

*Д.С. Байроченко*

**ИССЛЕДОВАНИЕ IN SILICO ПРОИЗВОДНЫХ ГУАНИДИНБЕНЗОЙНОЙ  
КИСЛОТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ  
С АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

*Научный руководитель: канд. мед. наук, проф. О.Н. Ринейская*

*Кафедра биоорганической химии*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*D.S. Bairachenka*

**IN SILICO STUDY OF GUANIDINE BENZOIC ACID DERIVATIVES  
AS POTENTIAL DRUGS WITH ANTIMETASTATIC ACTIVITY**

*Tutor: PhD, associate professor O.N. Ryneiskaya*

*Department of Bioorganic Chemistry*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** Урокиназный активатор плазминогена (uPA) – внеклеточная сериновая протеаза. В настоящей работе был проведен молекулярный докинг производных гуанидинбензойной кислоты с uPA. Выявлен ряд высокоаффинных соединений по отношению к uPA с потенциальной антиметастатической активностью.

**Ключевые слова:** нафамостат, урокиназа, метастазирования, ингибирование, AutoDock.

**Resume.** Urokinase-type plasminogen activator (uPA), is an extracellular serine protease. In the present work molecular docking of guanidine benzoic acid derivatives with uPA was carried out. A number of high-affinity compounds to uPA with potential antimetastatic activity have been identified.

**Keywords:** nafamostat, urokinase, metastasis, inhibition, AutoDock.

**Актуальность.** Урокиназный активатор плазминогена (uPA) – это внеклеточная сериновая протеаза, кодируемая геном PLAУ (10q22.2), которая задействована в ряде физиологических и патологических процессах человеческого организма. Ее физиологическая функция заключается в опосредованном участии в процессе фибринолиза путем активации плазминогена, в способности подвергать гидролизу некоторые компоненты внеклеточного матрикса, а также активировать металлопротеиназы – внеклеточные эндопептидазы, осуществляющие деградацию большинства белков внеклеточного матрикса. При ряде патологических состояний (определенные виды онкологических заболеваний) экспрессия гена PLAУ значительно увеличивается, что ведет к повышению концентрации uPA. Следовательно, это ведет к усилению процессов разрушения внеклеточного матрикса и нарушению межклеточных контактов, что, в свою очередь, способствует метастазированию и прогрессированию опухолей. В ряде исследований было показано, что у пациенток с раком молочной железы высокий уровень uPA коррелирует с плохим прогнозом течения заболевания и связан с высокой частотой рецидивов [1]. Перспективным направлением является поиск лекарственного препарата, способного связываться с активным центром uPA и тем самым инактивировать урокиназу, значительно сдерживая метастазирование и дальнейшее развитие опухоли.

**Цель:** моделирование и анализ *in silico* эффективности связывания производных Нафамостата к uPA для выявления наиболее успешных образцов, способных препятствовать процессу метастазирования.

**Задачи:**

1. Выяснить характер взаимодействия Нафамостата с uPA в установленном при помощи рентгеноструктурного анализа комплексе (PDB 7vm4) [6].

2. Провести молекулярный докинг для производных Нафамостата с целью выявления наиболее успешных образцов.

3. Провести анализ белок-лигандных взаимодействий для лучших лигандов.

**Материалы и методы.** Информация о трехмерной структуре фермента uPA была получена из свободной базы данных Protein Data Bank, которая была использована после предварительного удаления небелковых молекул и молекул воды. Дизайн потенциальных лекарственных средств – производных Нафамостата (NM) – был выполнен с помощью программного пакета ChemOffice 16.0 путем замены некоторых групп и/или добавления к интактной молекуле Нафамостата различных функциональных групп: аминогрупп, гидроксильных, карбоксильных, метильных, тиольных групп. С помощью ChemDraw и Chem3D были созданы структурные формулы производных Нафамостата в 2D и 3D вариантах соответственно. Для молекулярного докинга и визуализации полученных комплексов использовалась программа AutoDockTools 1.5.7 [4], OpenBabelGUI в качестве конвертера форматов файлов. Для визуализации и более детального анализа полученных белок-лигандных комплексов была использована программа PyMOL 2.5.4, онлайн-сервисы PLIP [3] и Protein-Plus. Расчет  $E_b$  в системе белок-лиганд производился посредством AutoDockTools. Для анализа использовался генетический алгоритм Ламарка с числом прогонов 50 и размером популяции 150.

Для сравнения полученных результатов и оценки качества предложенных лигандов использовались два основных критерия, характеризующих взаимодействия белка-мишени и малых молекул – значения  $E_b$  (величина свободной энергии Гиббса, энергия связывания) и  $K_i$  (константа ингибирования). Для сравнения полученных результатов за референсное значение было взято лучшее значение  $E_b$  Нафамостата, равное -9,83 ккал/моль.

