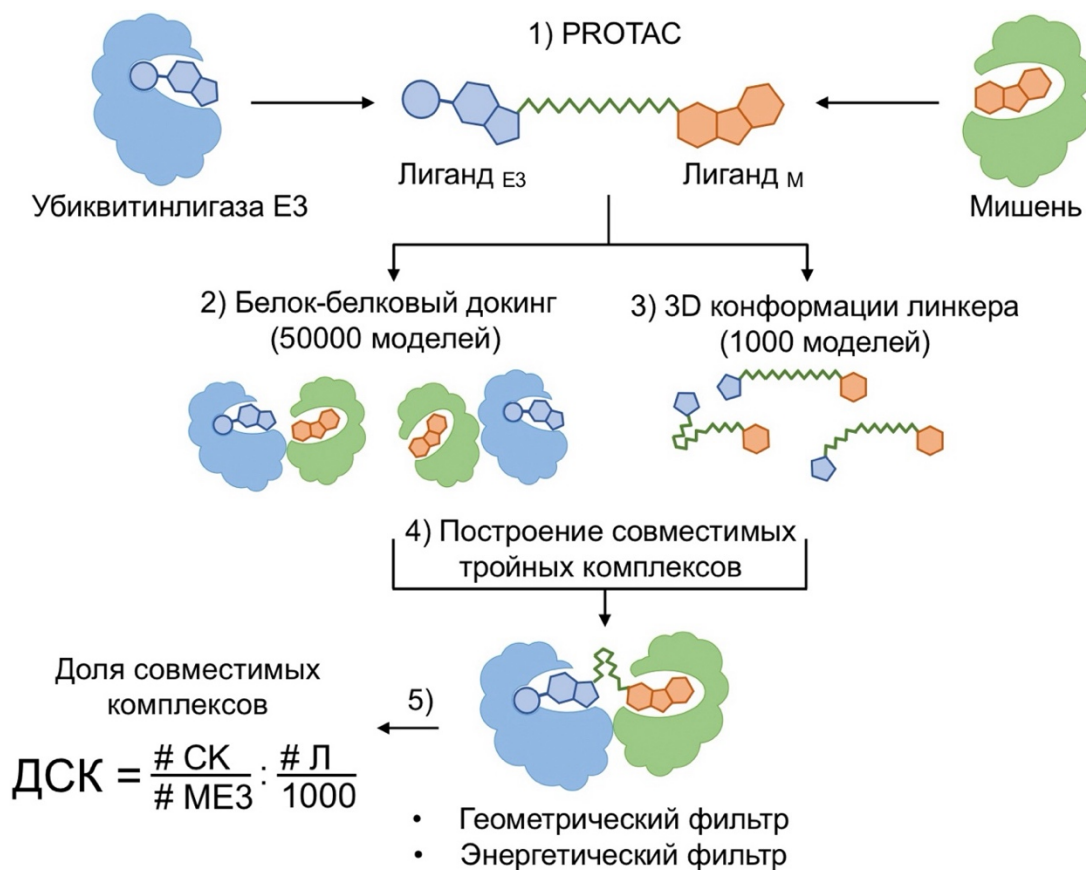


Рисунок 2 - Схематичное представление разработанного метода для моделирования положения компонентов тройного комплекса и вычисления их совместимости.

Поиск новых киназных ингибиторов с помощью метода отбора по молекулярному подобию. В работе метода выделяют три основных этапа: 1) компиляция низкомолекулярных соединений для скрининга, 2) предсказание наиболее вероятного положения каждого соединения в комплексе с мишенью, 3) ранжирование моделей с помощью оценочной функции и отбор лучших кандидатов.

Следуя этим этапам, данный подход был применен для поиска новых ингибиторов ПК. Для полученного набора соединений из каталога компании Enamine были сгенерированы 3D-конформеры с помощью ПО OMEGA. Затем полученные трехмерные структуры соединений были выровнены относительно положения известных ингибиторов в комплексе с каталитическим доменом ПК с помощью ПО ROCS (Hawkins, Skillman and Nicholls, 2007). Затем энергия взаимодействия для каждого соединения в комплексе со структурой мишени была вычислена с помощью PyRosetta и затем была использована для ранжирования кандидатов.

Синтез киназных ингибиторов и определение их ингибирующей активности. В результате работы метода поиска по молекулярному подобию было отобрано 22 соединения, которые затем были синтезированы компанией Enamine (США).

Ингибирующая активность соединений была проверена с помощью HotSpot™ Kinase Assay компании Reaction Biology (США), где определялось количество

включенного в субстрат радиоизотопа в ходе взаимодействия исследуемой мишени, ингибитора и меченной АТФ.

Эксперимент был проведен в одном повторе при концентрациях ингибитора от 100 мкМ до 0,005 мкМ с шагом разведения в 3 раза. Реакционная смесь содержала 10 мкМ ^{33}P -АТФ и буфер, состоящий из 20 мМ HEPES (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ EGTA, 0,01% Brij35, 0,02 мг/мл BSA, 0,1 мМ Na_3VO_4 , 2 мМ DTT, 1% DMSO. Необходимые кофакторы добавлялись индивидуально для каждой исследуемой киназы. Для определения концентрации полумаксимального ингибирования (англ. half-maximal inhibitory concentration, IC50) был проведен анализ зависимости остаточной активности киназы от концентрации ингибитора с применением нелинейной регрессии, основанной на четырехпараметрической логистической модели, реализованной в программном обеспечении GraphPad.

Подготовка тренировочного набора и обучение модели машинного обучения vScreenML.

Для тренировки модели машинного обучения был подготовлен набор данных, включающий истинные активные соединения (положительный класс) и ложные приманки (отрицательный класс) (рисунок 3А). Трехмерные модели активных лигандов в комплексе с мишенями были получены из базы данных Protein Data Bank (PDB) и отфильтрованы как по методу и качеству определения структуры, так и по физико-химическим свойствам основного лиганда. Набор ложных приманок был создан с помощью веб-сервера DUD-E (Mysinger *et al.*, 2012), генерирующего для каждого активного лиганда 50 молекул-приманок со сходными физико-химическими, но разными топологическими свойствами. Эти приманки были отфильтрованы аналогично активным соединениям, затем сгенерировали трехмерные конформеры и выровняли относительно пространственного положения активного лиганда. Для каждого активного соединения три наиболее похожие приманки были объединены со структурой мишени.

Далее были вычислены дескрипторы, включая энергетические, структурные и физико-химические характеристики, с использованием PyRosetta, RDKit (Landrum, 2010), PocketDruggability, BINANA (Durrant and McCammon, 2011), RF-Score (Wójcikowski, Zielenkiewicz and Siedlecki, 2015) и LUNA (Fassio *et al.*, 2022). Для выбора наиболее значимых дескрипторов использовали метод Sequential Backward Floating Selection (SBFS) в mlxtend (Raschka, 2018). Качество предсказаний оценивалось с помощью k-fold кросс-валидации (рисунок 3Б) в scikit-learn (Pedregosa *et al.*, 2011), при этом данные разбивали на группы, полученные в ходе кластеризации аминокислотных последовательностей мишеней с использованием MMSeq2 (Steinegger and Söding, 2017).

