

С.А. Звезжинский
ИНГИБИТОРЫ mTORC1 НА ОСНОВЕ САПАНИСЕРТИБА

Научные руководители: д-р биол. наук, доц. В.В. Хрусталева*,

ст. преп. А.Л. Подберезкина

**Кафедра биохимии*

Кафедра биологии

**Белорусский государственный университет, г. Минск*

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

S.A. Zvezhynski
mTORC1 INHIBITORS BASED ON SAPANISERTIB

Tutors: associate professor V.V. Khrustalev*, senior lecturer A.L. Podberezkina

**Department of Biochemistry*

Department of Biology

**Belarusian State University, Minsk*

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Изменение структуры пятичленного и шестичленного ароматического гетероцикла в гидрофобном фрагменте молекулы Сапанисертиба в сочетании с метильной группой в мета-положении увеличивает силу связывания и специфичность взаимодействия с киназой mTORC1, участвующей регуляции метаболических путей раковых клеток.

Ключевые слова: молекулярный докинг, Сапанисертиб, константа ингибирования.

Resume. Change of the structure of pentanomic and hexanomic heterocycle in hydrophobic part of Sapanisertiv molecule combined with methyl group in meta-position increases bond strength and interaction specificity when bound to mTORC1 kinase, which is major regulator of cancer cells metabolic pathways.

Keywords: molecular docking, Sapanisertib, inhibitory constant.

Актуальность. Киназа mTORC1 является важнейшим регулятором метаболических путей раковых клеток, ее ингибирование представляет перспективу для создания новейших противоопухолевых препаратов.

Цель: усовершенствовать АТФ-конкурентные ингибиторы mTORC1 на основе пиразоло-[3,4-d]-пиримидин-4-аминина путем изменения их химической структуры.

Задачи:

1. Выбрать подходящий для модификации ингибитор киназы mTORC1.
2. Проанализировать возможные участки изменения химической структуры ингибитора.
3. Сравнить эффективность работы модифицированных и исходных версий ингибитора.

Материалы и методы. Приложения Autodock 4.2.6 для проведения гибкого молекулярного докинга, Discovery Studio Visualizer 2021 для визуализации белок-лигандных взаимодействий, Avogadro для конструирования новых версий ингибитора, Protein Data Bank для получения трехмерной модели белка, ProTox 3.0 для анализа токсичности лиганда, Exrasu для анализа фармакокинетических свойств лиганда.

Результаты и их обсуждение. Комплекс mTORC1 – компонент белка mTOR (с англ. Mammalian target of rapamycin) – серин-треониновой киназы, ответственной за важные клеточные процессы, такие как деление, рост, пролиферация. Аберрантная экспрессия данного комплекса присутствует во многих видах рака[1][2][3][4], т.к. данный комплекс обеспечивает стабильность их на уровне метаболизма, деления, метастазирования, схематично это показано на рисунке 1. Ингибирование данной киназы представляет собой перспективу для создания противоопухолевых препаратов, ингибирующих сигнальный каскад и нарушающих стабильность клеточной линии.

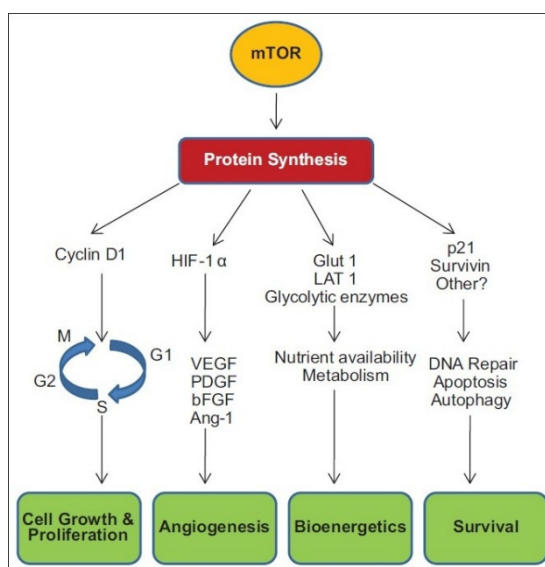


Рис. 1 – Сигнальный каскад mTOR

В настоящее время присутствует несколько поколений ингибиторов комплекса mTOR. Самым первым являются рапамицин и рапалоги(аналоги рапамицина). Они связываются вне киназного домена, интеркалируя между основным каркасом белка mTOR и активирующей субъединицей FKBP12, вызывая инактивацию комплекса. Однако данные ингибиторы из-за размеров молекулы и большого количества вращающихся связей менее предсказуемы и не подходят для драг-дизайна. В дополнение к ним популярность набирают менее подвижные в своей структуре АТФ-коункуретные ингибиторы, связывающиеся в киназном сайте белка.

