

**ДИЗАЙН IN SILICO И ОЦЕНКА АФФИННОСТИ НОВЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ 6-ТИОДЕЗОКСИГУАНОЗИНА К АКТИВНОМУ  
ЦЕНТРУ ТЕЛОМЕРАЗЫ**

**Красная М.С., Ринейская О.Н., Грязнов С.М.**

**Красная М.С.**

*Студентка 2 курса лечебного факультета УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Беларусь  
mariakrasnaaa@gmail.com*

**Ринейская О.Н.**

*Кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей химии УО «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Беларусь  
ryneiskaya@mail.ru*

**Грязнов С.М.**

*PhD, Главный научный сотрудник, Майя Биотехнолоджи,  
Чикаго, Иллинойс, США  
sgryaznov@maiabiotech.com*

*В данной статье рассмотрен активный центр теломеразы, а также ее взаимодействие с субстратом 5'-трифосфатом 6-тиодезоксигуанозина. Авторами были предложены структурные аналоги 6-тиодезоксигуанозина и проведено моделирование их молекулярных контактов с теломеразой для оценки стабильности комплексов белок-лиганд. Для сравнения энергии взаимодействия использовали результаты докинга 6-тиодезоксигуанозина. По результатам исследования наибольшую аффинность к теломеразе имели производные, содержащие полярные заместители на С<sub>2</sub> аминогруппе пуринового кольца, которые характеризуются делокализацией электронной плотности и М-эффектом.*

**Ключевые слова:** теломераза, субстрат, молекулярный докинг, 6-тиодезоксигуанозин, π-π-стэкинг.

## **IN SILICO DESIGN AND AFFINITY EVALUATION OF NEW 6-THIODEOXYGUANOSINE DERIVATIVES TO THE ACTIVE SITE OF TELOMERASE**

**Krasnaya M.S.**

*Second-year student, Faculty of General Medicine, Belarusian State University,  
Minsk, Belarus  
mariakrasnaaa@gmail.com*

**Ryneiskaya O.N.**

*Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of General  
Chemistry, Belarusian State University, Minsk, Belarus  
ryneiskaya@mail.ru*

**Gryaznov S.M.**

*PhD, Chief Scientific Officer, Maia Biotechnology, Inc., Chicago, Illinois, USA  
sgryaznov@maiabiotech.com*

*This article examines the active site of telomerase and its interactions with 5'-triphosphate of 6-thio-2'-deoxyguanosine (6S-dG). The authors introduced structural analogs of 6-S-dG and performed molecular docking with the active catalytic site of telomerase to assess the stability of protein-ligand complexes. The results of 6S-dG redocking were used as a reference. The study revealed that derivatives containing polar substituents at the C<sub>2</sub> amino group of the purine ring, which characterized by delocalization of electron density and the M-effect, exhibited the highest affinity to telomerase.*

**Key words:** *telomerase, inhibitor, molecular docking, 6-thiodeoxyguanosine, pi-stacking.*

В последние десятилетия приоритетным направлением в онкофармакологии стала разработка таргетных препаратов. Примером может служить создание средств на основе олигонуклеотидов, действие которых направлено на ингибирование механизмов поддержания длины теломер. Эти механизмы являются критическим условием для неограниченной пролиферации злокачественных клеток. Основной мишенью подобных лекарственных средств выступает теломераза – специализированная рибонуклеопротеиновая обратная транскриптаза [1].

Поскольку активная экспрессия теломеразы характерна для стволовых, герминативных и более чем 90 % опухолевых клеток, но практически не обнаруживается в большинстве дифференцированных соматических тканей, данный фермент может рассматриваться как высокоспецифичная мишень для антипролиферативной терапии. На современном этапе активную разработку проходят препараты, использующие каталитический потенциал теломеразы для реализации цитотоксического эффекта. К числу наиболее перспективных соединений относится 6-тио-2'-дезоксигуанозин (ТНЮ, МНН: атеганозин), являющийся модифицированным нуклеотидным аналогом и антиметаболитом 2'-дезоксигуанозина [2].

Механизм действия ТНЮ принципиально отличается от классического конкурентного ингибирования. Препарат выступает в роли «ложного субстрата»,

который теломераза селективно встраивает в структуру теломер опухолевой клетки. Инкорпорация ТНЮ приводит к нарушению архитектуры теломерного хроматина, дестабилизации защитного белкового комплекса (шелтеринов) и индукции каскада теломер-специфичного повреждения ДНК (telomere-associated foci, TAF). Результатом является запуск селективного апоптоза малигнизированных клеток и предотвращение рецидивирования заболевания за счет элиминации пула клеток с высоким репликативным потенциалом [3, 4, 5].