В качестве алгоритма классификации использовался Extreme Gradient Boosting (Chen and Guestrin, 2016). Оптимизация гиперпараметров, таких, как число деревьев, максимальная глубина и скорость обучения, выполнялась с помощью Optuna (Akiba *et al.*, 2019). Используя полученные дескрипторы, модель vScreenML предсказывает

вероятность принадлежности соединения к положительному классу (рисунок 3В): если вероятность больше 1/2, лиганд считается активным, и наоборот.

Программный код разработанного метода опубликован на GitHub - <https://github.com/gandrianov/vScreenML2>.

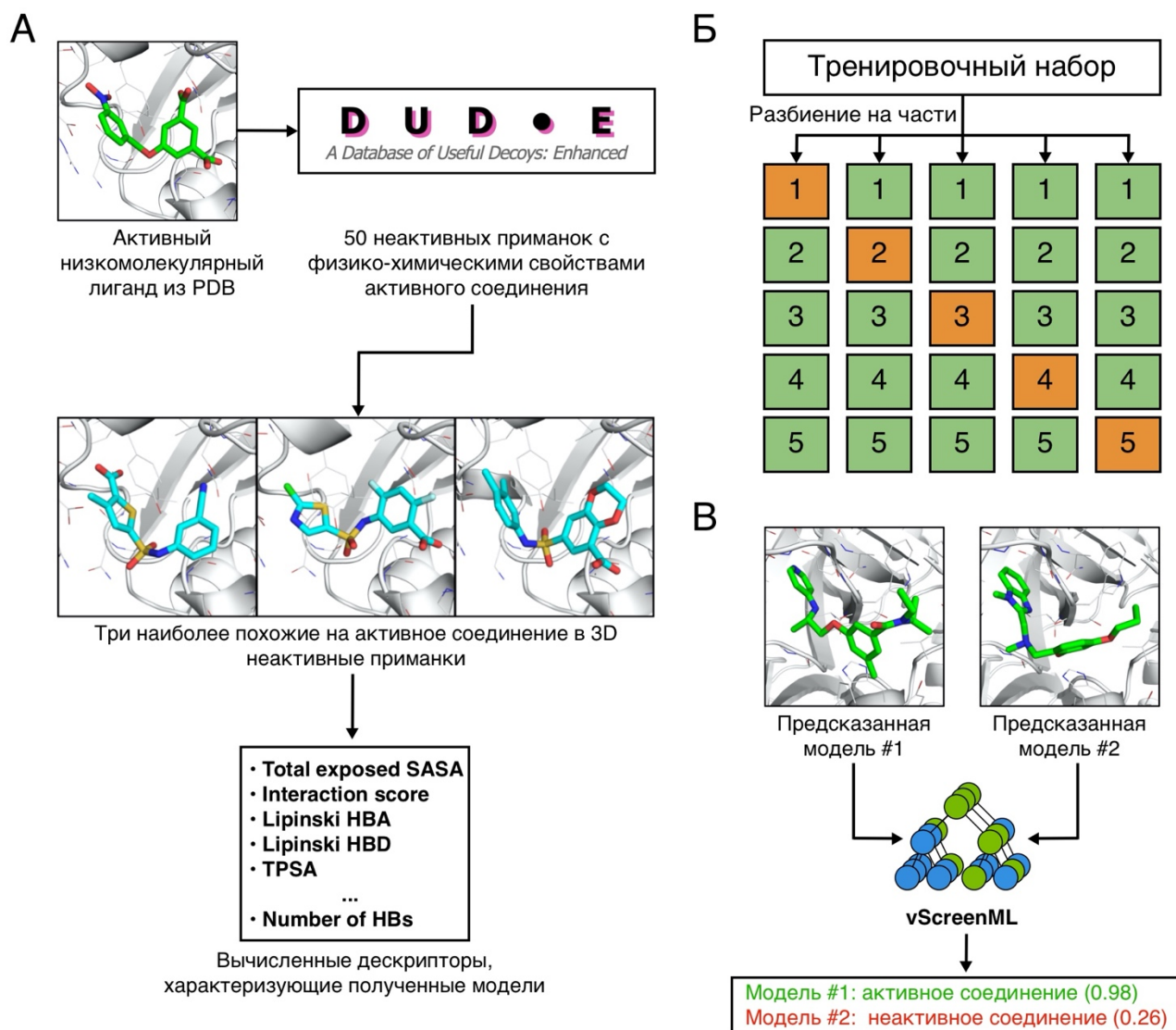


Рисунок 3 - Схема подготовки обучающего набора, тренировки модели и предсказания класса. (А) тренировочный набор состоит из активных лигандов из PDB и неактивных приманок из DUD-E; (Б) пример k -fold валидации при $k = 5$, где тренировочный набор делится на пять частей: четыре используются для обучения модели (зеленые ячейки), а одна для тестирования (оранжевая ячейка); (В) предсказание класса для двух структур: 1) первый пример имеет вероятность 0,98 (т.е. высокий шанс активности соединения), второй - 0,26 (т.е. низкий шанс активности).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн ингибиторов ПК фрагментно-ориентированным методом. Для оценки эффективности разработанного метода, были выбраны шесть АТФ-конкурентных ингибиторов ПК: MC180295, BDBM50091276, BDBM7773, дакомитиниб, CHIR-124 и BDBM50246162 (Bramson *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2006; Korecky *et al.*, 2008; Gajiwala *et al.*, 2013; Gazzard *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Каждое соединение имеет уникальный центральный фрагмент, взаимодействующий с шарнирной петлей ПК (рисунок 4). Проанализировав схемы синтеза исходных соединений, были подготовлены шаблоны для извлечения коммерчески доступных соединений из базы данных PubChem. При комбинировании полученные наборы новых соединений оказались очень большими - от 51 миллиона до 2×10^{17} соединений.

