

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ С АНТИМИЕЛОМНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ ТАЛИДОМИДА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Ринейская О. Н., Баньковский А. А.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В работе на основе молекулы талидомида выполнен дизайн различных его производных *in silico* и проведен молекулярный докинг с основным белком-мишенью — цереблон (CRBN). Выявлен наилучший лиганд, проанализированы пространственная структура и характер его взаимодействий на основании изменения энергии связывания и константы ингибирования. Полученные данные оценивались в сравнении с показателями талидомида и помалидомида. Последний известен как наиболее эффективное производное талидомида, применяющееся в клинике в лечении множественной миеломы.

Ключевые слова: множественная миелома, талидомид, цереблон, докинг, AutoDock.

Введение. Множественная миелома (ММ), представляет собой заболевание, характеризующееся малигнизацией плазматических клеток с последующей продукцией аномальных антител. На начальной стадии протекает бессимптомно, но по мере прогрессирования могут возникать гиперкальциемия, анемия, дисфункция почек и различного рода инфекции и др. В ряде случаев развивается амилоидоз. ММ является вторым по распространенности злокачественным заболеванием крови после неходжкинской лимфомы. Заболевание диагностируется преиму-

щественно в гериатрической популяции со средним возрастом при постановке диагноза около 70 лет и несколько чаще встречается у мужчин, чем у женщин (1,4:1) [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 г. во всем мире множественная миелома была диагностирована у 176 404 человек, в то время как умерло 117 077 человек (рисунки 1, 2). При современных методах лечения выживаемость обычно составляет 4–5 лет. Пятилетняя выживаемость составляет около 54 % [2].

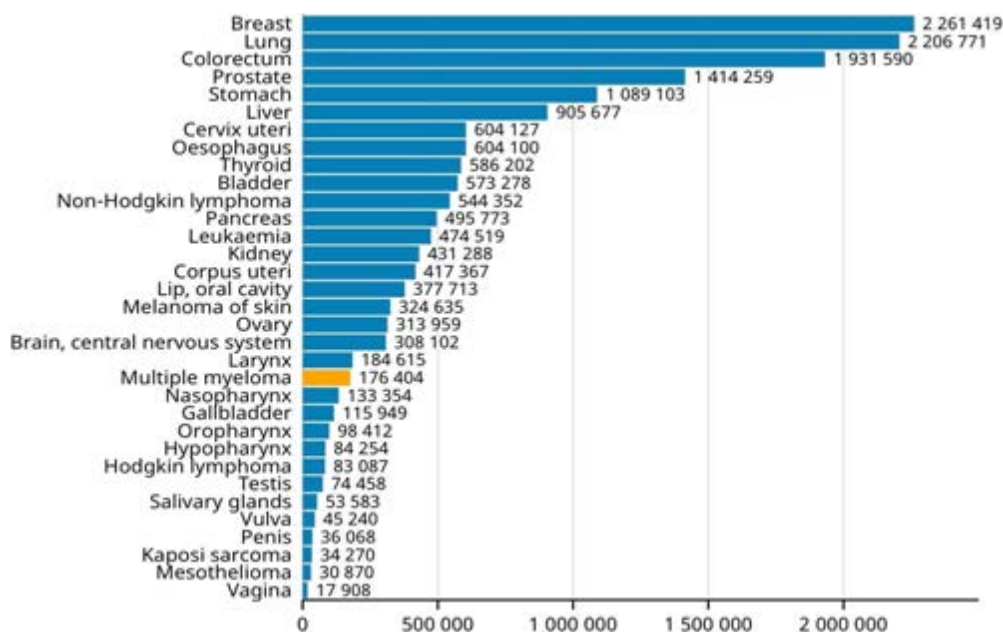


Рисунок 1 — Количество новых случаев онкологических заболеваний в 2020 г.