Дальнейшее развитие данной технологии требует детального моделирования и сравнительного анализа взаимодействия атеганозина и природного дезоксигуанозина с активным центром теломеразы. Исследование структурных и термодинамических параметров связывания методами *in silico* открывает возможности для направленного дизайна новых производных нуклеозидов с целью создания аналогов, обладающих более высоким сродством к ферменту и повышенной эффективностью встраивания в теломерную ДНК.

Целью настоящего исследования явился рациональный дизайн новых высокоаффинных ингибиторов теломеразы на основе сравнительного анализа молекулярного взаимодействия атеганозина с каталитическим доменом.

**Материалы и методы.** Для проведения вычислительного эксперимента из базы данных Protein Data Bank (PDB) была получена кристаллическая структура каталитической субъединицы теломеразы (TERT) под идентификатором PDB ID: 3KYL (*Tribolium castaneum*). Данная модель была выбрана в качестве референтной ввиду отсутствия в каталитическом домене нативных лигандов и высокой степени гомологии активного центра со структурой теломеразы человека [6]. При подготовке макромолекулы к процедуре молекулярного докинга проводилось удаление молекул растворителя и минорных примесей. В структуре активного центра был сохранен кофактор – ион магния, который локализован в каталитическом узле и играет ключевую роль в координации фосфатных групп атеганозина и его производных, обеспечивая стабилизацию переходного комплекса в процессе связывания. Для обеспечения корректной посадки исследуемых лигандов в каталитическом кармане фермента и устранения стерических затруднений в процедуре докинга было осуществлено удаление одного дезоксирибонуклеотида из состава терминального участка теломерной ДНК. Данный этап позволил освободить целевой сайт связывания для оценки аффинности атеганозина и его производных в позиции, соответствующей акту элонгации цепи.

Затем при помощи программного пакета ChemOffice были разработаны 22 структурных аналога 6-тиодезоксигуанозина путем введения различных по размеру и полярности заместителей в положения 1, 2, 7 и 8 пуринового кольца, а также в аминогруппу при C<sub>2</sub> (Рис.1). При подготовке лигандов к процедуре молекулярного докинга использовались нуклеозидтрифосфатные формы атеганозина и его производных. Данный подход обусловлен биологической обоснованностью выбранных структур: в нативных условиях теломеразы, подобно другим ДНК-зависимым полимеразам, осуществляет захват и последующее включение нуклеотидов в растущую цепь исключительно в виде дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Так как биохимический процесс, катализируемый теломеразой, проис-

ходит с участием ионов магния, важным было на стадии подготовки лиганда установить отрицательный заряд остатков фосфорной кислоты. Пространственная оптимизация геометрии лигандов и расчет их парциальных зарядов проводились с использованием программного обеспечения Chem3D при помощи метода энергетической минимизации в силовом поле MM2.

Преобразование файлов в формат .pdbqt было произведено с помощью сервиса Science Codons. Расчет энергии связывания в системе белок-лиганд производился посредством AutoDock Vina. Каждый лиганд подвергался молекулярному докингу с теломеразой (3KYL). Далее проводились отбор и анализ полученных комплексов при помощи PyMOL, онлайн сервисов ProteinPlus, PLIP; оценка энергии сродства лигандов к активному центру фермента по величине свободной энергии Гиббса (ккал/моль).

