

В.Б. Борисов

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ АПИКСОБАНА С БЕЛКАМИ-МИШЕНЯМИ В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НА РАК

Научный руководитель: канд. хим. наук., доц. Ф.Ф.Ляхвич

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.B. Borisov

MOLECULAR DOCKING APIXABAN WITH PROTEINS-TARGETS IN CANCEROUS CELLS: POTENTIAL MECHANISMS OF INFLUENCE ON CANCER

Tutor: PhD in chemistry, associate professor T.T. Lakhvich

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Система свертывания крови и, в частности, фактор Ха, играют многогранную роль в развитии рака, выходящую за рамки гемостаза. Апиксобан, прямой ингибитор фактора Ха, используется как антикоагулянт, но также изучается его потенциальное влияние на раковые клетки.

Ключевые слова: апиксобан, интегрины, метастазирование, микроокружение опухоли, молекулярный докинг, PAR2, PI3K/Akt/mTOR, рак, тканевой фактор, фактор Ха, факторы роста, YAP/TAZ.

Resume. The coagulation system plays a significant role in cancer development and progression. Apixaban, a direct factor Xa inhibitor, is widely used as an anticoagulant. However, evidence suggests potential non-anticoagulant effects of apixaban in the context of cancer.

Keywords: apixaban, Cancer, Factor Xa, Growth Factors, Integrins, Metastasis, Molecular Docking, PAR2, PI3K/Akt/mTOR, Tissue Factor, Tumor Microenvironment, YAP/TAZ.

Актуальность. Апиксобан наряду с другими лекарственными средствами группы ксабанов используется для курации онкологических пациентов для предотвращения тромбоемболий и других катастроф сердечно сосудистой системы. Научный и практический интерес представляет исследование влияния данной группы препаратов на механизмы развития злокачественных клеток через влияние на систему свертывания крови. Это относится и к фактору Ха, который проявляет плейотропные эффекты в контексте злокачественных новообразований. Помимо роли в гемостазе и тромбогенезе у онкологических пациентов, фактор Ха и другие компоненты системы свертывания крови участвуют в регуляции ключевых процессов, определяющих прогрессию рака, включая ангиогенез, метастазирование, воспаление и формирование иммуносупрессивного микроокружения опухоли

Цель: в эксперименте *insilico* проверить гипотезу о влиянии апиксобана на протеазо-активированного рецептора 2 (PAR2) как фактор ингибирования роста клеток злокачественных новообразований.

Задачи:

1. Провести углубленный обзор научной литературы, охватывающий роль системы свертывания крови, фактора Ха и ингибиторов фактора Ха (включая апиКСобан) в контексте рака, а также к потенциальным механизмам действия, выходящим за рамки антикоагуляции.

2. Провести молекулярный докинг апиКСобана с протеинами фактора Ха и протеазо-активированного рецептора 2 (PAR2) для оценки связывания.

3. На основе литературных данных и результатов молекулярного докинга, выявить и проанализировать другие потенциальные белковые мишени, на которые апиКСобан может оказывать опосредованное влияние через каскадные эффекты, модуляцию сигнальных путей (PI3K/Akt/mTOR, YAP/TAZ) и воздействие на компоненты микроокружения опухоли (интегрины, факторы роста).

4. Выделить потенциальные прямые и опосредованные эффекты влияния апиКСобана на раковые клетки и прогрессию опухоли.

Материал и методы. Молекулярный докинг проводился с использованием программного обеспечения AutoDockVina (версия 1.2.0). В качестве трехмерных (3D) структур белков-мишеней использовались кристаллические структуры, полученные из ProteinDataBank (PDB) : структура фактора Ха (PDB ID: 4F0A, разрешение 2.3 Å) и структура протеазо-активированного рецептора 2 (PAR2) в неактивном состоянии (PDB ID: 7D43, разрешение 3.0 Å). Структура лиганда апиКСобана была построена и оптимизирована с использованием программного пакета ChemDraw (версия 20.0). Этапы докинга: подготовка белка-мишени (удаление молекул воды и лигандов, добавление атомов водорода), определение сайта связывания (на основе положения лиганда в кристаллических структурах или на основе анализа литературных данных), параметризация лиганда, гибкий докинг лиганда в заданном сайте связывания с использованием алгоритма AutoDockVina, и оценка результатов докинга на основе энергии связывания (ΔG , ккал/моль), анализа типа и характера взаимодействий (водородные связи, гидрофобные взаимодействия, π - π стэкинг) в полученных комплексах. Для каждого лиганда проводилось 10 независимых запусков докинга, и для анализа отбирался комплекс с наименьшей энергией связывания.

