

УДК 615.277.3:547.495.9

## ДИЗАЙН ПРОИЗВОДНЫХ ГУАНИДИЛБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ АНТИОПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

Ринейская О. Н., Байроченко Д. С.

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

**Реферат.** Работа посвящена конструированию производных гуанидилбензойной кислоты и *in silico* исследованию их сродства к активатору плазминогена урокиназного типа (урокиназе) с целью поиска наиболее успешных образцов в контексте ингибирования мишени. Охарактеризован сайт связывания лигандов с урокиназой; выявлен ряд лигандов-лидеров, которые могут рассматриваться как соединения с потенциальной антиметастатической активностью.

**Ключевые слова:** молекулярный докинг, Нафамостат, AutoDock, урокиназа, метастазирование.

**Введение.** На протяжении последних десятилетий онкологические заболевания привлекают внимание исследователей различных специальностей в связи с их высокой распространенностью, смертностью и объемными сложностями лечения. По информации Всемирной организации здравоохранения в 2020 г. от злокачественных

новообразований умерло 10 миллионов человек [1].

Наиболее распространенные виды онкологических заболеваний, а также количество выявленных случаев и смертность в соответствии с видом заболевания для обоих полов в возрастном диапазоне 0–85 лет продемонстрированы на рисунке 1.

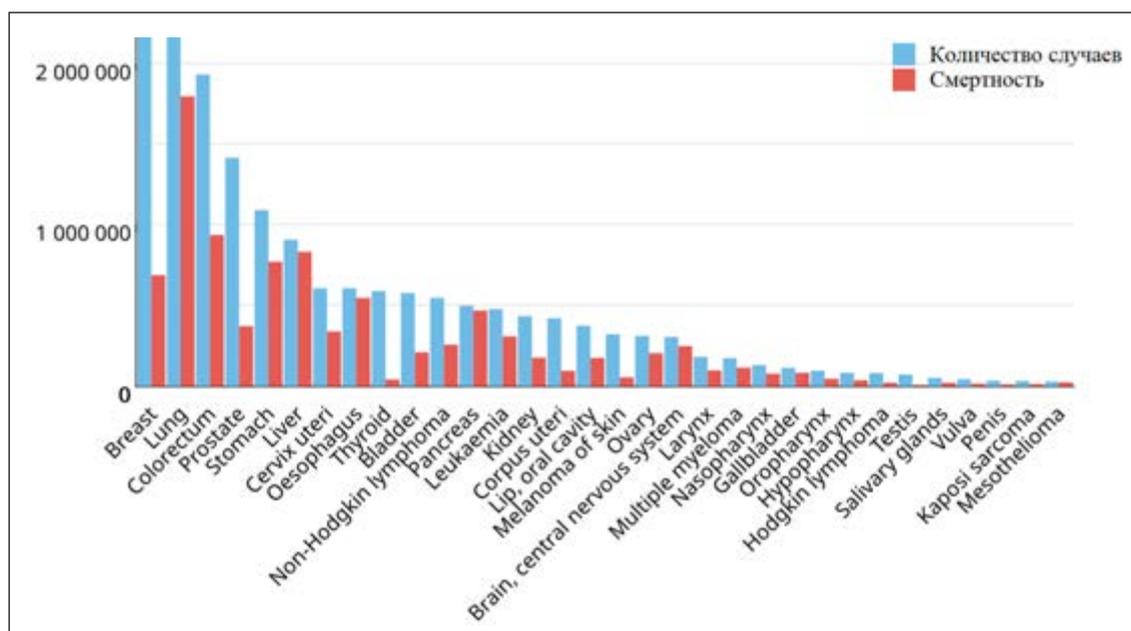


Рисунок 1 — Количество новых случаев и смертность от онкологических заболеваний в мире по состоянию на 2020 г. (ВОЗ)

Наиболее распространенными среди мужчин видами онкологических заболеваний являются рак легкого, простаты, желудка, печени и колоректальный рак. Среди женщин наиболее распространены рак молочной железы, легких, шейки матки, щитовидной железы и колоректальный рак.