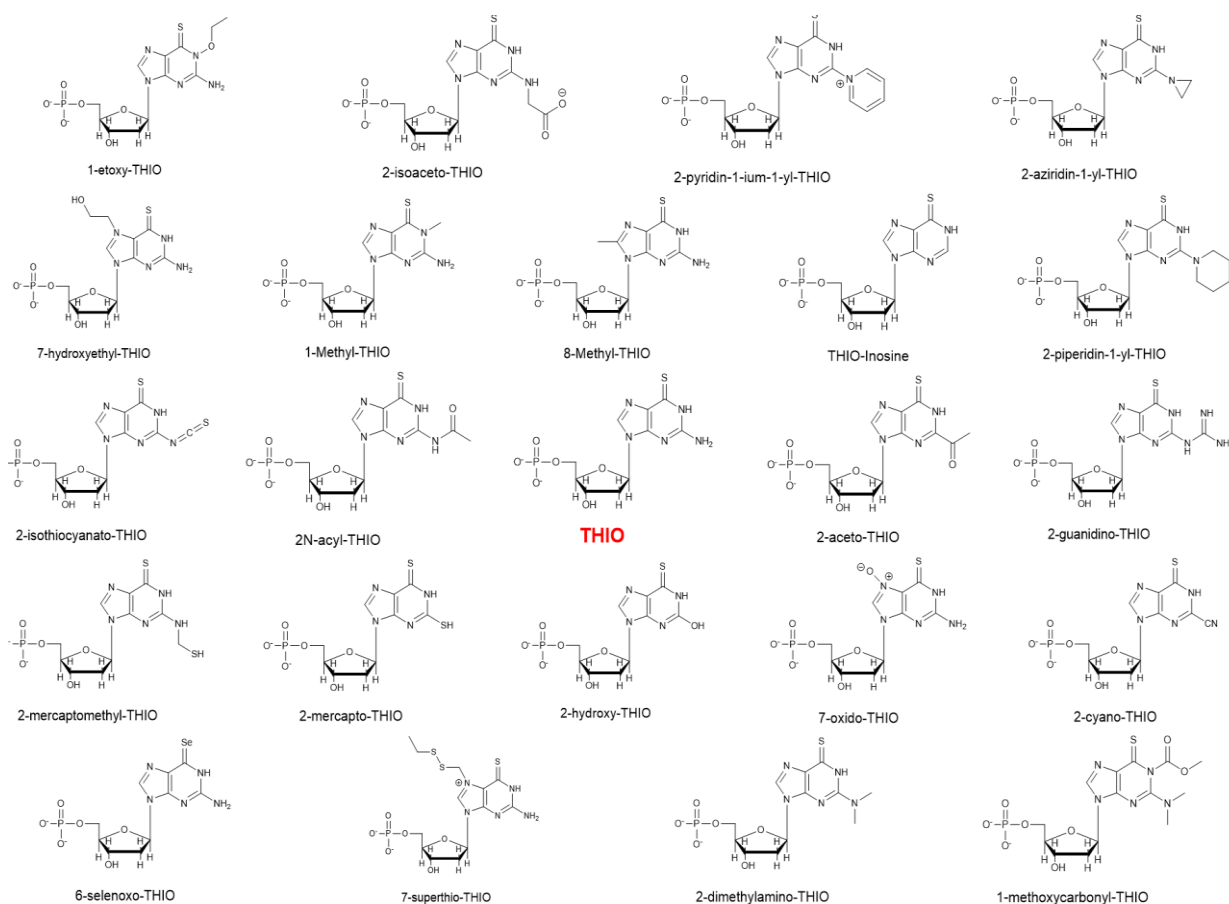


Рис. 1. Структурные аналоги 6-тио-2'-дезоксигуанозина

**Результаты и обсуждение.** Для каждого исследуемого лиганда в результате молекулярного докинга было генерировано по 9 конформационных решений (поз), ранжированных по значению расчетной энергии связывания. Путем сравнительного конформационного анализа и 3D-визуализации в программной среде PyMOL из полученного набора отбирались позы, характеризующиеся нативной ориентацией в каталитическом центре, то есть те, где лиганд располагался параллельно плоскости терминального нуклеотида в цепи теломерной ДНК. Данный критерий отбора обеспечивал соответствие геометрических параметров лиганда условиям последующего акта каталитической элонгации.

Далее была проведена сравнительная оценка аффинности ряда производных 6-тио-2'-дезоксигуанозина к каталитическому домену теломеразы. В качестве референтного значения использовался показатель энергии связывания немодифицированного нуклеозидтрифосфата ТНЮ, составивший -8,905 ккал/моль (Таблица 1). Анализ результатов свидетельствует о том, что ряд модификаций в положениях N1, C2 и C8 пуринового ядра приводит к дестабилизации взаимодействия с теломеразой.