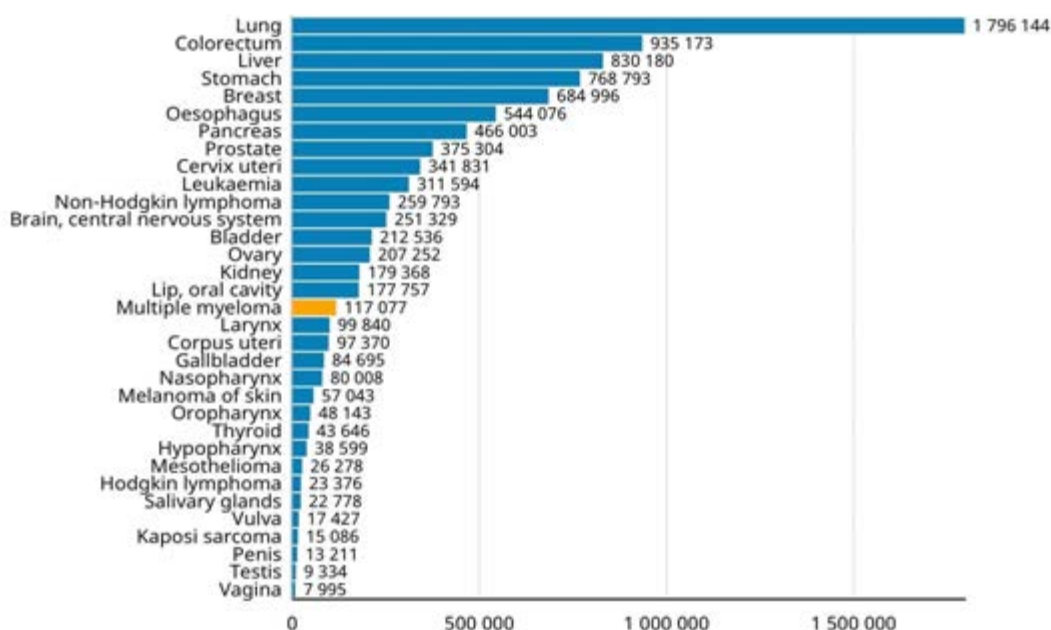


Рисунок 2 — Количество смертей от онкологических заболеваний в 2020 г.

Несмотря на то что ММ является далеко не самым распространенным злокачественным заболеванием все же на сегодняшний день оно остается неизлечимым и высоколетальным, поэтому вопрос о поиске более эффективных лекарств и схем комплексной терапии до сих пор остается крайне актуальным.

В 1999 г. было доказано, что талидомид эффективен в борьбе против ММ. Однако позже были разработаны структурные производные талидомида: леналидомид и помалидомид. Именно они в настоящее время применяются в клинической практике, а последний (помалидомид) зарекомендовал себя как наиболее терапевтически эффективный.

Несмотря на относительно простую химическую структуру, физико-химические свойства талидомида довольно сложны. Молекула талидомида содержит хиральный

центр. В соответствии с R/S-номенклатурой стереоизомеров различают правовращающий (R-) и левовращающий (S-) изомеры. В 1979 г. было обнаружено, что энантимеры проявляют разные биологические и физиологические свойства. Появилась теория о том, что именно (S)-энантиомер вызывает тератогенный эффект [3]. Впоследствии эта теория полностью подтвердилась.

Действующее вещество лекарственного средства представляло собой рацемат, в составе которого находился тератогенный (S)-изомер. Однако даже употребление (R)-изомера приводит к аномалиям развития плода. В настоящее время установлено, что энантимеры талидомида могут быстро рацемизироваться в растворе. Рацемизация происходит посредством keto-енольной таутомерии [4] (рисунок 3).

