

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.

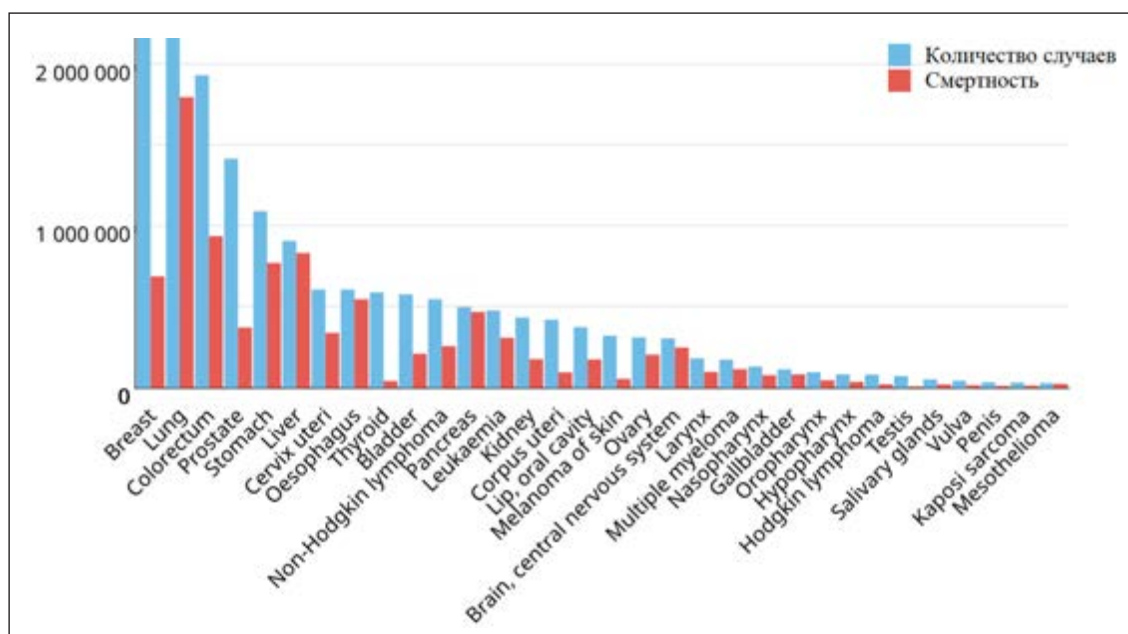


Рисунок 1 — Количество новых случаев и смертность от онкологических заболеваний в мире по состоянию на 2020 г. (ВОЗ)

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).

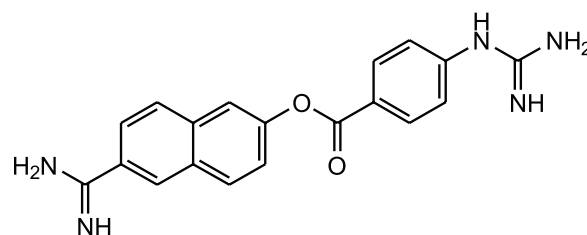


Рисунок 2 — Структурная формула Нафамостата

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 π -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 π -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.