**Результаты и их обсуждение.** Для Нафамостата (6-карбамидоилнафталин-2-ил-4-гуанидинобензоат) был проведен молекулярный докинг и найден лучший комплекс Нафамостат-uPA со значением  $E_b = -9,83$  ккал/моль.

При сопоставлении активной формы uPA (PDB 1w10) [2] с полученным комплексом было выявлено отклонение имидазольного кольца His-57. Данный факт является результатом участия His-57 во взаимодействии с NM. Вследствие чего происходит увеличение расстояния между имидазольной группой His-57 и гидроксильной группой Ser-195, что делает невозможным завершение ферментативной реакции и лежит в основе ингибирующей активности NM.

При дальнейшем анализе комплекса NM-uPA было обнаружено, что между имидазольной группой His-57 и молекулой NM возникают перпендикулярные  $\pi$ -стэкинг-взаимодействия (Рис. 1). Была выдвинута гипотеза о том, что образование стэкинг-взаимодействий играет ключевую роль в разобщении канонической

каталитической триады фермента и как следствие лежит в основе ингибирующего действия Нафамостата.

С помощью программного пакета ChemOffice были сконструированы 22 лиганда, являющихся производными Нафамостата (Табл. 1).

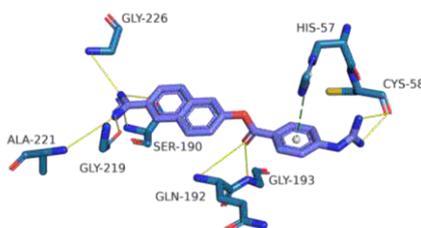


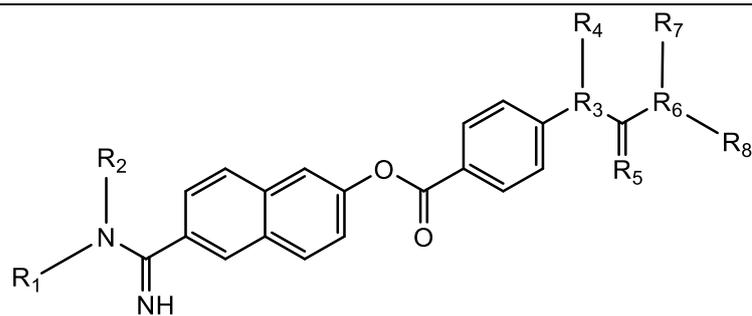
Рис. 1 – Взаимодействия в комплексе Нафамостат-uPA

Был выполнен молекулярный докинг и расчет энергии связывания для 22-х структур-производных Нафамостата. Найден ряд соединений, обладающих большей аффинностью, чем Нафамостат. Все проанализированные образцы, включая Нафамостат (LigI), продемонстрированы в таблице 1.

Табл. 1. Характеристики белок-лигандных взаимодействий ( $K_i$  и  $E_b$ ) для Нафамостата (LigI) и его производных

<p style="text-align: right;">A</p>							
A							
Lig	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	$E_b$ , ккал/моль	$K_i$ , pM
XI	OH	O	NH	O	OH	-13,23	201,63
XV	SH	NH	NH	NH	NH <sub>2</sub>	-13,78	78,77
XVI	SH	NH	NH	NH	SH	-11,12	7060
XVII	OH	O	NH	NH	NH <sub>2</sub>	-12,56	617,32
<p style="text-align: center;">B</p> <p style="text-align: center;">Lig V, <math>E_b = -13,02</math> ккал/моль  <math>K_i = 285,83</math> pM</p>				<p style="text-align: center;">B</p> <p style="text-align: center;">Lig XVIII, <math>E_b = -12,99</math> ккал/моль  <math>K_i = 303,29</math> pM</p>			

Продолжение таблицы 1



Г										
Lig	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>	E <sub>b</sub> , ккал/моль	K <sub>i</sub> , pM
I	H	H	N	H	NH	N	H	H	-9,83	62820
II	CH <sub>3</sub>	H	N	H	NH	N	H	H	-13,88	67,29
III	H	H	N	H	NH	N	H	CH <sub>3</sub>	-12,93	334,55
VI	H	H	N	H	NH	N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-13,47	133,84
VII	H	H	N	CH <sub>3</sub>	NH	N	H	H	-13,07	260,65
VIII	H	H	N	OH	NH	N	H	H	-13,56	115,55
IX	H	H	N	H	NH	OH	-	-	-12,33	909,65
X	H	H	N	H	O	OH	-	-	-13,09	253,99
XII	H	H	CH <sub>2</sub>	-	NH	N	H	H	-12,49	697,78
XIII	H	H	CH	OH	NH	N	H	H	-12,70	491,48
XIV	H	H	N	H	NH	SH	-	-	-11,95	1750
XIX	CH <sub>3</sub>	H	N	H	NH	N	H	CH <sub>3</sub>	-13,29	182,16
XX	H	H	N	CH <sub>3</sub>	NH	N	H	CH <sub>3</sub>	-13,01	292,55
XXI	CH <sub>3</sub>	SH	N	H	NH	N	H	H	-12,51	675,85
XXII	CH <sub>3</sub>	H	N	H	NH	N	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-13,35	163,38
XXIII	H	H	N	NH <sub>2</sub>	NH	N	H	H	-13,68	93,58
XXIV	H	H	N	H	NH	N	H	NH <sub>2</sub>	-13,47	132,81