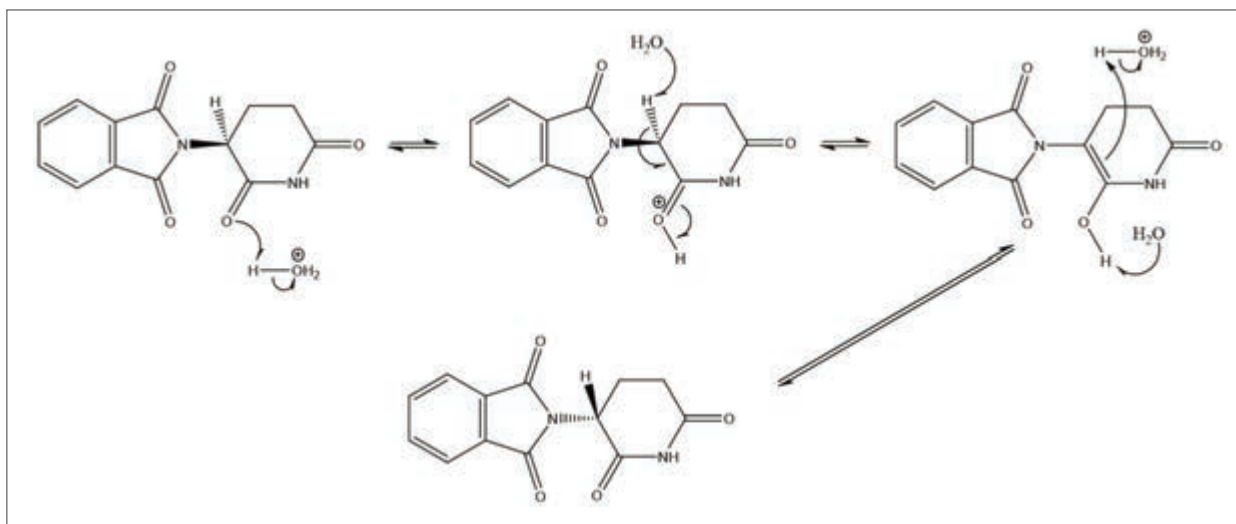


Рисунок 3 — Схема рацемизации талидомида в растворе

В 2010 г. было обнаружено, что единственным белком, связывающим талидомид, является цереблон (CRBN) [5]. Однако оказалось, что CRBN не был изолированным протеином. В действительности молекула талидомида связывается через CRBN с комплексом, в состав которого входит убиквитинлигаза, специфически «помечающая» определенные субстраты убиквитином, что необходимо для их деградации в протеасомах. Некоторые из субстратов продуцируются клетками ММ в избытке для их выживания. Они ответственны за такие важные для злокачественных клеток процессы, как неоангиогенез, адгезия, инвазия и метастазирование. Разрушение этих субстратов неизбежно

приводит к гибели клеток миеломы (рисунок 4).

С другой стороны, хорошо известно, что для корректной закладки органов и конечностей плода необходимо образование новых сосудов. Полностью механизмы действия талидомида и его ближайших производных до конца не изучены. В этом исследовании авторы опираются на наиболее достоверную теорию о том, что таргетное связывание талидомида с CRBN непосредственно коррелирует и с терапевтическими, и с тератогенными свойствами препарата. Следовательно, предстоит выявить с помощью методов молекулярного докинга более эффективно связывающийся с CRBN лиганд.

На основании полученных результатов можно предположительно судить о терапевтических эффектах и планировать дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo*. В контексте описанной

теории вопрос о снижении тератогенного действия потенциального препарата становится неуместным, поскольку белок-мишень является ответственным за оба эффекта.