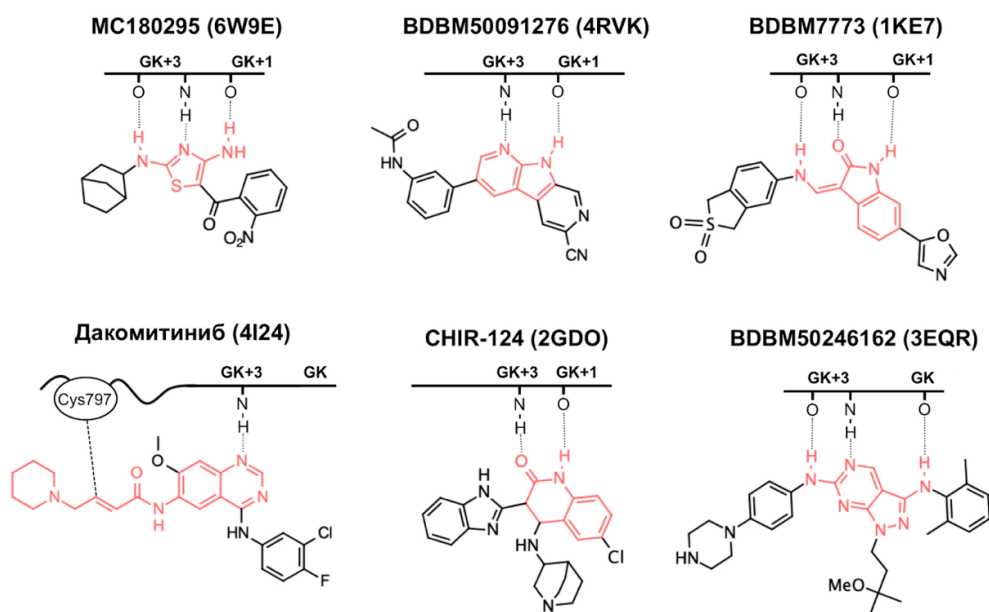


Рисунок 4 - Киназные ингибиторы, использованные для оптимизации с помощью разработанного метода. Каждое соединение имеет центральную часть (показана красным), которая взаимодействует с шарнирной петлей (нумерация аминокислот начинается от аминокислоты-привратника (англ. gatekeeper, GK)). Ковалентное взаимодействие дакомитиниба отмечено пунктиром.

На первом этапе было проверено, способен ли метод предсказать структуру исходного ингибитора из его фрагментов. Сгенерировав фрагменты и объединив их в одну структуру, было обнаружено, что воссозданные ингибиторы приняли конформации, близкие к экспериментально установленным (рисунок 5). В случае BDBM50091276 (RMSD - 2,74 Å), BDBM7773 (RMSD - 2,51 Å) и BDBM50246162 (RMSD - 1,13 Å) боковая группа, находящаяся в переднем кармане, была перевернутой, в то время как у MC180295 некорректную конформацию приобрела группа, находящаяся в заднем кармане. Это могло произойти из-за ограничений, присущих моделированию в PyRosetta, которое игнорирует конформационную энтропию лиганда и явное влияние растворителя. При этом, несмотря на небольшое снижение точности

предсказаний, подобное упрощение позволяет существенно ускорить отбор потенциальных комбинаций фрагментов для экспериментальной проверки.

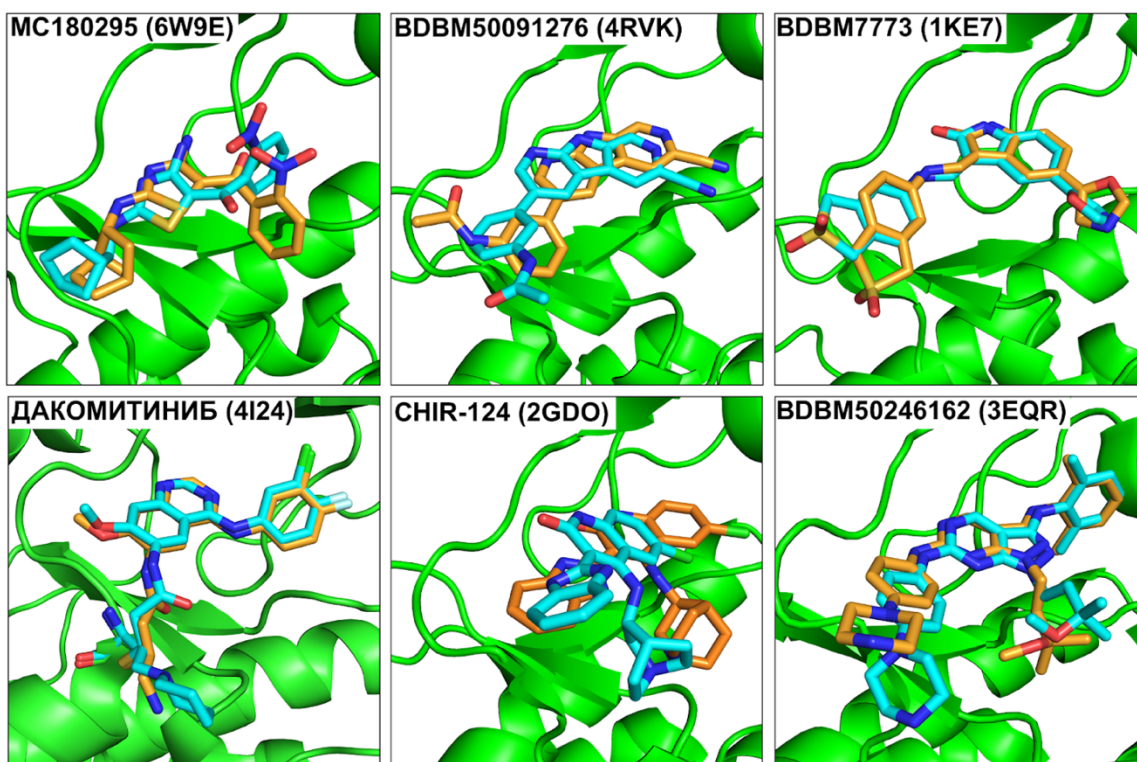


Рисунок 5 - Сравнение кристаллических структур исходных ингибиторов (оранжевая структура) и предсказанных при помощи разработанного нами метода (голубая структура).

Затем мы исследовали, может ли энергия взаимодействия полноразмерного соединения быть предсказана суммой энергий его фрагментов. Для каждой библиотеки были созданы репрезентативные наборы фрагментов, которые затем были объединены в полноразмерные соединения. Результаты показали, что прослеживается зависимость между положением общего центрального скаффолда фрагментов и точностью предсказанной энергии полноразмерного соединения. Так, для библиотек, построенных на структуре MC180295, BDBM50091276, BDBM7773 и дакомитиниба, предсказанная энергия взаимодействия фрагментов явно коррелирует с явно вычисленной энергией (рисунок 6). Например, коэффициент корреляции Спирмена составил 0,76 ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) для MC180295, 0,64 ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) для BDBM50091276, 0,51 ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) для BDBM7773 и 0,7 ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) для дакомитиниба. Однако для соединений с тремя оптимизируемыми группами точность значительно падает, как показано на примере библиотек на основе CHIR-124 и BDBM50246162, где коэффициенты корреляции составили 0,26 ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) и 0,1 ($p = 9.9 \times 10^{-8}$) соответственно. Таким образом, необходимо учитывать подвижность скаффолда при выборе исходного соединения для оптимизации.