При анализе значений E<sub>b</sub> (ккал/моль) и сопоставлении графических формул различных лигандов было выявлено, что соединения с метильными группами имели в среднем лучшее значение E<sub>b</sub> по сравнению с другими лигандами (-13,15 для -CH<sub>3</sub>; -12,96 для -COOH; -12,86 для -OH; -12,83 для -NH<sub>2</sub>; -12,32 для -SH). На основании чего был сделан вывод об определяющей роли неполярных гидрофобных взаимодействий в корректных белок-лигандных взаимодействиях. Расчет средних значений E<sub>b</sub> производился путем нахождения средних арифметических показателей для групп молекул-лигандов в соответствии с введенными при конструировании функциональными группами.

Для наиболее успешных образцов также был изучен характер взаимодействий лиганд-урокиназа. Наиболее интересные результаты были получены для двух смоделированных лигандов – Lig II и Lig VI.

Соединением-лидером стал лиганд 6-(N-метилкарбамидоил)нафталин-2-ил-4-гуанидилбензоат условно обозначенный как «Lig II» с  $E_b = -13,88$  ккал/моль. Можно предположить, что он проявляет большую аффинность к uPA по сравнению с NM в связи с наличием гидрофобных взаимодействий с Gln-192 (расстояние 3,54 Å) и образованием ионной связи с Asp-189 (длина связи 4,09 Å).

Стоит отметить лиганд 6-карбомидоилнафталин-2-ил-4-(3,3-диметилгуанидино)бензоат (Lig VI), имеющий  $E_b = -13,47$  ккал/моль. Между ним и имидазольной группой His-57 образуются перпендикулярные  $\pi$ -стэкинг-взаимодействия, аналогичные таковым в комплексе NM-uPA. Эти данные позволяют предполагать большую вероятность проявления Lig VI ингибирующей активности по отношению к uPA *in vivo*.

#### **Выводы:**

1. Полученные данные позволяют предполагать более высокую фармакологическую активность у 6-(N-метилкарбамидоил)нафталин-2-ил-4-гуанидилбензоата (Lig II) и 6-карбомидоилнафталин-2-ил-4-(3,3-диметилгуанидино)бензоат (Lig VI), чем у референсного соединения.

2. Результаты дают возможность планировать дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo* с использованием экспериментальных моделей.

#### **Литература**

1. Duffy, M.J., McGowan, P.M., Harbeck, N. et al uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies // *Breast Cancer*. - 2014. - Res 16. – P. 428.
2. Ewa Zeslawska, Uwe Jacob, Andrea Schweinitz, Gary Coombs, Wolfram Bode, Edwin Madison Crystals of Urokinase Type Plasminogen Activator Complexes Reveal the Binding Mode of Peptidomimetic Inhibitors // *Journal of Molecular Biology*. - 2003. - Vol. 328, Issue 1. - P. 109-118.
3. Melissa F Adasme, Katja L Linnemann, Sarah Naomi Bolz, Florian Kaiser, Sebastian Salentin, V Joachim Haupt, Michael Schroeder PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA // *Nucleic Acids Research*. - 2021. - Vol. 49, Issue W1. - P. W530–W534.
4. Morris, G. M. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson // *Computational Chemistry*. – 2009. – No16. – P. 2785-2791.
5. Xi Chen, Zhijie Xu, Shuangshuang Zeng, Xiang Wang, Wanli Liu, Long Qian, Jie Wei1, Xue Yang, Qiuying Shen, Zhicheng Gong and Yuanliang Yan The Molecular Aspect of Antitumor Effects of Protease Inhibitor Nafamostat Mesylate and Its Role in Potential Clinical Applications // *Frontiers in Oncology*. - 2019. - Vol. 9.
6. Yang Zhou, Juhong Wu, Jinyu Li, Longguang Jiang, Mingdong Huang Structural study of the uPA-nafamostat complex reveals a covalent inhibitory mechanism of nafamostat // *Biophysical Journal*. - 2022.