Наиболее выраженное снижение аффинности зафиксировано для соединений с метилтио-группой (Таблица 1, №10: -6,719 ккал/моль) и гидроксипропан-2-илтио-группой (Таблица 1, №21: -6,74 ккал/моль). Также неблагоприятными с энергетической точки зрения оказались этокси-производное (Таблица 1, №2: -8,098 ккал/моль) и ацилирование непосредственно по кольцу (Таблица 1, №8: -7,567 ккал/моль). Подобное снижение термодинамической стабильности может быть обусловлено возникновением стерических затруднений в каталитическом кармане фермента, что препятствует оптимальной координации трифосфатной группы нуклеотида относительно иона магния и РНК-матрицы.

Таблица 1

Результаты молекулярного докинга и значения свободной энергии связывания производных 6-тио-2'-дезоксигуанозинтрифосфата с теломеразой

№	Название лиганда	Энергия связывания, ккал/моль
Эталон	ТНЮ	-8,905
1	1-methyl-ТНЮ	-8,673
2	1-etoxy-ТНЮ	-8,098
3	1-methoxycarbonyl-ТНЮ	-8,849
4	2-hydroxy-ТНЮ	-8,362
5	2-mercapto-ТНЮ	-8,741
6	8-methyl-ТНЮ	-8,560
7	ТНЮ-inosine	-8,752
8	2-aceto-ТНЮ	-7,567
9	2N-acyl-ТНЮ	-9,626
10	2-mercaptomethyl-ТНЮ	-6,719
11	2-piperidin-1-yl-ТНЮ	-7,700
12	2-cyano-ТНЮ	-8,275
13	2-dimethylamino-ТНЮ	-9,009
14	2-isothiocyanato-ТНЮ	-8,57
15	2-aziridin-1-yl-ТНЮ	-8,339
16	2-guanidino-ТНЮ	-9,031
17	7-oxido-ТНЮ	-7,762
18	2-pyridin-1-ium-1-yl-ТНЮ	-9,962
19	2-isoaceto-ТНЮ	-9,556
20	7-superthio-ТНЮ	-9,120
21	7-hydroxyethyl-ТНЮ	-6,740
22	6-selenoxo-ТНЮ	-8,483

В то же время некоторые производные продемонстрировали показатели, сопоставимые с эталоном или незначительно его превосходящие. Так, введение

метильных групп в соединении №13 (-9,009 ккал/моль) или гуанидинового фрагмента (Таблица 1, №16: -9,031 ккал/моль) подтверждает возможность замены заместителей в положении 2 без потери эффективности связывания. Интересно отметить, что селеносодержащий аналог (Таблица 1, №22, SNIO) с показателем -8,483 ккал/моль уступает референтной структуре, что подчеркивает уникальность серы в обеспечении специфических контактов в активном центре.

Наибольшую аффинность продемонстрировали три структуры: 2-isoaceto-THIO (Таблица 1, №19: -9,556 ккал/моль), 2N-acyl-THIO (Таблица 1, №9: -9,626 ккал/моль), 2-Py-THIO (Таблица 1, №18: -9,962 ккал/моль). Абсолютным лидером молекулярного докинга стало соединение №18 (2-пиридино-6-тиодезоксигуанозинтрифосфат), энергия связывания которого на 1,057 ккал/моль ниже эталонного значения.

Существенный прирост аффинности указанных соединений, возможно, объясняется введением объемных ароматических или ацильных заместителей в положение 2, что способствует усилению  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг-взаимодействий с азотистыми основаниями РНК-матрицы и гидрофобными остатками каталитического кармана. Несмотря на возможную дестабилизацию канонических водородных связей в паре с матричным нуклеотидом, наличие расширенной системы сопряжения в радикалах лигандов №18 и №19 обеспечивает, по-видимому, более выгодную термодинамическую конфигурацию соединения в активном центре, что и отражается в снижении энергии Гиббса. Для соединений 2N-acyl-THIO (№9) и 2-isoaceto-THIO (№19) важным фактором является наличие карбонильной группы, сопряженной с аминогруппой пуринового кольца. Это приводит к образованию планарной конфигурации заместителя, что уменьшает энтропийные потери при связывании. Кроме того, атом кислорода в ацильных и ацето-группах выступает в роли дополнительного акцептора водородной связи, формируя новые контакты с микроокружением активного центра теломеразы (Рис. 2).