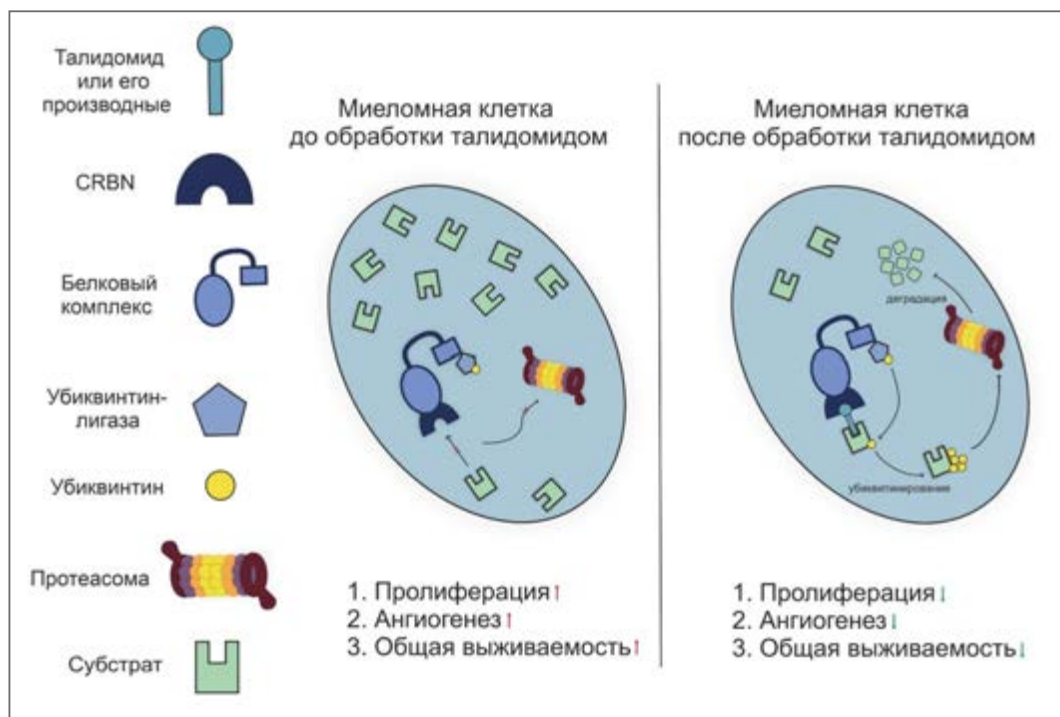


Рисунок 4 — CRBN-опосредованный механизм действия талидомида и его производных

Цель работы — моделирование и анализ *in silico* эффективности связывания талидомида и ряда его производных с протеином CRBN для выявления наиболее успешных образцов, перспективных в отношении антимиеломной активности.

В рамках данного исследования необходимо было повести молекулярный докинг, показать характеристики связывания различных производных талидомида с цереблном; выявить наиболее перспективное производное талидомида в отношении антимиеломной активности; проанализировать структуру сайта связывания лиганда с рецептором, оценить характер их взаимодействия.

Материалы и методы. Дизайн производных талидомида выполнен с помощью пакета программ ChemOffice. Трехмерная структура цереблona (ID 7bqu) была получена из базы данных Protein Data Bank (PDB) [6]. Для молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ:

AutoDock 4 [7] — для подготовки к стыковке рецептора, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий;

при помощи онлайн-сервера Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) был изучен характер взаимодействий потенциального препарата, произведен анализ архитектуры комплекса в сравнении с комплексом талидомида;

программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера различных форматов, требуемых программой AutoDock 4.

При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock использовался алгоритм поиска глобального минимума LGA (Ламаркианский генетический алгоритм). Взаимодействие лиганда и белка (аффинность) оценивалось при помощи характеристик, полученных в результате докинга: энергия связывания (изменение энергии Гиббса) и константа ингибирования.

Результаты и их обсуждение. В работе произведено конструирование и последующий анализ 17 структур, являющихся производными талидомида, полученными путем введения или удаления отдельных функциональных групп в пиперидиновый или изоиндолиновый фрагменты. Для удобства была составлена таблица лигандов (таблица 1)

Таблица 1 — Характеристики взаимодействия (энергия связывания E_b и константа ингибирования K_i) лиганд-рецептор производных