Урокиназный активатор плазминогена (урокиназа, uPA) — это внеклеточная сериновая протеаза, кодируемая геном PLAU. Ее физиологическая роль заключается в опосредованном участии в процессе фибринолиза путем активации плазминогена, в способности подвергать гидролизу некоторые компоненты внеклеточного матрикса, а также активировать металлопротеиназы, осуществляющие деградацию большинства белков внеклеточного матрикса, участвуя таким образом в ремоделировании тканей. Следовательно, активация или ингибирование урокиназы может иметь отношение к прогрессированию опухолевого процесса или ограничению его распространения.

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что увеличение экспрессии гена PLAU, а следовательно, и повышение концентрации uPA ведут к усилению процессов разрушения внеклеточного матрикса, нарушению межклеточных адгезионных контактов, что в свою очередь способствует процессам метастазирования и прогрессирования опухолей [2], поскольку именно протеолитическая деградация межклеточного матрикса является основным событием миграции опухолевых клеток в отдаленные органы и ткани. В ряде исследований было показано, что высокий уровень uPA связан с высокой частотой рецидивов и неблагоприятными исходами у пациентов при различных видах рака [3].

Урокиназа — белок, состоящий из 411 аминокислотных остатков, имеет мультидоменную структуру и включает в себя N-концевой домен (подобный эпителиальному фактору роста), крингл-участок и домен сериновой протеазы на C-конце. Урокиназа осуществляет свою ферментативную активность посредством ковалентного катализа, что было подтверждено рентгеноструктурными исследованиями. Аминокислотные остатки His-57, Asp-102, Ser-195, формируя каноническую каталитическую триаду, не-

посредственно участвуют в осуществлении ферментативной реакции [4].

Перспективным направлением является поиск лекарственного средства, способного инактивировать урокиназу путем связывания с ее активным центром, таким образом значительно сдерживая метастазирование и дальнейшее прогрессирование опухоли. Изучение возможностей ингибирования урокиназы является важной областью исследований в течение последних десятилетий. Было создано несколько классов селективных ингибиторов урокиназы, направленных на домен сериновой протеазы белка, которые продемонстрировали потенциальные противораковые эффекты. Наличие структурной информации о комплексах фермент-ингибитор либо с помощью ядерно-магнитной спектроскопии, либо с помощью кристаллографии позволило провести подробный анализ взаимодействий белков-ингибиторов, которые вносят вклад в наблюдаемую эффективность ингибитора.

Нафамостат (6-амидино-2-нафтил 4-гуанидинобензоат) — это производное гуанидилбензойной кислоты, низкомолекулярный синтетический ингибитор сериновых протеаз широкого спектра действия, который обладает антикоагулянтной, противовоспалительной, возможно, противовирусной активностью [5] (рисунок 2).

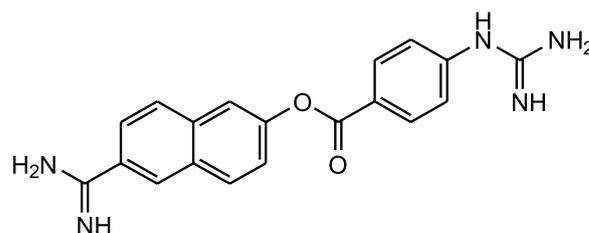


Рисунок 2 — Структурная формула Нафамостата

Как ингибирующее протеолиз средство Нафамостат, а также его производные вызывают интерес с точки зрения возможности их использования для торможения метастазирования.

**Цель работы** — конструирование *in silico* низкомолекулярных производных Нафамостата с последующим проведением молекулярного докинга с урокиназой для установления наиболее успешных образцов, обладающих потенциальной антимета-

статической и противоопухолевой активностью.

**Материалы и методы.** В рамках настоящей работы проведено моделирование *in silico* взаимодействий Нафамостата и его производных с активным центром урокиназы для установления характера взаимодействий и подтверждения выдвинутых теорий.

