

К.И. Гончарик
**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ИНГИБИТОРА
ROR γ t НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО
ИНДАЗОЛА**

Научный руководитель: ассист. М.С. Абраменко
Кафедра фармакологии
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

К.I. Hancharyk
**MOLECULAR DOCKING OF A POTENTIAL ROR γ t INHIBITOR
BASED ON A MODIFIED INDAZOLE DERIVATIVE**

Tutor: assistant M.S. Abramenko
Department of Pharmacology
Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В работе был изучен механизм активации белка ROR γ t и осуществлен дизайн соответствующего низкомолекулярного ингибитора, потенциально применимого в патогенетической терапии соответствующих заболеваний.

Ключевые слова: дизайн, докинг, транскрипционный фактор, патогенез, остеокласт

Resume. In the course of the work, was carried out the procedure for activating the ROR γ t protein and the design of an appropriate low-molecular inhibitor, which can be potentially used in the pathogenetic therapy of the corresponding diseases.

Keywords: design, docking, transcription factor, pathogenesis, osteoclast.

Актуальность. ROR γ t (retinoid-related orphan receptor gamma t) – это транскрипционный фактор, который играет важную роль в дифференцировке и функционировании Th17-клеток. Th17-клетки являются одним из подтипов Т-лимфоцитов, которые вырабатывают ряд провоспалительных цитокинов, включая интерлейкин-17 (IL-17) [1, 2]. При хронических инфекционно-воспалительных и некоторых аутоимунных заболеваниях наблюдаются гиперсекреция IL-17, который активизирует процессы остеокластогенеза из макрофагов/моноцитов крови, что приводит к последующей деструкции костной ткани [3]. Данный механизм имеет особое значение в патогенезе периодонтита, остеомиелита и остеопороза [4]. Таким образом, ROR γ t можно рассматривать в качестве перспективной лекарственной мишени для низкомолекулярных ингибиторов в патогенетической терапии ряда заболеваний.

Цель: поиск и дизайн нового потенциального ингибитора ROR γ t на основе производных индазола.

Задачи:

1. Определить механизм физиологической активации ROR γ t эндогенными соединениями для выявления сайта связывания ингибитора и образования необходимых связей.
2. Провести молекулярный докинг производных индазола.
3. Модифицировать наиболее активный по результатам стыковки лиганд с целью повышения его аффинности и оптимизации его фармакокинетических параметров.

Материалы и методы. Трехмерная структура белка-мишени была получена в базе данных PDB (идентификатор: 6J3N). В качестве лигандов использовались соединения из базы данных PubChem, содержащие в своей структуре фрагмент индазола, предварительно отфильтрованные в соответствии с правилом Липинского и по значению полярной площади (более 160\AA^2). Проведение докинга молекул осуществлялось с использованием веб-сервиса DockingServer [5]. Исходя из данных, полученных при кристаллографии, для стыковки был использован аллостерический карман, содержащий остатки Ala497 и Phe498, связывание с которыми определяет ингибирующий эффект обратного агониста. Расчет фармакокинетических параметров лиганда был проведен с использованием веб-сервиса SwissADME.

ROR γ t является ядерным рецептором, эндогенными агонистами которого являются производные холестерина и полиненасыщенных жирных кислот, связывающиеся с ним в ортостерическом кармане [6]. В отношении механизма ингибирования ROR γ t применяют понятие “agonist lock”, т. е. имеет сходство с действием замка. При связывании агонистов в лиганд-связывающем домене (ортостерический центр) возникает водородная связь, образованная между остатками His479 и Tyr502, которая фиксирует H12-спираль в правильном положении, способствуя рекрутированию коактиватора и последующей активации транскрипции. Дополнительно, Phe506 помогает стабилизировать замок за счет π -стэкинга с His479 (рис. 1) [6, 7]

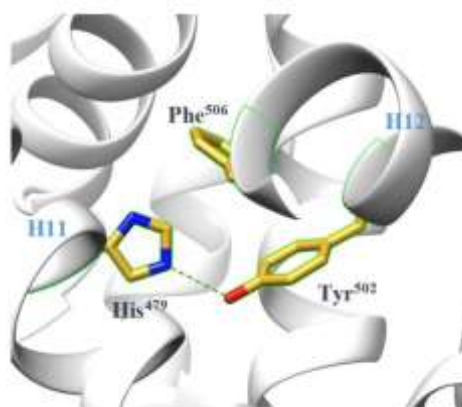
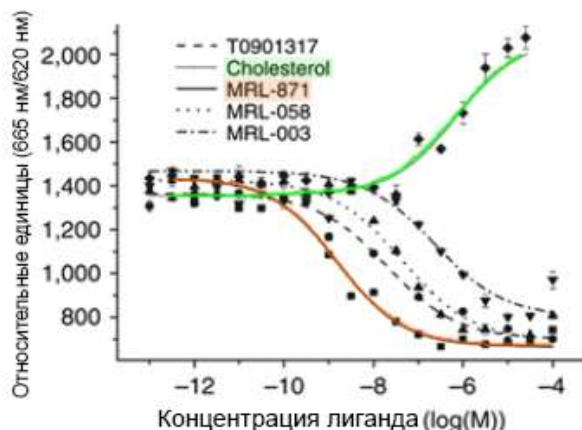