А									
А									
№	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	E_b , ккал/моль	K_i
1	-	O	CO	H	H	H	H	-9,28	157,64 nM
2	CH ₃ (R-)	O	CO	H	H	H	H	-9,08	219,44 nM
3	CH ₃ (S-)	O	CO	H	H	H	H	-8,57	522,40 nM
4	H	CH ₂	CO	H	H	H	H	-8,95	274,62 nM
5	H	CH ₂	C = CH ₂	H	H	H	H	-9,16	192,48 nM
6 (R-)	H	O	COOH	H	H	H	H	-7,71	2,23 μM
7 (S-)	H	O	COOH	H	H	H	H	-8,18	1,16 μM
8	H	O	CO	F	F	F	F	-8,56	533,86 nM
9	H	O	CO	F	F	H	F	-8,56	535,78 nM
10	H	O	CO	F	F	F	H	-8,52	566,03 nM
11	H	O	CO	F	H	H	F	-8,71	411,26 nM
12	H	O	CO	F	F	H	H	-8,64	461,06 nM
13	H	O	CO	F	H	F	H	-8,61	484,73 nM
14	H	O	CO	F	H	H	H	-8,71	409,41 nM
15	H	O	CO	H	H	F	H	-8,61	488,3 nM
Б									
№	Z ₁		E_b , ккал/моль	K_i					
16			-6,14	31,49 μM					
17			-6,34	22,6 μM					

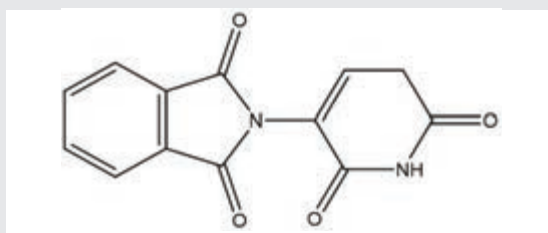


Рисунок 5 — Структурная формула 2-(2,6-ди-оксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона

В результате проведенного эксперимента *in silico* выявлен лиганд, наиболее эффективно связывающийся с CRBN, — 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион (рисунок 5, лиганд 1). K_i составила 157,64 nM при энергии связывания $E_b = -9,28$ ккал/моль (у талидомида $K_i = 330,95$ nM при $E_b = -8,84$ ккал/моль).

При этом он продемонстрировал более высокую аффинность к CRBN даже по сравнению с наиболее эффективным среди произво-

дных талидомида, применяющихся в клинике — помалидомидом ($K_i = 268,9$ нМ при $E_b = -8,97$ ккал/моль).

Характеристики отдельных видов взаимодействий 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропи-

ридин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона — лиганда 1 — с рецептором (гидрофобных, водородных и π -стэкинговых) представлены в таблицах 2, 3, 4.

Таблица 2 — Гидрофобные взаимодействия лиганда 1 с рецептором

№	Код аминокислотного остатка	Аминокислота	Расстояние между взаимодействующими атомами углерода, Å	Код атома лиганда	Код атома белка
1	352A	PRO	3,22	1059	317
2	380A	TRP	3,95	1056	589
3	386A	TRP	3,75	1058	655
4	386A	TRP	3,84	1055	648
5	402A	PHE	3,11	1055	811
6	402A	PHE	3,64	1056	809

Таблица 3 — Водородные связи лиганда 1 с рецептором

№	Код аминокислотного остатка	Аминокислота	Расстояние между водородом и акцепторным атомом, Å	Расстояние между донорным и акцепторным атомами, Å	Угол между донором, акцептором и атомом водорода	Код акцептора	Код донора
1	351A	ASN	1,94	2,87	156,04	308 [Nam]	1062 [Nam]
2	377A	GLU	2,18	2,72	112,73	556 [O2]	1049 [O2]
3	378A	HIS	2,77	3,35	105,91	569 [Npl]	1049 [O2]
4	386A	TRP	2,19	3,20	130,71	652 [Nar]	1049 [O2]
5	400A	TRP	1,75	2,57	146,62	780 [Nar]	1052 [O2]

Таблица 4 — π -стэкинговые взаимодействия лиганда 1 с рецептором

№	Код аминокислотного остатка	Аминокислота	Расстояние между центрами колец, Å	Углы между кольцами	Тип стэкинг-взаимодействия	Коды атомов лиганда
1	380A	TRP	4,05	28,22	Параллельное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056
2	386A	TRP	3,53	14,01	Параллельное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056
3	400A	TRP	4,66	87,19	Перпендикулярное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056
4	400A	TRP	5,06	87,12	Перпендикулярное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056