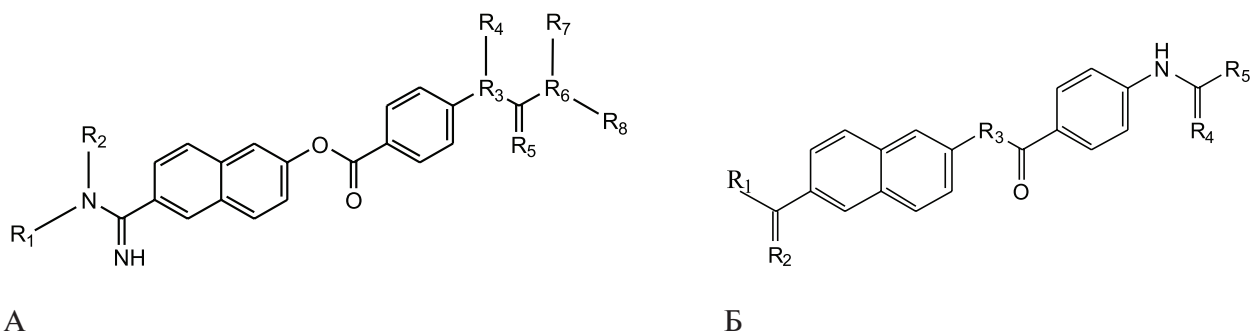


Рисунок 3 — Структурные формулы лигандов в общем виде

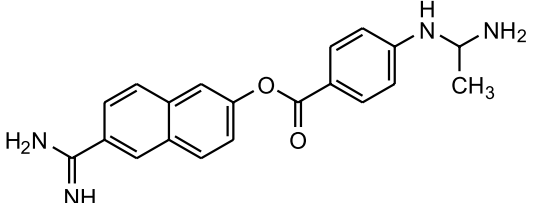
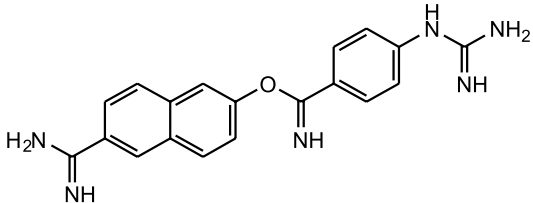
Таблица 2 — Характеристика взаимодействий лигандов и урокиназы

№	А									E _b , ккал/моль	K _i , пМ
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈			
1	H	H	N	H	NH	N	H	H		-10,15	36 040
2	CH ₃	H	N	H	NH	N	H	H		-13,88	67,29
3	H	H	N	H	NH	N	H	CH ₃		-12,93	334,55
6	H	H	N	H	NH	N	CH ₃	CH ₃		-13,47	133,84
7	H	H	N	CH ₃	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 ₂	—	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 ₃	H	N	H	NH	N	H	CH ₃		-13,29	182,16
20	H	H	N	CH ₃	NH	N	H	CH ₃		-13,01	292,55

Окончание табл. 1

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

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

 <p>№ 5, E_b = -13,02 ккал/моль, K_i = 285,83 пМ</p>	 <p>№ 18, E_b = -12,99 ккал/моль, K_i = 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_b 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.

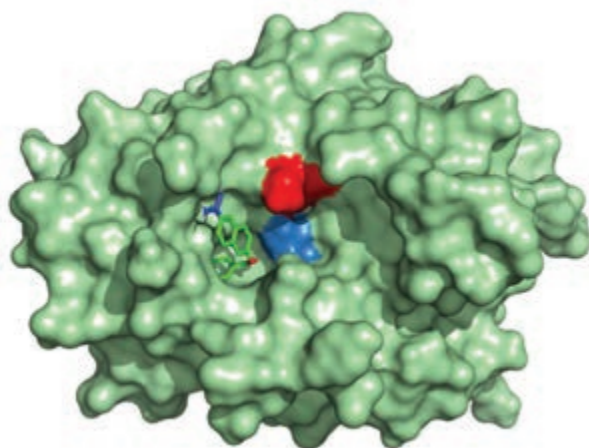


Рисунок 5 — Лиганд 26 в активном центре урокиназы (красным цветом обозначен His-57; синим — Ser-195)

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-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 π -стэкинг-взаимодействий (рисунок 6), играющих важную роль в позиционировании имидазольной группы His-57.

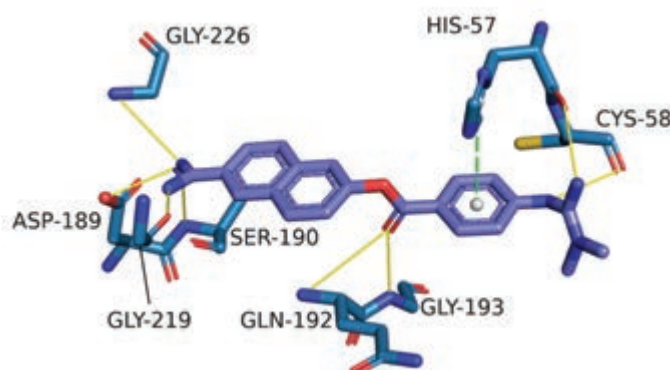


Рисунок 6 — Взаимодействия лиганда 6 в активном центре урокиназы

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