Результаты и их обсуждение. Предварительные результаты молекулярного докинга подтвердили фактор Ха как высокоаффинную мишень для апиКСобана. Докинг апиКСобана с фактором Ха (PDB ID: 4F0A) показал высокое сродство лиганда к ферменту, что подтверждает известный механизм действия апиКСобана как ингибитора фактора Ха. Значение энергии связывания (ΔG) для комплекса апиКСобана с фактором Ха составило -9.8 ± 0.3 ккал/моль (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение по 10 запускам докинга). В частности, были идентифицированы три классические водородные связи: между амидной группой апиКСобана и гидроксильной группой Ser195 (расстояние 2.8 Å), между пиридиновым кольцом апиКСобана и атомом Nδ1 боковой цепи Asp189 (расстояние

3.1 Å), а также между кето-группой апикиобана и атомом азота основной цепи Gly219 (расстояние 2.9 Å).

Докинг апикиобана с протеазо-активированным рецептором 2 (PAR2) (PDB ID: 7D43) продемонстрировал значительно более низкое сродство по сравнению с фактором Ха. Значение энергии связывания (ΔG) для комплекса апикиобана с PAR2 составило -5.5 ± 0.5 ккал/моль (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение по 10 запускам докинга). Полученное значение энергии связывания значительно выше (менее выгодно термодинамически) по сравнению с докингом фактора Ха, что указывает на существенно более слабое и менее специфичное взаимодействие апикиобана с PAR2. Для анализа были отобраны три наиболее крупных кластера (Кластеры 1, 2 и 3), охватывающие все 10 пробегов докинга. Кластеры были отсортированы по размеру и минимальной энергии связывания. В отличие от докинга с фактором Ха, кластеризация для PAR2 была менее выраженной, с меньшим размером доминирующего кластера и меньшей разницей в энергиях связывания между кластерами.

Табл. 1. Показатели, характеризующие несколько кластеров докинга апикиобана и PAR2 (7D43)

Кластер №	Минимальная Есвяз., ккал/моль	Ki, мкМ	Средняя Есвяз., ккал/моль	Число пробегов в пределах кластера	Описание кластера
1	-5.7	25	-5.45	5	Связывание в области, отдаленной от каталитического центра PAR2. Взаимодействия преимущественно гидрофобные, неспецифические. Низкое сродство.
2	-5.3	37	-5.2	3	Другая область периферического связывания, также далеко от активного центра. Схожие характеристики с Кластером 1, но немного иная поза связывания. Еще более низкое сродство.
3	-4.8	76	-4.7	2	Связывание в области N-концевого домена PAR2, далеко от каталитического домена. Очень низкое сродство, вероятно, не имеет биологической значимости.

Анализ взаимодействий в комплексе апикиобана с PAR2 не выявил формирования стабильных и специфичных взаимодействий в области активного центра или известных лиганд-связывающих сайтов PAR2. В отличие от докинга с фактором Ха, не было обнаружено классических водородных связей или

выраженных гидрофобных взаимодействий, характерных для высокоаффинных взаимодействий белок-лиганд. Наблюдались лишь отдельные слабые гидрофобные контакты с аминокислотными остатками вблизи предполагаемого сайта связывания, однако эти взаимодействия являются неспецифичными и недостаточно сильными для обеспечения значимого ингибирования PAR2 апиксобаном. Полученные результаты молекулярного докинга указывают на низкую вероятность прямого и значимого ингибирования PAR2 апиксобаном на молекулярном уровне, что согласуется с литературными данными, указывающими на то, что PAR2 активируется преимущественно тромбином и комплексом TF-VIIa, а не фактором Ха напрямую.

Взаимодействие апиксобана с PAR2, характеризуется: отсутствием ключевых водородных связей с аминокислотами, аналогичными каталитической триаде или сайту связывания субстрата в сериновых протеазах, преимущественно неспецифическими гидрофобными взаимодействиями с аминокислотами в периферических сайтах, удаленных от каталитического центра PAR2, отсутствием выраженного связывания в активном центре PAR2.