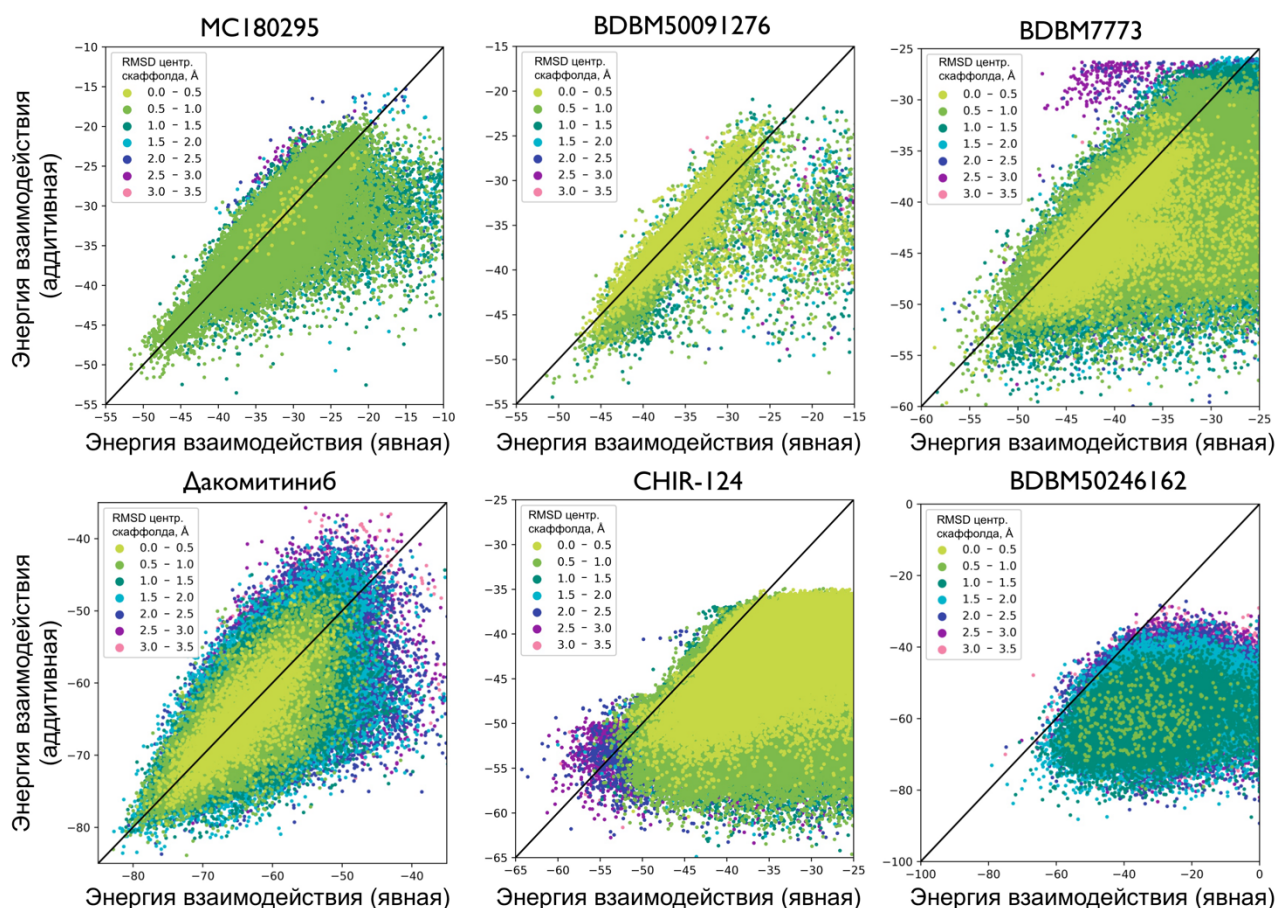


Рисунок 6 - Сравнение энергий взаимодействия полноразмерных соединений, рассчитанных на основе суммы энергий фрагментов (аддитивная энергия), и после явного объединения пары фрагментов (явная энергия). Различие в положении объединяемой центральной части фрагментов представлено в виде RMSD (цветные точки). Значения энергии взаимодействия указаны в энергетических единицах PyRosetta (ЭЕР).

Для оценки эффективности обнаружения потенциально активных соединений методом при работе с большими библиотеками в каждую из шести библиотек фрагментов были добавлены структуры исходных ингибиторов и их активных аналогов с IC50 менее 1 мкМ. Этот эксперимент аналогичен оценке точности программ молекулярного докинга, где анализируется способность программы точно различать активные и неактивные соединения (Lagarde, Zagury and Montes, 2015; Chaput *et al.*, 2016; Réau *et al.*, 2018; Ballester, 2019; Stein *et al.*, 2021). Общепринятым допущением является инертность большинства сгенерированных соединений, и задача метода - обнаружить известные активные соединения с минимальными вычислительными затратами. Предполагается, что активные соединения будут демонстрировать наилучшие значения энергии взаимодействия в сравнении с другими соединениями в библиотеке. Если же для значительного числа сгенерированных соединений предсказывается эффективность выше, чем для известных активных соединений, то это может свидетельствовать о неспособности метода отличать активные соединения от неактивных. Однако следует отметить, что некоторые сгенерированные соединения действительно могут быть более активными благодаря наличию общего центрального скаффолда и схожих периферийных групп с известными ингибиторами.

Результаты эксперимента показали, что эффективность выявления активных соединений с использованием предложенного метода значительно превышает результаты случайного перебора (рисунок 7): для обнаружения хотя бы 5 активных соединений требуется проверить 3,8% соединений из библиотеки MC180295, 0,8% из библиотеки BDBM50091276, 0,0034% из BDBM7773, $5,18 \cdot 10^{-7}\%$ из библиотеки дакомитиниба, $9,35 \cdot 10^{-7}\%$ из CHIR-124 и всего $2,0 \cdot 10^{-12}\%$ из библиотеки BDBM50246162. Метод можно использовать (с небольшой потерей эффективности) даже если скрининг выполняется со структурой мишени, не оптимизированной под исходный ингибитор.