Рис. 1 – Механизм образования замка при связывании с агонистом

На основании экспериментальных данных при рентгеноструктурном анализе установлено, что связывание некоторых лигандов в аллостерическом кармане вынуждает H12 смещаться, что резко увеличивает расстояние между His479 и Tyr502, тем самым нарушая рекрутинг коактиватора. При этом данная группа соединений образует водородную связь с остатками Ala497 и/или Phe498. Анализ фармакодинамической кривой позволяет отнести указанные вещества к обратным агонистам ROR γ t, что обуславливает их ингибирующий эффект (граф. 1) [8, 9, 10].



Граф. 1 – Кривая доза-эффект при взаимодействии ROR γ t с агонистом (холестерол) и обратными агонистами

В образовании аллостерического кармана принимает участие 36 аминокислотных остатков, характерной особенностью является его достаточно высокая гидрофобность (рис. 2) [1].

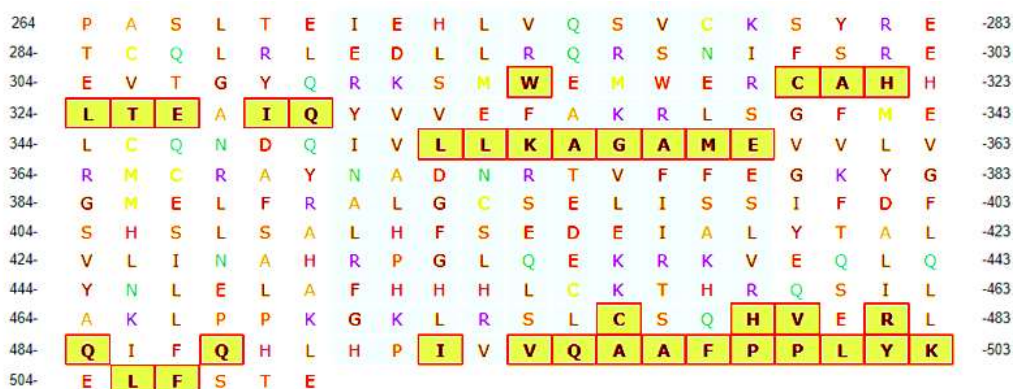


Рис. 2 – Аминокислотные остатки, участвующие в образовании аллостерического сайта связывания (выделены желтым)

Поиск лигандов осуществлялся с использованием базы данных PubChem по ключевому слову “indazole”. Полученные соединения были отфильтрованы согласно правилу Липинского: 1) не более 5 доноров водородной связи, 2) не более 10 акцепторов водородной связи, 3) молекулярная масса менее 500 дальтон, 4) коэффициент распределения октанол-вода ($\log P$) не превышает 5, и значению полярной площади – более 160 \AA^2 . Таким образом, в ходе исследования был осуществлен докинг 310 соединений, являющихся производными индазола. Стыковка осуществлялась с использованием веб-сервиса DockingServer: 1) ячейка для стыковки имела размер $25 \text{ \AA} * 25 \text{ \AA} * 25 \text{ \AA}$, 2) для оценки эффективности взаимодействия лиганда с рецептором в качестве стандарта для сравнения использовались результаты стыковки ROR γ t и MRL-871 ($-7,10$ ккал/моль, $K_i=4,67$ мкМ), ингибирующая активность которого в качестве обратного агониста была доказана экспериментально.

Результаты и их обсуждение. По результатам докинга наибольшей аффинностью обладал лиганд SR-01000070282 – $-7,60$ ккал/моль (рис. 3).

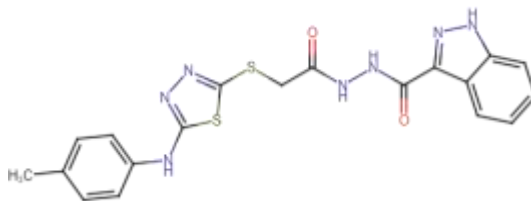


Рис. 3 – Химическая структура лиганда SR-01000070282 (PubChem CID: 4848802)

Последующая модификация указанного соединения позволила увеличить аффинность до $-8,3$ ккал/моль ($K_i=3,99 \mu\text{M}$). Международный химический идентификатор для данного соединения – InChIKey=VYSQDIANAXJXBJ-UHFFFAOYSA-N (рис. 4).