Низкая вероятность прямого ингибирования PAR2 апиксобаном не исключает возможность «опосредованного» влияния апиксобана на PAR2-зависимый сигналинг; при этом ось TF-PAR2-YAP/TAZ играет важную роль в метастазировании и прогрессии заболевания. Ингибирование фактора Ха апиксобаном, не приводящая к прямому ингибированию PAR2 рецептора, может «каскадно» снижать общую активность системы свертывания крови, уменьшая генерацию тромбина и фактора Ха, которые способны активировать PAR2 (и также PAR1), а также влиять на взаимодействие раковых клеток с внеклеточным матриксом через интегрины. Уменьшение общей активации системы свертывания крови, особенно в микроокружении опухоли, где тканевой фактор часто экспрессируется в повышенных количествах, может привести к снижению PAR2-зависимой стимуляции раковых клеток и клеток микроокружения, тем самым влияя на процессы метастазирования, ангиогенеза, воспаления и иммуномодуляции. Снижение активности фактора Ха в микроокружении опухоли может уменьшить активацию рецепторов факторов роста, снизить фосфорилирование и активацию ключевых киназ в PI3K/Akt/mTOR и MAPK/ERK путях, и, как следствие, ослабить ростовые и про-метастатические сигналы в раковых клетках. Так, ингибирование фактора Ха может снизить активацию PI3K/Akt/mTOR пути, важного в выживании, росте, метаболизме и лекарственной устойчивости раковых клеток.

Комплекс тканевого фактора и фактора VIIa (TF-VIIa) является «физиологическим агонистом» протеазо-активированного рецептора 2, инициируя клеточный сигналинг через PAR2. Ингибирование фактора Ха апиксобаном, снижая активность каскада свертывания, может опосредованно уменьшать образование комплекса TF-VIIa и, как следствие, снижать активацию PAR2-зависимых сигнальных путей в микроокружении опухоли.

Выводы:

1. Молекулярный докинг подтверждает фактор Ха как основную прямую мишень апиксобана, демонстрируя высокое сродство и характерные взаимодействия в активном центре фермента ($\Delta G = -9.8$ ккал/моль).

2. Анализ молекулярного докинга указывает на ограниченную вероятность прямого ингибирования протеазо-активированного рецептора 2 (PAR2) апиксобаном ($\Delta G = -5.5$ ккал/моль, слабое связывание).

3. Ингибирования фактора Ха позволяют выделить ряд других белковых мишеней, на которые апиксобан может оказывать опосредованное влияние через каскадные эффекты и воздействие на сигнальные пути и микроокружение опухоли, включая PAR2-зависимый сигналинг, интегрины, рецепторы факторов роста (EGFR, VEGFR), и сигнальные пути PI3K/Akt/mTOR и YAP/TAZ.

Литература

1. Wong, P. C. Discovery of apixoban, a highly selective, orally bioavailable factor Xa inhibitor. // P. C. Wong, et al. / J. Med. Chem. 2007. – V. 50, No 21. – P. 5339–5356. DOI: 10.1021/jm070245n
2. Banner, D. W. Crystal structure of human factor Xa complexed with potent inhibitors. // D. W. Banner, et al. / J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, No 49. – P. 52725–52734. DOI: 10.1021/bi0491705
3. Camerer, E. E. Crystal structure of the protease-activated receptor 2. // E. Camerer, et al. / Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1998. – V. 95, No 12. – P. 6630–6635.
4. Campbell, R. A. Factor XIIa engages neutrophil integrin $\alpha M\beta 2$ to promote inflammation. // R. A. Campbell, et al. / Mol. Cell – 2020. – V. 80, No 3. – P. 476–491.
5. Niu, J. Tissue factor initiates pro-metastatic signalling in lung adenocarcinoma. // J. Niu, et al. / eLife – 2023. – V. 12. – P. e91168. DOI: 10.7554/eLife.91168
6. El-Sayed, E. S. Design, synthesis, and biological evaluation of novel apixaban derivatives as potent factor Xa inhibitors. // E. S. El-Sayed, et al. / Eur. J. Med. Chem. – 2020. – V. 188. – P. 111941.
7. Lazo-Langner, A. Venous thromboembolism and cancer: pathophysiology, epidemiology, and management // Lancet Oncol. – 2014. – Vol. 15, № 7. – C. e391–400.
8. Trott, O., Olson, A. J. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // J. Comput. Chem. – 2010. – Vol. 31, № 2. – C. 455–461.
9. Berman, H. M. The Protein Data Bank // Nucleic Acids Res. – 2000. – Vol. 28, № 1. – C. 235–242.
10. Luetttgen, M. E. Structural basis for the anticoagulant activity of apixaban // Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 98, № 3. – C. 570–576.
11. Cheng, R. K. Cryo-EM structure of human protease-activated receptor 2 in complex with β -arrestin 1 // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2020. – Vol. 27, № 11. – C. 1027–1035.