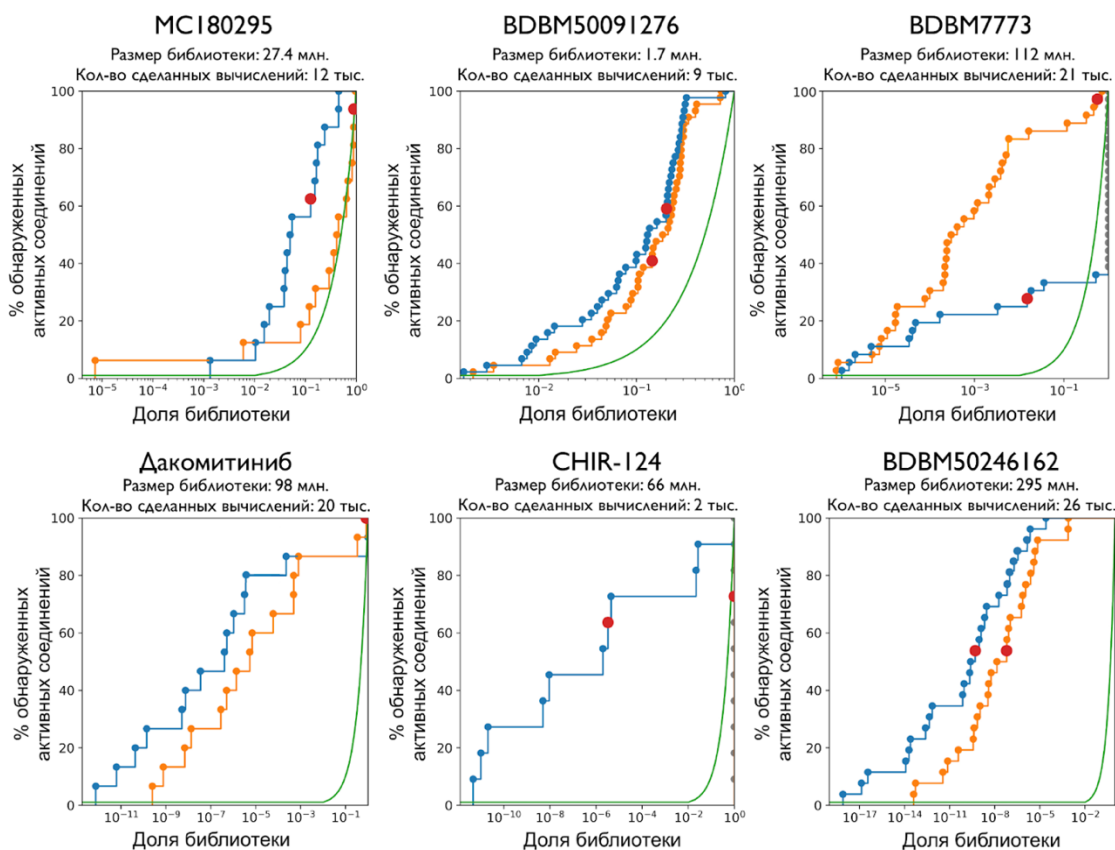


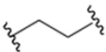
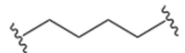
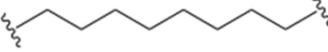
Рисунок 7 - Ранжирование активных соединений относительно сгенерированных химических библиотек. Исходные ингибиторы (красные точки) и их структурные аналоги (голубые и оранжевые точки), а также две структуры мишени – оптимизированная под исходный ингибитор (голубая линия) и неоптимизированная, связанная с АТФ (оранжевая линия) были использованы для скрининга. Соединениям, утратившим взаимодействие с шарнирной петлей ходе скрининга, был присвоен самый низкий ранг (серые точки). Для сравнения показана эффективность случайного перебора соединений (зеленая линия).

Предсказание эффективности PROTAC путем моделирования тройного комплекса. Количество кристаллических структур тройных комплексов мишень–PROTAC–ЕЗ в PDB недостаточно для полноценного анализа, и остается открытым вопрос о репрезентативности этих структур из-за подвижности комплекса и множества способов взаимодействия. В связи с этим, вместо сравнения предсказаний пространственного расположения компонентов тройного комплекса с экспериментальными данными, мы сопоставили экспериментальные показатели

эффективности деградации различных мишеней с разработанной нами оценкой совместимости компонентов тройного комплекса (ДСК).

При разработке новых PROTAC одним из ключевых этапов является подбор оптимального линкера, который может эффективно объединить функциональные фрагменты, взаимодействующие с мишенью и ЕЗ, не изменяя при этом их взаимное расположение. На первом этапе нашего исследования мы проверили, способен ли разработанный метод облегчить выбор линкера. Для этого были использованы литературные данные о серии пяти молекул PROTAC, разработанных для деградации Brd4^{BD1} с помощью ЕЗ CRBN (Nowak *et al.*, 2018). Все соединения имели идентичные функциональные фрагменты и различались только длиной алкильного линкера. На основе кристаллических структур Brd4^{BD1} (PDB ID: 3MXF) и CRBN (PDB ID: 4TZ4) было установлено соответствие между предсказанными значениями ДСК и экспериментальной эффективностью деградации (таблица 1). Результаты показали, что более высокие значения ДСК соответствуют лучшей экспериментальной эффективности деградации мишени, то есть количество образующихся совместимых комплексов оказывает прямое влияние на успешность деградации.

Таблица 1 - Соответствие между эффективностью деградации и ДСК

PROTAC	Линкер	Кол-во совместимых комплексов (кол-во конформеров линкера)	ДСК	Деградация Brd4 ^{BD1} (EC50, нМ)
ZXH-3-27		0 (237)	0,00	> 10000
ZXH-2-147		21 (606)	0,01	10 - 100
ZXH-2-184		520 (1 000)	0,10	10 - 100
ZXH-3-26		1 214 (1 000)	0,24	1 - 10
dBet70		1 257 (1 000)	0,25	1 - 10

Далее метод был применен для анализа взаимодействия PROTAC, разработанных для деградации ПК. В литературе описаны две структуры PROTAC, где в качестве лиганда мишени использовался неселективный ингибитор киназ форетиниб, а функциональные фрагмента связывались либо с ЕЗ VHL, либо с CRBN (Bondeson *et al.*, 2018). Экспериментально было установлено, что некоторые из исследованных киназ деградировали сильнее под воздействием PROTAC с VHL (PROTAC1), а некоторые - с CRBN (PROTAC2). Для сравнения предсказаний метода с экспериментальными данными были использованы кристаллические структуры ПК с-Met (PDB ID: 3LQ8), EphA2 (PDB ID: 5IA4) и STK10 (PDB ID: 6I2Y) в комплексе с

форетинибом, а также структуры VHL (PDB ID: 4W9H) и CRBN (PDB ID: 4TZ4). Применение метода к каждой паре ПК-PROTAC-E3 также показало согласованность наших результатов с экспериментальными данными: PROTAC1 имеет высокое значение ДСК, равное 0,66 для с-Met, а PROTAC2 — для EphA2 и с-Met, составляющие 0,27 и 0,23, соответственно (таблица 2).

Таблица 2 - ДСК PROTAC, основанных на структуре форетиниба

Тройной комплекс	Кол-во совместимых комплексов (кол-во конформеров линкера)	ДСК	% деградации (1 мкМ PROTAC)
PROTAC1			
с-Met-PROTAC1-VHL	3 308 (1 000)	0,66	38
EphA2-PROTAC1-VHL	809 (1 000)	0,16	4
STK10-PROTAC1-VHL	879 (1 000)	0,18	1
PROTAC2			
с-Met-PROTAC2-CRBN	1 141 (1 000)	0,23	35
EphA2-PROTAC2-CRBN	1 339 (1 000)	0,27	41
STK10-PROTAC2-CRBN	8 (1 000)	0,00	0

Поскольку в обоих PROTAC использовался общий лиганд для мишени, возникшая селективность, вероятно, связана с различиями в формировании тройного комплекса, т.е. различия внешней поверхности каталитического домена ПК влияют на распознавание E3 VHL и CRBN. Согласно предсказанным совместимым моделям тройного комплекса, взаимодействие VHL с с-Met включает неконсервативные области внешней поверхности домена (рисунок 8).