Информация о трехмерной структуре фермента урокиназы (ID 7vm4 [6]) была получена из свободной международной базы данных Protein Data Bank. Для проведения молекулярного докинга был использован ресурс AutoDock4 [7]. В этой программе была осуществлена подготовка молекулы фермента к проведению докинга *in silico*: было осуществлено удаление из структуры воды и небелковых молекул, добавление полярных атомов водорода; была произведена стыковка предложенных лигандов с урокиназой; были созданы карты сетки потенциалов белок-лигандных взаимодействий по одной для каждого атома лиганда, необходимые для работы AutoDock. Через AutoDockTools (набор команд, предоставляющих графический интерфейс для AutoDock) проведен расчет энергии связывания (свободной энергии Гиббса,  $E_b$ ) и константы ингибирования ( $K_i$ ).  $E_b$  и  $K_i$  — два основных показателя, характеризующих взаимодействия белка-мишени и малых молекул, которые использовались для сравнения аффинности лигандов по отношению к урокиназе.

При помощи программного пакета ChemOffice 16.0 был произведен дизайн производных гуанидилбензойной кислоты на основе Нафамостата. Молекулы лигандов были созданы путем замены некоторых групп и/или добавления аминогрупп, гидроксильных, карбоксильных, метильных, тиольных групп к интактной молекуле Нафамостата.

Для более детального изучения характера взаимодействий в белок-лигандных системах были использованы: программа PyMOL 2.5.4, в которой также был произведен анализ архитектуры комплексов Нафамостата и одного из лигандов-лидеров; онлайн-сервисы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) и Protein-Plus. Для конвертирования файлов в различные форматы для интеграции работы во всех перечисленных выше программах использовалась программа OpenBabelGUI. Для оптимизации затрат временных ресурсов в

данном исследовании применялся так называемый полугибкий (стандартный) докинг с гибким рецептором и жестким активным центром фермента. При проведении молекулярного докинга использовался Ламаркианский генетический алгоритм для поиска глобального минимума, так как именно он дает наиболее точные результаты при проведении полугибкого докинга.

**Результаты и их обсуждение.** С целью уточнения взаимодействий между Нафамостатом и урокиназой был проведен глобальный докинг (с покрытием всей поверхности белковой молекулы). В результате были установлены координаты основного сайта связывания, находящегося в активном центре фермента, которые составили  $-29,1072$ ;  $-17,5636$ ;  $-5,1267$ . Найден лучший комплекс Нафамостат-урокиназа со значениями  $E_b = -9,83$  ккал/моль и  $K_i = 62,82$  нмоль/л. Для повышения точности результатов был проведен докинг в ограниченной области протеина с координатами, указанными выше и размерами области стыковки  $40 \times 40 \times 40$ . Энергия связывания Нафамостата с белком составила  $-10,15$  ккал/моль, константа ингибирования  $36,04$  нмоль/л. Эти значения были приняты за референсные.

Известно, что при использовании Нафамостата протеолитическая реакция uPA не может быть завершена вследствие особых взаимодействий атомов лиганда с активным центром мишени. Подробное описание возникающих водородных связей и  $\pi$ -стэкинговых взаимодействий приведено в таблице 1.

При сравнении топологии активного центра полученного нами комплекса Нафамостат-урокиназа с активным центром комплекса урокиназы и ингибитора пептидного типа (PDB 1w10) [8] было выявлено изменение положения имидазольного кольца His-57, что является результатом участия His-57 во взаимодействии с Нафамостатом. Увеличение расстояния между имидазольной группой His-57 и гидроксильной группой Ser-195 делает невозможным завершение ферментативной реакции и лежит в основе ингибирующей активности Нафамостата. Выдвинута гипотеза о том, что основополагающим фактором ингибирующей активности Нафамостата является образование перпендикулярных  $\pi$ -стэкинг-взаимодействий с His-57.

Таблица 1 — Характер взаимодействий между атомами лиганда и протеина в комплексе Нафамостат-урокиназа

№	Тип взаимодействия	Аминокислотный остаток	Межатомное расстояние, Е
1	π-стэкинг	57-His	4,50
2	Водородная связь	58-Cys	2,27–3,11 *
3	Водородная связь	58-Cys	1,72–2,74 *
4	Водородная связь	190-Ser	3,42–3,97 *
5	Водородная связь	190-Ser	2,03–3,01 *
6	Водородная связь	192-Gln	3,46–3,87 *
7	Водородная связь	193-Gly	2,14–3,08 *
8	Водородная связь	219-Gly	1,81–2,68 *
9	Водородная связь	221-Ala	3,61–3,98 *
10	Водородная связь	226-Gly	3,09–3,54 *

\* Для водородной связи: атом-акцептор — Н — атом-акцептор — атом-донор электронов.