Важной особенностью этого комплекса по сравнению с комплексами талидомида и помалидомида является наличие π -стэкинговых взаимодействий между изоиндолиновым ядром лиганда с одной стороны и индольным фрагментом триптофана с другой. Причем

можно наблюдать 2 вида π -стэкинговых взаимодействий: параллельное и перпендикулярное. Молекула данного лиганда не имеет хиральных центров в отличие от остальных образцов. Молекула 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-дио-

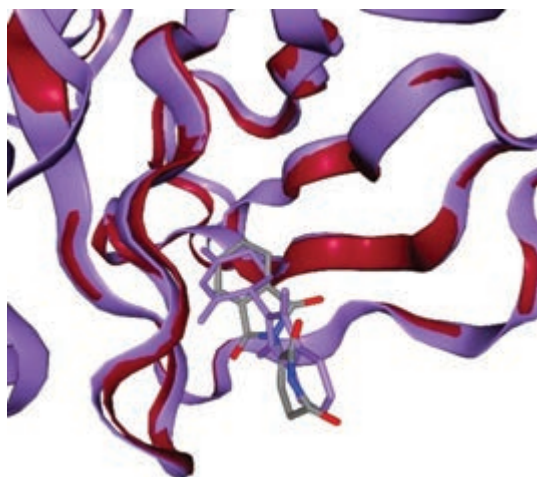


Рисунок 6 — Наложение друг на друга лиганда 1 и талидомида в активном сайте (серого и фиолетового цветов соответственно)

на погружается в структуру CRBN своим ароматическим фрагментом, что вероятно связано с меньшей конформационной подвижностью (рисунок 6), чего нельзя сказать о молекуле талидомида.

Именно этот факт обуславливает появление π -стэкинг-взаимодействий в архитектуре комплекса белка с лигандом. Возможно это объясняет более высокую аффинность данного лиганда по сравнению с талидомидом.

Заключение. Полученные результаты дают основание для прогнозирования более высокой терапевтической активности в отношении множественной миеломы у 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндоллин-1,3-диона и позволяют планировать дальнейшие исследования данного образца *in vitro*.

Список цитированных источников

1. Mateos, M. V. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Diagnosis and Epidemiology / M. V. Mateos, O. Landgren // Cancer Treat Res. — 2016. — Vol. 169. — P. 3–12.
2. Multiple myeloma Source: Globocan 2020 [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en. — Date of access: 20.05.2022.
3. Blaschke, G. Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere [Chromatographic separation of racemic thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers (author's translation)] / G. Blaschke, H. Kraft, K. Fickentscher, F. Kähler // Arzneimittelforschung. — 1979. — Vol. 29, № 10. — P. 1640–1642.
4. Enantiomerization mechanism of thalidomide and the role of water and hydroxide ions / C. Tian [et al.] // Chemistry. — 2012. — Vol. 18, № 45. — P. 14305–14313.
5. Ito, T. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito [et al.] // Science. — 2010. — Vol. 327, № 5971. — P. 1345–1350.
6. The Protein Data Bank / H. M. Berman [et al.] // Nucleic Acids Research. — 2000. — Vol. 28. — P. 235–242.
7. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris [et al.] // Computational Chemistry. — 2009. — № 16. — P. 2785–2791.

Search for effective medicines with antimyeloma activity based on thalidomide using molecular docking methods

Ryneiskaya O. N., Bankovsky A. A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Based on the thalidomide molecule, various thalidomide derivatives were designed *in silico*. Molecular docking was carried out with the main target protein, cereblon (CRBN). The best ligand was found, the spatial structure and nature of its interactions were analyzed based on the Binding energy change and the inhibition constant. The obtained data were evaluated in comparison with the indicators of thalidomide and pomalidomide. The latter is known as the most effective thalidomide derivative used clinically in the treatment of multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma, thalidomide, cereblon, docking, AutoDock.

Поступила 29.06.2022