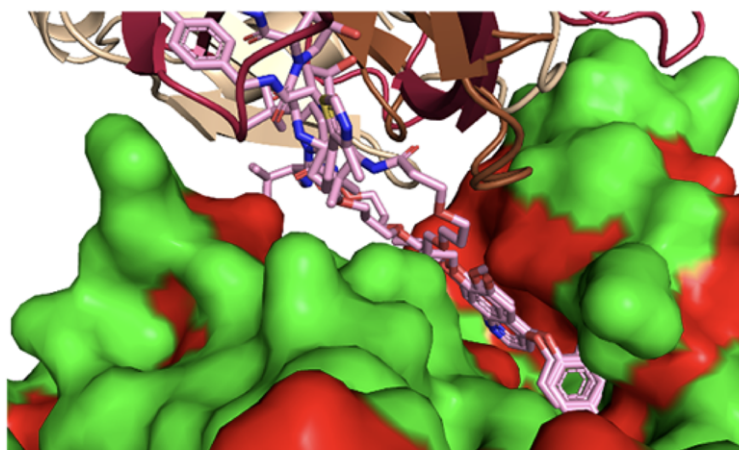


Рисунок 8 - Консервативность аминокислот на внешней поверхности каталитического домена ПК в предсказанных моделях тройного комплекса на примере с-Met-PROTAC1-VHL. Участки с высокой консервативностью обозначены красным цветом, а с низкой – зеленым. PROTAC отображен розовым цветом, VHL светло- и темно-коричневым.

Поиск новых ингибиторов традиционным методом виртуального скрининга. Для подбора новых возможных ингибиторов ПК CDK2 и CDK9 был выполнен поиск по молекулярному подобию, один из наиболее эффективных методов традиционного виртуального скрининга. Из каталога компании Enamine было извлечено 7 809 структур соединений с аминотиазольным центральным фрагментом. Для каждого соединения был сгенерирован набор трехмерных конформеров, которые затем были выровнены относительно структур известных ингибиторов ПК, представленных в PDB.

Поскольку АТФ-конкурентные ингибиторы занимают консервативное положение в связывающем сайте, особенно в области шарнирной петли, то предполагается, что новые соединения с аналогичным расположением будут обладать более высокой вероятностью проявления активности. Структурный анализ выявил, что большинство исследуемых соединений имеет наибольшее сходство в трехмерном пространстве с известными ингибиторами в диапазоне 1,0–1,2 по TanimotoCombo. Это указывает на наличие структурных мотивов, способствующих повышенной вероятности взаимодействия с мишенью.

Затем выровненные конформации были использованы для виртуального скрининга в комплексах с CDK2 (PDB ID: 3QHW) и CDK9 (PDB ID: 3BLQ). Распределение энергии взаимодействия оказались схожими для обеих ПК: от -5 до -42 ЭЕР (медиана -23,78 ЭЕР) для CDK2 и от -5 до -37 ЭЕР (медиана -24,18 ЭЕР) для CDK9.

Для экспериментальной проверки было отобрано 22 соединения, из которых лишь 10 продемонстрировали значение IC₅₀ ниже 100 мкМ, и лишь одно из них – ниже 1 мкМ (рисунок 9).

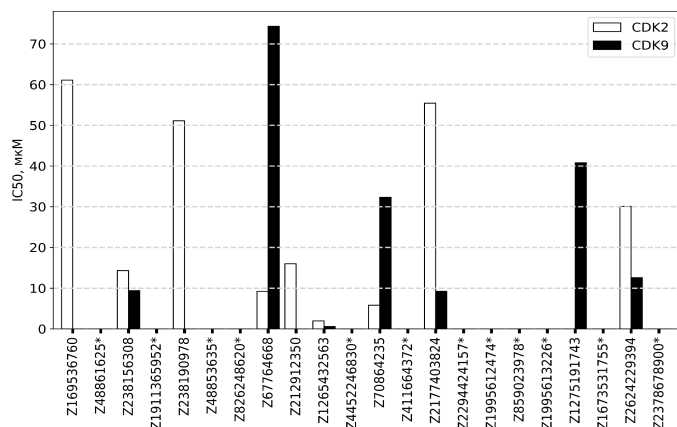


Рисунок 9 - Активность *in vitro* отобранных соединений при помощи традиционного метода виртуального скрининга. Соединения, отмеченные *, не показали какого-либо ингибирующего действия.

Эксперимент продемонстрировал как преимущества, так и ограничения традиционных методов виртуального скрининга. Менее половины отобранных соединений показали значение IC₅₀ менее 100 мкМ, т.е. чуть больше половины всех предсказаний оказались ложно положительными. Таким образом, многие обнаруженные вещества обладают недостаточной активностью и требуют значительных усилий по дальнейшей оптимизации.

Классификация предсказанных моделей при помощи vScreenML. Включение машинного обучения в процесс разработки лекарственных средств

позволяет решить проблему большого количества ложноположительных результатов, часто возникающих при использовании традиционных методов виртуального скрининга. В данном контексте традиционные методы генерируют гипотезы, а машинное обучение выступает в роли дискриминатора, различающего потенциально активные и ложные модели. Для улучшения этих предсказаний была разработана улучшенная версия программного пакета vScreenML, оптимизированная для нужд структурно-ориентированного дизайна лекарственных соединений.

Для обучения vScreenML из PDB был отобран 1 321 комплекс с приемлемым качеством трехмерных структур, где основной лиганд которых соответствовал физико-химическим свойствам лекарственных соединений. Затем были сгенерированы ложные приманки, имитирующие свойства активных соединений. Три наиболее похожие в 3D-пространстве приманки были объединены с мишенью, что позволило сформировать тренировочный набор данных, включающий как истинные, так и ложные взаимодействия.

Для повышения устойчивости к шуму и сокращения вычислительных затрат количество дескрипторов, характеризующих энергетические, структурные и физико-химические свойства полученных моделей, было уменьшено с 165 до 49. Оценка предсказаний в процессе отбора дескрипторов выполнялась при помощи k-fold кросс-валидации, где k было равно 269 (количество кластеров последовательностей мишеней в обучающем наборе). После оптимизации гиперпараметров новой модели vScreenML точность предсказаний на новом тренировочном наборе составила 0,95, прецизионность - 0,95, полнота - 0,89 и ККМ - 0,89 (рисунок 10).