Моделирование 25 лигандов, являющихся производными гуанидилбензойной кислоты, проводили путем удаления или замещения отдельных групп атомов в структуре Нафамостата (рисунок 3 содержит общие фор-

мулы соединений). Для всех образцов был выполнен молекулярный докинг.

В таблице 2 представлены особенности строения отдельных лигандов и характеристики их сродства к урокиназе.

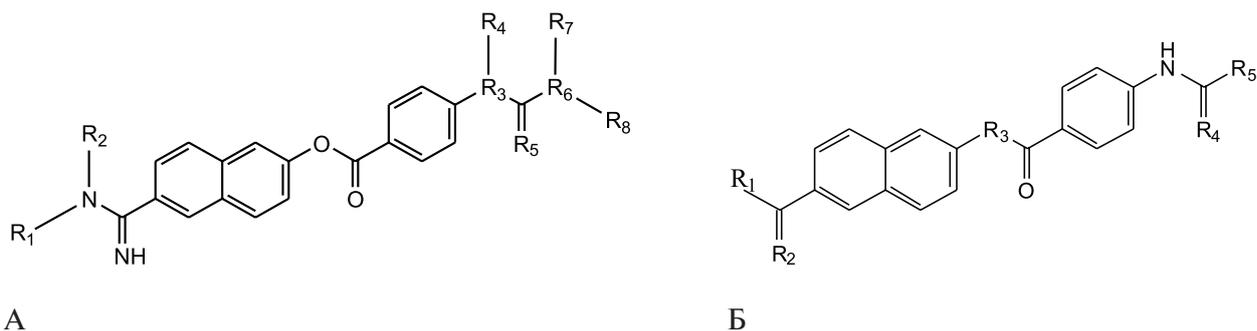


Рисунок 3 — Структурные формулы лигандов в общем виде

Таблица 2 — Характеристика взаимодействий лигандов и урокиназы

№	А									E <sub>b</sub> , ккал/моль	K <sub>i</sub> , пМ
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>			
1	H	H	N	H	NH	N	H	H		-10,15	36 040
2	CH <sub>3</sub>	H	N	H	NH	N	H	H		-13,88	67,29
3	H	H	N	H	NH	N	H	CH <sub>3</sub>		-12,93	334,55
6	H	H	N	H	NH	N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		-13,47	133,84
7	H	H	N	CH <sub>3</sub>	NH	N	H	H		-13,07	260,65
8	H	H	N	OH	NH	N	H	H		-13,56	115,55
9	H	H	N	H	NH	OH	—	—		-12,33	909,65
10	H	H	N	H	O	OH	—	—		-13,09	253,99
12	H	H	CH <sub>2</sub>	—	NH	N	H	H		-12,49	697,78
13	H	H	CH	OH	NH	N	H	H		-12,70	491,48
14	H	H	N	H	NH	SH	—	—		-11,95	1750
19	CH <sub>3</sub>	H	N	H	NH	N	H	CH <sub>3</sub>		-13,29	182,16
20	H	H	N	CH <sub>3</sub>	NH	N	H	CH <sub>3</sub>		-13,01	292,55

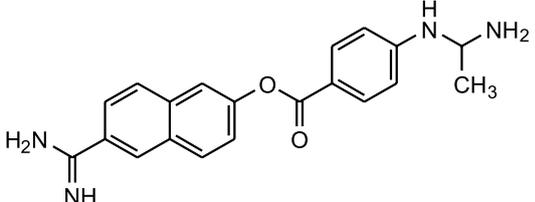
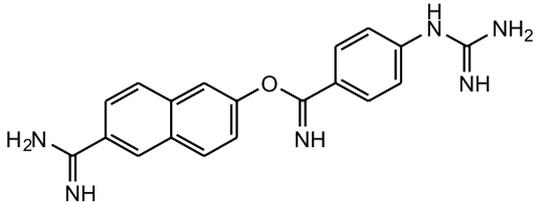
Окончание табл. 1