В данной работе мы сконцентрировались на пиразоло-[3,4-d]-пиримидин-4-амин-производных ингибиторах, т.к. данная группа является довольно малочисленной и представляет перспективу для расширения. Лигандом интереса стал Сапанисертиб(MLN0128), поскольку данный препарат находится в настоящее время в клинических испытаниях 2-й фазы, тестирование его проводится на выборках пациентов до 300 человек. Сапанисертиб в экспериментах при повышении концентрации снижал количество фосфорилированных киназой mTORC1 участников сигнального каскада: факторов трансляции(4EBP1) и их киназ(S6K), электрофорез белков изображен на рисунке 2.

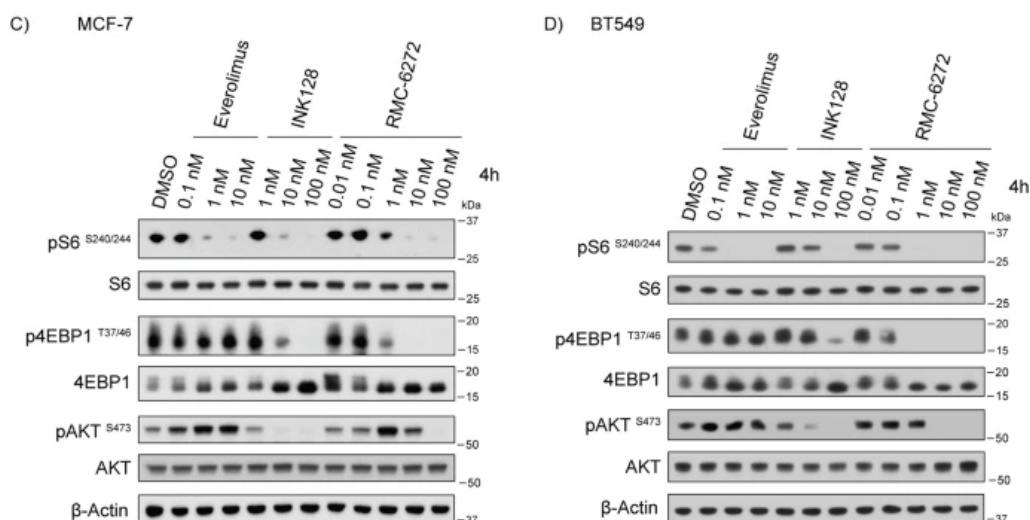


Рис. 2 – Электрофорез белков клеточных линий опухолей при введении MLN0128

Был проведен гибкий молекулярный докинг молекулы Сапанисертиба и проанализированы возможные участки дополнения его химической структуры. Была составлена общая формула и таблица, отражающая внесенные изменения.

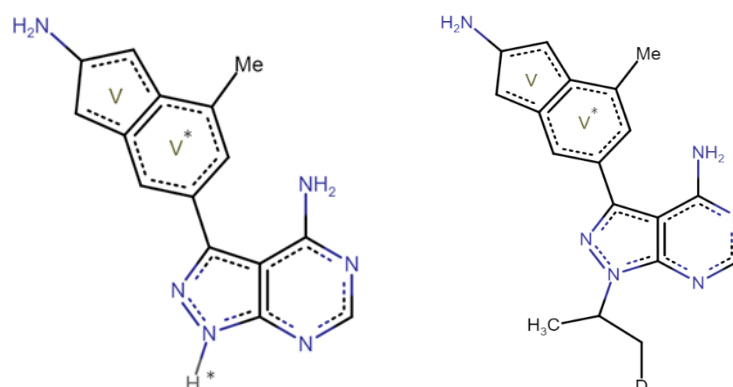


Рис. 3 – Общая химическая формула модифицированного лиганда

Табл. 1. Условное обозначение внесенных модификации

Модификация	Функциональная группа
V	Пятичленный ароматический гетероцикл (тиазол, имидазол, пиррол, фуран, тиофен)
V*	Шестичленный ароматический гетероцикл (пиридин, пиримидин, пиридазин, пиазин)
Me	Метильная группа
H*	Гидрофобный фрагмент(в данном случае в уже имеющемся изопропильном фрагменте проходила замена метильных группы и/или атома водорода на один, два или три атома фтора.
D	Потенциальный донор водородной связи