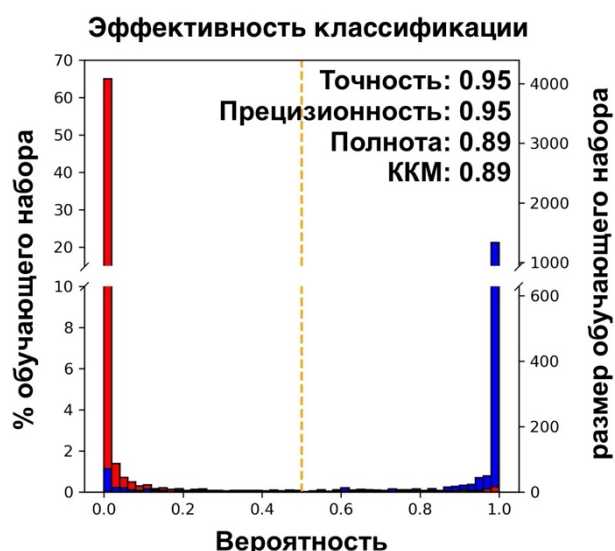


Рисунок 10 - Эффективность классификации на новом тренировочном наборе. Распределение значений предсказания vScreenML относительно класса приманок (красные столбцы, класс 0) и класса активных соединений (синие столбцы, класс 1). Вероятность активности лиганда каждой модели вычислялась в ходе k-fold кросс-валидации ($k=269$)

Точность предсказаний vScreenML была оценена на наборе DEKOIS2 (Bauer *et al.*, 2013), который является стандартом для сравнительного анализа новых методов молекулярной стыковки. Набор включает 30-40 активных лигандов и 800-1 200 приманок для 81 мишени. Для оценки эффективности классификации был использован фактор обогащения на 1% (англ. enrichment factor in 1%, EF1%) - для каждого исследуемого лиганда была рассчитана вероятность быть активным, после чего

определялось количество истинно активных соединений среди 1% наиболее вероятных структур во всем исследуемом наборе.

При сравнении с различными оценочными функциями было показано, что vScreenML превосходит такие эмпирические функции оценки, как AA-Score (Pan *et al.*, 2022) и AutoDock Vina (McNutt *et al.*, 2021), демонстрируя медианный фактор обогащения EF1% на уровне 7,64% по сравнению с 5,02% у AA-Score и 2,61% у AutoDock Vina. Модель также продемонстрировала конкурентоспособность с CNNAffinity (McNutt *et al.*, 2021), значительно улучшив точность предсказаний для 28 мишеней. Следует отметить, что методы ранжирования моделей, реализованные в моделях глубокого обучения, таких как KarmaDock (Zhang *et al.*, 2023) и RTMScore (Shen *et al.*, 2022), были исключены из сравнения, поскольку набор данных, использованный для тренировки этих моделей, пересекается с тестируемым набором DEKOIS2, что может значительно исказить результаты предсказаний.

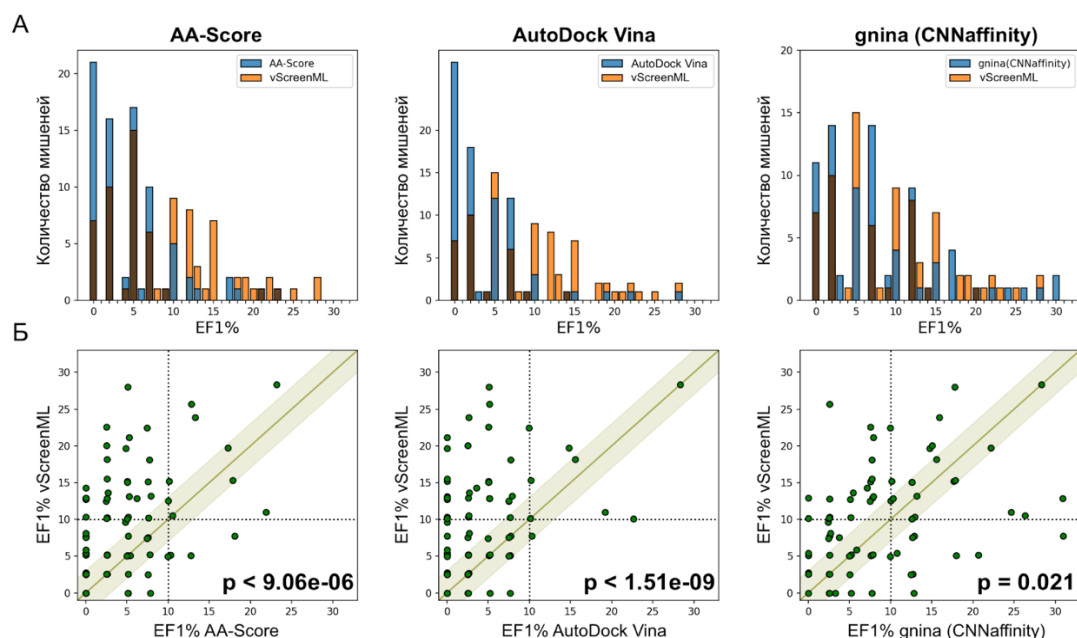


Рисунок 11 - Сравнительная характеристика производительности vScreenML, AA-Score, AutoDock Vina и gnina (CNNAffinity) на наборе DEKOIS2. (А) распределение значений EF1% для AA-Score, AutoDock Vina и CNNAffinity (синие столбцы) и vScreenML (оранжевые столбцы). Значения столбцов начинаются от нуля и в случае наложения друг на друга имеют темно-синий и коричневые цвета; (Б) - соответствие значений EF1% между разными программами. Зеленая диагональная линия иллюстрирует равенство значений EF1% между сравниваемыми методами (с допуском 3% различия между значениями). Значение p было вычислено с помощью биномиального теста.

На завершающем этапе исследования была оценена эффективность предсказаний vScreenML на 22 ингибиторах CDK2 и CDK9, отобранных ранее. Для сравнения с экспериментальными данными соединения были разделены на активные ($IC_{50} < 100$ мкМ) и неактивные ($IC_{50} > 100$ мкМ). Обновленная vScreenML показала точность 79,54%, правильно классифицировав 45,45% неактивных и 34,09% активных соединений, при этом лишь 4,55% были ошибочно отнесены к неактивным, а 15,91% — к активным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С ростом интереса к киназам как терапевтическим мишеням количество разрабатываемых ингибиторов увеличивается ежегодно; соответственно, развиваются и новые вычислительные методы их структурной оптимизации.

Развитие комбинаторной химии существенно увеличило количество и разнообразие соединений. Компания Enamine, например, расширила список доступных соединений до 19 миллиардов, что превышает возможности классических методов виртуального скрининга. Одним из решений является декомпозиция соединений на уникальные фрагменты с последующим их скринингом. Благодаря этому наш метод позволяет проанализировать огромные коллекции соединений в кратчайшее время, поскольку сродство полноразмерных соединений с мишенью рассчитывается исходя из аддитивности сродства фрагментов, входящих в их структуру. Ограничением метода является сохранение положения центрального скаффолда; если соединение изменяет способ взаимодействия со связывающим сайтом при оптимизации фрагмента, то эффект будет непредсказуемым (Kramer, Fuchs and Liedl, 2015). Одним из весомых преимуществ нашего метода по сравнению с ранее примененными (например, (Sydow *et al.*, 2020)) являются лучшие шансы синтезировать теоретически предложенные соединения, так как библиотека построена по экспериментально подтвержденной схеме синтеза и с использованием коммерчески доступных строительных блоков.