№	А								E <sub>b</sub> , ккал/моль	K <sub>i</sub> , пМ
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>		
21	CH <sub>3</sub>	SH	N	H	NH	N	H	H	-12,51	675,85
22	CH <sub>3</sub>	H	N	H	NH	N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-13,35	163,38
23	H	H	N	NH <sub>2</sub>	NH	N	H	H	-13,68	93,58
24	H	H	N	H	NH	N	H	NH <sub>2</sub>	-13,47	132,81
25	NH <sub>2</sub>	H	N	H	NH	N	H	H	-13,41	147,28
26	NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	N	H	NH	N	H	H	-14,23	36,79

Б							
№	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	E <sub>b</sub> , ккал/моль	K <sub>i</sub> , пМ
11	OH	O	O	O	OH	-13,23	201,63
15	SH	NH	O	NH	NH <sub>2</sub>	-13,78	78,77
16	SH	NH	O	NH	SH	-11,12	7060
17	OH	O	O	NH	NH <sub>2</sub>	-12,56	617,32
27	NH <sub>2</sub>	NH	NH	NH	NH <sub>2</sub>	-12,85	381,79

 <p>№ 5, E<sub>b</sub> = -13,02 ккал/моль, K<sub>i</sub> = 285,83 пМ</p>	 <p>№ 18, E<sub>b</sub> = -12,99 ккал/моль, K<sub>i</sub> = 303,29 пМ</p>
--	--

Образцы были кластеризованы в соответствии с появившимися в их структуре функциональными группами и для них были рассчитаны средние значения энергии связывания в комплексе лиганд-белок. При анализе полученных показателей и со-

поставлении структур предложенных образцов было установлено, что соединения с аминогруппами (лиганды 18, 23–27) имели в среднем лучшее (меньшее) значение E<sub>b</sub> по сравнению с другими образцами (рисунок 4).



Рисунок 4 — Влияние функциональных групп на энергию связывания с протеином

Однако при более детальном рассмотрении комплексов с данной группой лигандов обнаружилось, что при низких значениях  $E_b$  им, по всей видимости, свойственна достаточно высокая степень неспецифичности связывания (лиганды 23, 24 и 26). Несмотря на то, что лиганд 26 является фактическим лидером по значению  $E_b$  ( $-14,23$  ккал/моль), он не взаимодействует с каталитической триадой (рисунок 5), значит, данный образец не пригоден для ингибирования фермента.

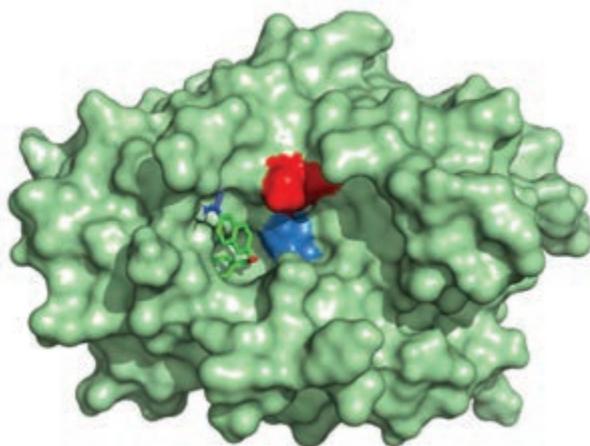


Рисунок 5 — Лиганд 26 в активном центре урокиназы (красным цветом обозначен His-57; синим — Ser-195)

Лиганд 2 (6-(N-метилкарбамидоил)нафталин-2-ил-4-гуанидилбензоат) показал

значение  $E_b = -13,88$  ккал/моль. Меньшее значение энергии связывания у данного образца по сравнению с Нафамостатом, возможно, объясняется наличием гидрофобных взаимодействий и образованием ионной связи, а также образованием более прочных (коротких) водородных связей (таблица 3).

Таблица 3 — Характер взаимодействий между атомами лиганда 2 и урокиназы

№	Тип взаимодействия	Аминокислотный остаток	Межатомное расстояние, Е
1	Водородная связь	57-His	2,02–3,01 *
2	Ионная связь	189-Asp	4,09
3	Водородная связь	190-Ser	1,80–2,76 *
4	Гидрофобное	192-Gln	3,54
5	Водородная связь	219-Gly	1,81–2,74 *

\* Для водородной связи: атом-акцептор — Н — атом-акцептор — атом-донор электронов.