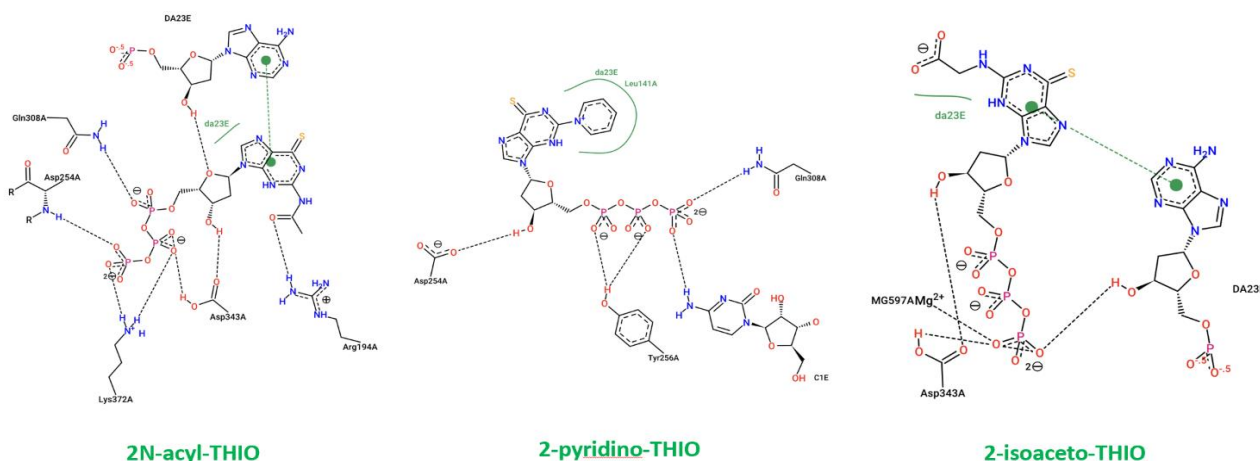


Рис. 2. Визуализация пространственного расположения соединений-лидеров в активном центре теломеразы и ключевые межмолекулярные взаимодействия (по данным ProteinPlus)

Напротив, отсутствие систем сопряжения и наличие алифатических или объемных гидрофильных радикалов (например, в структурах №21 и №2) нарушает электронный баланс пуриновой системы и создает пространственные препятствия.

**Заключение.** В ходе проведенного исследования методами рационального дизайна и молекулярного моделирования *in silico* была обоснована перспективность разработки новых производных 6-тио-2'-дезоксигуанозина как эффективных «ложных субстратов» теломеразы. Проведенный сравнительный анализ ряда соединений позволил выявить три структуры (№18, №9 и №19), характеризующиеся наилучшей геометрической и энергетической комплементарностью к каталитическому центру фермента.

Установлено, что критическим фактором, определяющим высокую термодинамическую устойчивость комплексов «теломераза–лиганд», является наличие в положении С2 заместителей с развитой системой делокализации электронной плотности (ацильной, пиридиновой и изоацето-групп). Формирование расширенной системы сопряжения в данных модификациях способствует усилению π-π-стэкинг-взаимодействий в активном центре, что делает эти соединения приоритетными объектами для дальнейшего изучения.

Полученные результаты открывают возможности для перехода к следующему этапу исследований, включающему детальный анализ стабильности комплексов методами молекулярной динамики и последующую верификацию биологической активности синтезированных соединений в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах. Разработанные модификации могут представлять существенный интерес для таргетной онкофармакологии как потенциальные агенты, способные эффективно подавлять репликативный потенциал и вызывать гибель злокачественных клеток.

#### **Список литературы**

1. Shay, J. W. Telomeres and telomerase: three decades of progress / J. W. Shay, W. E. Wright // *Nature Reviews Genetics*. – 2019. – Vol. 20, № 5. – P. 299–309.
2. Ажибек, Н. А. Ингибирование теломеразы человека олигонуклеотидами : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.10 / Н. А. Ажибек ; Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова. – М., 2014. – 24 с.
3. Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine / I. Mender, S. Gryaznov [et al.] // *Cancer Cell*. – 2015. – Vol. 28, № 2. – P. 236–249.
4. THIO-Targeted Telomere Therapy: A Novel Strategy for Cancer Treatment / S. Sengupta, S. Gryaznov [et al.] // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, № 15. – Art. 3662.
5. Mender, I. 6-Thio-2'-Deoxyguanosine (THIO) as a New Frontier in Cancer Immunotherapy / I. Mender, S. Gryaznov, J. W. Shay // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Vol. 10. – Art. 601350.
6. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA / M. Mitchell [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17, № 4. – P. 513–518.