Далее проводился докинг и отбор модифицированных версий лигандов по следующему принципу: вносилась одна модификация, оценивалась ее энергия связывания, константа ингибирования, фармакокинетические свойства, в

особенности поклощаемость в пищеварительном тракте(GIa –с англ. gastrointestinal absorbtion), а также токсичность по отдельным системам органов. Отдельно внимание уделялось схожести с лекарственными веществами по различным моделям, таким как Липински, Эган, Вебер, Гос, Муэгге. При несоответствии модификации главному критерию исключения (поглощаемость в пищеварительном тракте), модификация исключалась. Таким образом были проанализированы попарные, тройные комбинации и комбинации четырех модификаций исходного лиганда, общая выборка составила 80 модификаций.

Табл. 2. Наиболее успешные комбинации модификаций

Внесенная модификация	Е, ккал/моль	K _i , нМоль
MLN0128+pyrrole+met	-8.95	276.05
MLN0128+thiophene+met	-9.04	235.68
MLN0128+pyridine+met	-9.67	81.42
MLN0128+thiophene+met+F	-9.47	115.05
MLN0128+thiophene+met+F+F	-8.70	420.71
MLN0128	-8.70	422.93

Табл. 3. Анализ фармакокинетических свойств наиболее успешных модификаций в сравнении с MLN0128

Образец	Растворимость	GIa	Druglikeness	Токсичность
MLN0128+pyrrole+met	средняя	высокая	подходит	Нейро (BBB-)
MLN0128+thiophene+met	средняя	высокая	подходит	нетоксичен
MLN0128+pyridine+met	хорошая	высокая	Egan (-)	Нейро (BBB+, BBB- по adme)
MLN0128+thiophene+met+F	средняя	высокая	подходит	нетоксичен
MLN0128+thiophene+met+F+F	средняя	высокая	подходит	нетоксичен
MLN0128	хорошая	высокая	подходит	Нейро (BBB-)

Можно заметить, что попарные комбинации более эффективно связываются в активном центре белка, что можно связать с тем, что меньшее количество модификаций обуславливает меньшие молекулярные перестройки как со стороны белка так и со стороны лиганда, что стабилизирует их индуцированное взаимосоответствие. Предполагается в дальнейшей работе остановиться на попарных комбинациях модификаций, вносимых в иные участки молекулы.

Выводы:

1. Сапанисертиб – молекула малых размеров, позволяющая, однако вносить большое количество химических модификаций в свою структуру

2. Попарные комбинации модификаций пятичленного и шестичленного ароматического гетероцикла, а также их сочетание с метиальной группой в мета-положении улучшают ингибирующие свойства лиганда без снижения схожести с лекарствами и радикального изменения фармакокинетики.

3. Применения новейшего программного обеспечения, проводящего множество циклов молекулярного докинга одновременно позволит анализировать больше модификаций, что повысит точность исследований в данном направлении.

Литература

1. Hayman TJ, Wahba A, Rath BH, Bae H, Kramp T, Shankavaram UT, Camphausen K, Tofilon PJ. The ATP-competitive mTOR inhibitor INK128 enhances in vitro and in vivo radiosensitivity of pancreatic carcinoma cells. Clin. Cancer Res. 2014 Jan 1;20(1):110-119. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2136.
2. Janes MR, Vu C, Mallya S, Shieh MP, Limon JJ, Li LS, Jessen KA, Martin MB, Ren ., Lilly MB. Efficacy of the investigational mTOR kinase inhibitor MLN0128/INK128 in models of B-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2013 Mar 11;27(3):586-94 doi: 10.1038/leu.2012.276.
3. Bhagwat SV, Gokhale PC, Crew AP, Cooke A, Yao Y, Mantis C, Kahler J, Workman J, Bittner M, Dudkin L, Epstein DM, Gibson NW, Wild R, Arnold LD, Houghton PJ, Pachter JA. Preclinical characterization of OSI-027, a potent and selective inhibitor of mTORC1 and mTORC2: distinct from rapamycin. Mol Cancer Ther. 2011 Jun 14; 10(8):1394-406. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1099.
4. Chen B, Xu M, Zhang H, Xu MZ, Wang ZJ, Tang QH, Tang JY. The Antipancreatic Cancer Activity of OSI-027, a Potent and Selective Inhibitor of mTORC1 and mTORC2. DNA Cell Biol. 2015 Oct 1; 34(10): 610–617. doi: 10.1089/dna.2015.2886.