Большой интерес представляет лиганд 6 (6-карбомидоилнафталин-2-ил-4-(3,3-диметилгуанидино)бензоат). Несмотря на более высокое значение, чем у лиганда 26, энергии связывания ( $-13,47$  ккал/моль), для данного образца можно предполагать более высокую вероятность проявления терапевтического эффекта в связи с наличием  $\pi$ -стэкинг-взаимодействий (рисунок 6), играющих важную роль в позиционировании имидазольной группы His-57.

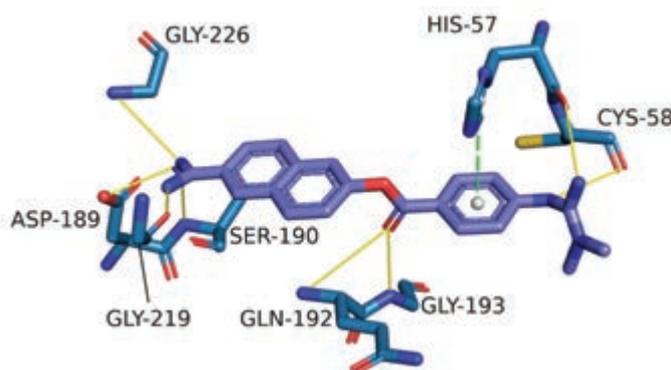


Рисунок 6 — Взаимодействия лиганда 6 в активном центре урокиназы

**Заключение.** Таким образом, наиболее перспективными в отношении ингибирования активности урокиназы являются производные гуанидилбензойной кислоты, имеющие метильные группы у атомов азота

фрагментов амидина и гуанидина. Результаты дают основания планировать дальнейшие исследования образцов 2 и 6 с использованием экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo*.

## Список цитированных источников

1. Cancer: 3 February 2022 [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. — Date of access: 25.05.2023.
2. Madunić J. The Urokinase Plasminogen Activator System in Human Cancers: An Overview of Its Prognostic and Predictive Role / J. Madunić // *Thromb Haemost.* — 2018. — № 118 (12). — P. 2020–2036. DOI: 10.1055/s-0038-1675399.
3. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies / M. J. Duffy [et al.] // *Breast Cancer.* — 2014. — № 16. — P. 428.
4. Four spatial points that define enzyme families / I. Góbor [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 2009. — Vol. 383, № 4. — P. 417–420.
5. Nafamostat Mesilate as an Anticoagulant During Continuous Renal Replacement Therapy in Patients With High Bleeding Risk: A Randomized Clinical Trial / Choi, Ji-Young [et al.] // *Medicine.* — 2015. — № 94 (52). — P. e2392. DOI: 10.1097/MD.0000000000002392.
6. Structural study of the uPA-nafamostat complex reveals a covalent inhibitory mechanism of Nafamostat / Y. Zhou [et al.] // *Biophysical J.* — Aug. 2022. — № 121. — P. 3. DOI: 10.1016/j.bpj.2022.08.034.
7. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris [et al.] // *Computational Chemistry.* — 2009. — № 16. — P. 2785–2791.
8. Crystals of Urokinase Type Plasminogen Activator Complexes Reveal the Binding Mode of Peptidomimetic Inhibitors / E. Zeslowska [et al.] // *J. of Molecular Biology.* — 2003. — Vol. 328 (1). — P. 109–118.

## Design of guanidine benzoic acid derivatives with potential anti-tumor activity using molecular docking methods

*Ryneiskaya O. N., Bairachenka D. S.*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The work is devoted to the construction of guanidine benzoic acid derivatives and *in silico* study of their affinity to the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in order to find the most successful candidates in the context of target inhibition. The ligand-binding site for uPA has been characterized. A number of lead-ligands have been identified, which can be considered as compounds with potential antimetastatic activity.

**Keywords:** molecular docking, Nafamostat, AutoDock, urokinase, metastasis.

*Поступила 22.06.2023*