Для решения проблемы селективного уменьшения активности ПК был разработан метод для предсказания совместимости PROTAC с мишенью и лигазой E3. Введенная оценка ДСК коррелирует с экспериментальным значением деградации мишени и полезна при ранжировании перспективных структур линкера или лигазы E3, хотя и не для точной оценки активности PROTAC.

Анализ традиционных методов виртуального скрининга показал, что их предсказательная эффективность невысока: из 22 соединений только 10 имели $IC_{50} < 100$ мкМ. Однако в сочетании с машинным обучением такие методы остаются важными инструментами в разработке лекарств, особенно для решения проблемы ложноположительных результатов. Модель vScreenML, обученная на активных соединениях и ложных приманках, демонстрирует высокую точность при отборе потенциальных ингибиторов CDK2 и CDK9, подтверждая свою применимость в виртуальном скрининге.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный фрагментно-ориентированный метод обеспечил значительное ускорение анализа многомиллионных библиотек соединений (продемонстрированное на примере циклин-зависимых киназ 2 и 9, киназы контрольной точки 1, рецептора эпидермального фактора роста с мутацией T790M и активированной CDC42-ассоциированной киназы 1) за счет предварительного скрининга отдельных фрагментов и использования аддитивного подхода к предсказанию энергии взаимодействия полноразмерных соединений с мишенью.
2. Созданный метод моделирования взаимного положения компонентов тройного комплекса предсказал совместимость серий протеолиз-таргетированных химер с различными конфигурациями линкера, предназначенных для одновременного взаимодействия с первым бромодоменом бромодоменсодержащего белка 4 и церебллоном, а также селективность действия протеолиз-таргетированных химер, взаимодействующих с тирозиновой протеинкиназой Met, рецептором эфрина типа A2 и серин/треониновой протеинкиназой 10. Разработанная нами метрика доли совместимых комплексов показала высокую согласованность с экспериментальными данными об эффективности деградации протеинкиназ.
3. Традиционные методы виртуального скрининга продемонстрировали недостаточно высокую точность в ходе предсказания эффективных ингибиторов циклин-зависимых киназ 2 и 9: лишь 45% соединений показали ингибирующий эффект *in vitro*. Внедрение модели машинного обучения vScreenML повысило точность предсказаний до 79,5%, значительно сократив количество ложноположительных результатов.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI ¹

1. **Andrianov G.V.**, Gabriel Ong W.J., Serebriiskii I., Karanickolas J. Efficient Hit-to-Lead Searching of Kinase Inhibitor Chemical Space via Computational Fragment Merging // Journal of Chemical Information and Modeling. - 2021. - Vol. 61, № 12. - P. 5967-5987. doi: 10.1021/acs.jcim.1c00630. JIF (для WoS) = **5,6** (1,31 / 0,33)
2. Bai N., Miller S.A., **Andrianov G.V.**, Yates M., Kirubakaran P., Karanickolas J. Rationalizing PROTAC-Mediated Ternary Complex Formation Using Rosetta // Journal of Chemical Information and Modeling. - 2021. - Vol. 61, № 3. - P. 1368-1382. doi: 10.1021/acs.jcim.0c01451. JIF (для WoS) = **5,6** (0,93 / 0,16)
3. **Антрианов Г.В.**, Серебрянский И.Г. Идентификация новых ингибиторов киназной активности CDK2 и CDK9 методами молекулярного моделирования и высокоэффективного скрининга // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки / Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki. - 2021. - Т. 163, кн. 4. - С. 543–556. doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.543-556. JIF (для WoS) = **0,4** (0,86 / 0,43)
4. **Andrianov G.V.**, Haroldsen E., Karanickolas J. vScreenML v2.0: Improved Machine Learning Classification for Reducing False Positives in Structure-Based Virtual Screening // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, №22 – P. 12350. doi: 10.3390/ijms252212350. JIF (для WoS) = **4,9**, (0,74 / 0,25)

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Miller S.A., **Andrianov G.V.**, Mischley V., Wharton K.A., Chen J.J., Karanickolas J. Computational Modeling of PROTAC Ternary Complexes and Linker Design. In Inducing Targeted Protein Degradation // Inducing Targeted Protein Degradation: From Chemical Biology to Drug Discovery and Clinical Applications / Ed. by P. Cromm. Weinheim: Wiley-VCH, 2023. P. 151-176. doi: 10.1002/9783527836208.ch5 (1,63 / 0,27)

¹ В скобках приведён объём публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ	- аденозинтрифосфорная кислота
ГТФ	- гуанозинтрифосфорная кислота
ДСК	- доля совместимых комплексов, отражающая насколько PROTAC совместима с мишенью и убиквитинлигазой E3
ККМ	- коэффициент корреляции Мэтьюса (англ. Matthews correlation coefficient)
ПК	- протеинкиназа
ЭЕР	- энергетические единицы Rosetta
АСК1	- активированная CDC42-ассоциированная киназа 1 (англ. activated CDC42 kinase 1)
Brd4^{BD1}	- первый бромодомен бромодоменсодержащего белка 4 (англ. bromodomain containing protein 4 bromodomain 1)
Brij35	- полиоксиэтилен(23)-лауриловый эфир (англ. polyoxyethylene (23) lauryl ether)
BSA	- бычий сывороточный альбумин (англ. bovine serum albumin)
c-Met	- тирозиновая протеинкиназа Met (англ. tyrosine-protein kinase Met)
CDK2	- циклинзависимая киназа 2 (англ. cyclin-dependent kinase 2)
CDK9	- циклинзависимая киназа 9 (англ. cyclin-dependent kinase 9)
CHK1	- киназа контрольной точки 1 (англ. checkpoint kinase 1)
CRBN	- убиквитин лигаза E3 цереблон (англ. Cereblon)
DMSO	- диметилсульфоксид (англ. dimethyl sulfoxide)
DTT	- дитиотреитол (англ. dithiothreitol)
EC50	- полумаксимальная эффективная концентрация (англ. Half Maximal Effective Concentration)
EF1%	- фактор обогащения на 1% (англ. enrichment factor in 1%)
EGFR	- рецептор фактора роста эндотелия (англ. epidermal growth factor receptor)
EGTA	- этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (англ. ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)
EphA2	- рецептор эфрина типа A2 (англ. ephrin type-A receptor 2)
GK	- аминокислота-привратник шарнирного региона (англ. gatekeeper)
HEPES	- 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IC50	- полумаксимальная концентрация ингибирования (англ. half Maximal Inhibition Concentration)
PDB	- банк данных трёхмерных структур белков (англ. Protein Data Bank)
PROTAC	- протеолиз-таргетированная химера (англ. PROteolysis TArgeting Chimera)
RMSD	- среднеквадратическое отклонение (англ. Root Mean Square Deviation)
STK10	- серин/треониновая протеинкиназа 10 (англ. Serine/threonine protein kinase 10)
VHL	- опухолевый супрессор Гиппеля—Линдау (англ. Von Hippel–Lindau tumor suppressor)