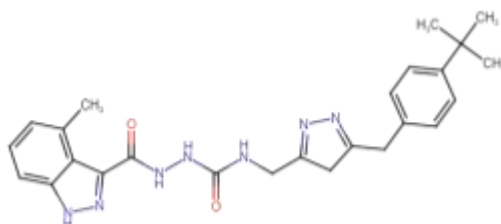


Рис. 4 – Химическая структура модифицированного лиганда

Взаимодействие полученного соединения с рецептором осуществляется посредством 2 гидрофобных карманов (Lys503, Pro500, Pro499, Ala321, His479, Cys320 и Arg319), π - π стэкинга (His322), а также водородных связей – Glu318 (N4/CE1 2,59Å), His322 (O1/N 2,97Å), Phe498 (N5/O 2,54Å), Tyr502 (N7/OH 2,87Å), Ala497 (N2/O 2,03Å) (рис. 5).

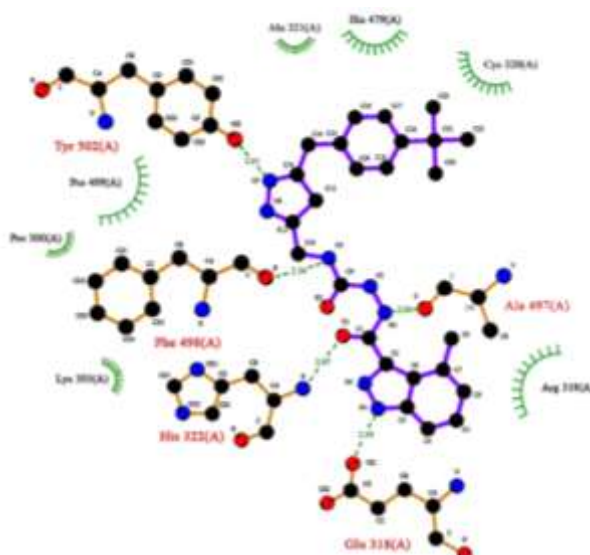


Рис. 5 – Взаимодействие потенциального ингибитора с аминокислотными остатками аллостерического кармана белка-мишени ROR γ t

С использованием веб-сервиса SwissADME были определены следующие параметры кинетики: 1) липофильность – XLogP3=3,68; 2) растворимость по Al_i – уме-

ренная ($\log S = -5,97$); 3) возможна пассивная диффузия соединения в желудочно-кишечном тракте; 4) не проходит через гемато-энцефалический барьер и, вероятно, не оказывает центральное действие; 5) является ингибитором СYP3A4; 6) оценка биоактивности по Abbott=55%.

Выводы:

1. На основании проведенного исследования, можно ожидать высокую фармакологическую активность производных индазола в качестве обратных агонистов ROR γ t.

2. Полученное в ходе модификации соединение обладает повышенным сродством к указанному рецептору и приемлемыми фармакокинетическими свойствами. Исходя из этого, его можно рассматривать в качестве потенциального перспективного ингибитора дифференцировки Th17-клеток для патогенетической терапии связанных с ними заболеваний.

Литература

1. Kumar, R. ROR γ t protein modifications and IL-17-mediated inflammation [Текст]* / K. Ritesh, A. L. Theiss, K. Venuprasad // Trends Immunol. – 2022. – № 42(11) – P. 1037-1050.
2. Bikadi, Z. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock [Текст]* / Z. Bikadi, E. Hazai // Journal of Cheminformatics. – 2009. – № 1(15) – P. 1-16.
3. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks [Текст]* / D. Sachini, H. Yun, S. Kim et. al. // Immune Netw. – 2018. – № 18(1) – P. 238-249.
4. Metabolic control of TH17/iTreg balance by an epigenetic mechanism [Текст]* / T. Xu, K. M. Stewart, X. Wang et. al. // Nature. – 2019. – № 10 – P. 228-233.
5. Identification of an allosteric binding site for ROR γ t inhibition [Текст]* / M. Scheepstra, S. Leyssen, G. C. Almen et. al. // Nat Commun. – 2015. – № 6 – P. 8833.
6. ROR γ Structural Plasticity and Druggability [Текст]* / M. Huang, S. Bolin, H. Miller et. al. // Int J Mol Sci. – 2020. – № 21(15) – P. 5329.
7. Kübra, B. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases [Текст]* / B. Kübra // Int J Mol Sci. – 2019. – № 20(14) – P. 3394.
8. ROR γ Structural Plasticity and Druggability [Текст]* / M. Huang, S. Bolin, H. Miller et. al. // Int J Mol Sci. – 2020. – № 21(15) – P. 5329.
9. Molecular Mechanism of Action of ROR γ t Agonists and Inverse Agonists: Insights from Molecular Dynamics Simulation [Текст]* / N. Sun, C. Yuan, X. Ma et. al. // Molecules. – 2018. – № 23(12) – P. 3181.
10. Structural change of retinoic-acid receptor-related orphan receptor induced by binding of inverse-agonist: Molecular dynamics and ab initio molecular orbital simulations [Текст]* / S. Suzuki, T. Nakamura, R. Saito et. al. // Comput Struct Biotechnol. – 2020. – № 18 – P. 1676-1685.